



**UCA**

Universidad  
de Cádiz

**RECICLADO DEL ORUJO DE UVA COMO MEDIO  
SÓLIDO DE FERMENTACIÓN PARA LA  
PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE  
INTERÉS INDUSTRIAL**

**Ana Belén Díaz Sánchez**

**TESIS DOCTORAL  
ABRIL, 2009**





---

**Reciclado del orujo de uva como medio  
sólido de fermentación para la producción de  
enzimas hidrolíticas de interés industrial**

---

**Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz**

**Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de  
Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente**

**Ana Belén Díaz Sánchez**

**24 de Abril de 2009**



**“RECICLADO DEL ORUJO DE UVA COMO MEDIO SÓLIDO DE  
FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS  
HIDROLÍTICAS DE INTERÉS INDUSTRIAL”**

Memoria presentada por la Licenciada en C. Químicas Ana Belén Díaz Sánchez  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Cádiz

Fdo: Ana Belén Díaz Sánchez

Puerto Real, 24 de Abril de 2009

La presente Tesis Doctoral ha sido dirigida por los Doctores Dña. Ana María Blandino Garrido, Profesora Titular de Ingeniería Química de la Universidad de Cádiz y D. Ignacio de Ory Arriaga, Profesor Contratado Doctor de Ingeniería Química de la Universidad de Cádiz, y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente.

Fdo.: Dña. Ana María Blandino Garrido

Fdo.: D. Ignacio de Ory Arriaga

Fdo.: Dña. Clara Pereyra López

Directora del Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y  
Tecnologías del Medio Ambiente  
Universidad de Cádiz



Tras cuatro años de intenso esfuerzo que quedan plasmados en este libro, no queda más que agradecer a aquellas personas que tanto me han ayudado y apoyado en el transcurso de esta carrera de fondo que parece que está llegando a su final.

En primer lugar quería destacar la gran labor realizada por mis directores de tesis, la Dra. Ana Blandino y el Dr. Ignacio de Ory, por sus consejos, por contar siempre conmigo, por saber orientarme, por animarme en mis momentos de “bajón” y por confiar en mí hace cuatro años para trabajar en el proyecto Orufes.

También quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Ildefonso Caro por ayudarme siempre que lo he necesitado y aportarme tan buenas ideas.

A Colin Webb, por haberme abierto las puertas de su grupo de investigación, por su gran aportación científica y por su gran calidad como persona.

A Jorge Bolívar, por ayudarme con su experiencia y prestarme gran parte de su tiempo para la realización y comprensión de los experimentos de Bioquímica. A este respecto, también quería señalar la ayuda de Iván en la parte experimental.

A Carolina Botella, por haberse portado tan bien durante mis estancias en Manchester y hacer que el tiempo pasara tan deprisa, por sus consejos, por darme la gran oportunidad de trabajar durante tres meses en un proyecto con ella en Shell y por ser mi ejemplo a seguir.

A mis niñas (Cristi, Belén, Juanita, Violeta, Eugenia, Ana R, Jezabel y Gema) y niños del departamento (Martín, Alvarito, Antonio, Jose, Dani), que a pesar de que no he pasado el tiempo que me hubiera gustado con ellos, han demostrado ser gente que merece mucho la pena y a los que nunca voy a olvidar.

Tampoco hubieran sido iguales estos cuatro años sin la presencia de otros compañeros de mi grupo (Víctor, Luis, Juan, Pepa y Ricardo), de Nela, Juanito y Belí, resto de personas del

departamento y mis compañeros del instituto del vino. Gracias a ellos me siento muy afortunada por haber pertenecido durante este tiempo a este departamento.

A mis amigos y compañeros de tertulias (Gabi, Cristi, Redu, Pablo, Beatriz, Sete, Antonios, Keiler), por hacerme reír y pasar los almuerzos tan entretenidos. Por haberlos conocido a ellos y a los que ya se han ido (Marienca, Fran, Romain, Marcelo, Dani, Gerardo, Loli), han merecido mucho la pena mis cuatro años de doctorado.

Tampoco se me olvidan mis amigos de fuera (Lourdes, Aurori, Lidia, Estrella, Alejandro, Villi, Chema, Chiqui, Caro, Enrique) que aunque los he tenido un poco abandonados, principalmente en momentos de agobio por la Tesis, sé que siempre están ahí.

A mi familia, segunda familia (mis vecinos) y familia política, por preocuparse por mí y por ofrecerme todo su apoyo.

A mis padres, por su paciencia, principalmente en vísperas de la tesis, por apoyarme en todo lo que hago, por preocuparse tanto por mí y desearme todo lo mejor, y a mi hermano, por su cariño.

A Jacinto, el que tanto me ha ayudado, el que sabe como animarme y el que tanta paciencia tiene conmigo. Gracias por estar a mi lado y por quererme tanto.

**A mis padres**  
**A mi hermano**  
**A Jacinto**



## RESUMEN

---

La sociedad demanda cada vez más el desarrollo de procesos para la obtención de productos de utilidad respetuosos con el Medio Ambiente. Por este motivo, se están realizando numerosos trabajos dirigidos a la producción de distintos compuestos químicos y de especialidad mediante la bioconversión de excedentes y residuos agroindustriales. En esta línea, en la presente tesis se pretende profundizar en el desarrollo de un nuevo proceso, de bajo impacto medioambiental y de costes muy reducidos, para aprovechar el principal subproducto de la industria vitivinícola: el orujo de uva.

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que mediante la fermentación en estado sólido (FES) del hongo *Aspergillus awamori* sobre el orujo de uva se secretan las enzimas pectinasas, xilanasas y celulasas. Sin embargo, la composición de este sustrato natural cambia en función de la estación, el tipo de uva, el punto de recolección, las condiciones meteorológicas, etc., de forma que no es posible asegurar productividades enzimáticas reproducibles cuando se utilizan diferentes orujos de uva. Por este motivo, el lavado previo de este residuo, junto con la suplementación con una solución nutritiva y mezcla con cáscaras de naranja, con gran contenido en pectina, celulosa y hemicelulosa, mejoran la producción y la reproducibilidad de la síntesis de las mencionadas enzimas. Por tanto, mediante este trabajo se han producido extractos con un alto contenido en las enzimas pectinasas, xilanasas y celulasas, usando la tecnología de FES sobre mezclas de estos dos residuos agroindustriales. Estos extractos, una vez concentrados y/o purificados, pueden ser utilizados en las industrias de elaboración de zumos y vinos en las etapas de clarificación. Estas enzimas son las constituyentes fundamentales de los complejos multienzimáticos comerciales que se emplean para facilitar la filtración de los zumos, siendo las pectinasas las que juegan el papel más relevante del proceso.

Por otra parte, dada la importancia de las variables externas de fermentación sobre la producción enzimática, y ya que los reactores están estrechamente vinculados a su manipulación de éstas, en el presente trabajo se seleccionó la configuración de reactor más apropiada y las condiciones óptimas de operación para la síntesis de las mencionadas enzimas por el hongo *Aspergillus awamori*. Se compararon cuatro configuraciones diferentes de reactor (tres de fermentación en estado sólido y una de cultivo suspendido) con el propósito de estudiar la influencia de la agitación y la aireación, siendo el reactor de cultivo sumergido y el tambor rotatorio, en primer y segundo lugar, respectivamente, los que proporcionaron las actividades enzimáticas más altas.

Se evaluó además la estabilidad de las enzimas exo-poligalacturonasa (un tipo de pectinasa) y xilanasas en los extractos enzimáticos obtenidos por FES, registrando para ambas altas actividades en un amplio rango de pH y temperatura y en presencia de distintos cationes.

Los extractos obtenidos, una vez seleccionado el método más adecuado para su concentración, se emplearon en la clarificación de mostos de uva, obteniéndose mejores rendimientos que con otros extractos comerciales comúnmente utilizados en las bodegas. Además, para mejorar su aplicabilidad, fueron parcialmente purificados mediante cromatografía de intercambio iónico en columna DEAE-celulosa, mostrando un mayor grado de pureza que los crudos enzimáticos comerciales.

De los resultados obtenidos se puede concluir que el nuevo proceso propuesto para el reciclado del orujo de uva, supone una alternativa claramente viable de cara a la valorización de residuos agroindustriales. De este modo, estos pueden utilizarse como sustratos de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de gran utilidad comercial, favoreciendo además la reducción de su poder contaminante.

# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
<b>1.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>1.2. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b>	<b>15</b>
<b>2.1. DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (FES)</b>	<b>17</b>
2.1.1. Aspectos generales de la FES	17
2.1.2. Historia y desarrollo de la FES	20
<b>2.2. ASPECTOS BIOQUÍMICOS E INGENIERILES DE LA FES</b>	<b>23</b>
2.2.1. Temperatura	23
2.2.2. Aireación	25
2.2.3. Humedad	26
2.2.4. Tamaño de partícula	27
2.2.5. pH	28
2.2.6. Agitación	29
2.2.7. Diseño del reactor	30
<b>2.3. DIFERENCIAS ENTRE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (FES) Y FERMENTACIÓN EN CULTIVO SUMERGIDO (FCS)</b>	<b>33</b>
<b>2.4. COMPONENTES DE LA FES</b>	<b>41</b>
2.4.1. Microorganismo	41
2.4.2. Sustrato	45
2.4.2.1. <i>El orujo de uva como sustrato para la FES</i>	52
<b>2.5. APLICACIONES DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO</b>	<b>57</b>
2.5.1. Biorremediación y detoxificación biológica de compuestos peligrosos	58
2.5.2. Biotransformación de cosechas o residuos de cosechas	60
2.5.3. Pulpeado biológico	61
2.5.4. Producción de compuestos bioactivos	62
2.5.5. Producción de ácidos orgánicos	64
2.5.6. Producción de enzimas	66

2.5.7. Producción de bioetanol	67
2.5.8. Producción de otros compuestos de interés	67
<b>2.6. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO</b>	<b>71</b>
2.6.1. Enzimas hidrolíticas	75
2.6.1.1. <i>Pectinasas</i>	75
2.6.1.2. <i>Xilanasas</i>	79
2.6.1.3. <i>Celulasas</i>	83
2.6.2. Concentración y purificación de extractos enzimáticos	84
<b>3. DESARROLLO DE FERMENTACIONES EN ESTADO SÓLIDO SOBRE ORUJO DE UVA PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS</b>	<b>87</b>
<hr/>	
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>89</b>
<b>3.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO</b>	<b>93</b>
<b>3.3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>95</b>
3.3.1. Preparación del medio de fermentación	95
3.3.1.1. <i>Medio sintético</i>	95
3.3.1.2. <i>Orujo de uva natural</i>	96
3.3.1.3. <i>Orujo de uva lavado</i>	97
3.3.1.4. <i>Cáscaras de naranja</i>	98
3.3.1.5. <i>Mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja</i>	99
3.3.2. Humedad inicial del sólido	100
3.3.2.1. <i>Ajuste de la humedad inicial del sólido con agua destilada</i>	100
3.3.2.2. <i>Ajuste de la humedad inicial del sólido con una solución nutritiva con sacarosa</i>	101
3.3.2.3. <i>Ajuste de la humedad inicial del sólido con solución nutritiva sin sacarosa</i>	102
3.3.3. Preparación y almacenamiento del inóculo	102
3.3.3.1. <i>Obtención del inóculo</i>	103
3.3.4. Desarrollo de las fermentaciones	104
3.3.5. Extracción de las enzimas	105
3.3.6. Medidas de la actividad enzimática	107
3.3.6.1. <i>Determinación de la actividad exo-PG</i>	108
3.3.6.2. <i>Determinación de la actividad xilanasas</i>	109
3.3.6.3. <i>Determinación de la actividad celulasas</i>	111

3.3.6.4. <i>Determinación de los azúcares reductores</i>	111
<b>3.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>115</b>
3.4.1. FES en el medio sintético	116
3.4.2. FES sobre orujo de uva	119
3.4.3. FES sobre orujo de uva lavado	121
3.4.3.1. <i>Ajuste de la humedad inicial del sólido con agua destilada</i>	121
3.4.3.2. <i>Ajuste de la humedad inicial del sólido con una solución nutritiva</i>	124
3.4.3.3. <i>Ajuste de la humedad inicial del sólido con una solución nutritiva sin sacarosa</i>	127
3.4.4. FES sobre cáscaras de naranja lavadas	130
3.4.5. FES sobre una mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja lavados utilizando <i>Aspergillus awamori</i>	133
<b>3.5. CONCLUSIONES</b>	<b>139</b>
<b>4. ESTUDIO DE DIFERENTES CONFIGURACIONES DE REACTOR PARA EL DESARROLLO DE LAS FERMENTACIONES</b>	<b>141</b>
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>143</b>
4.1.1. Clasificación de reactores de FES	144
4.1.1.1. <i>Reactores sin agitación</i>	147
4.1.1.2. <i>Reactores con agitación</i>	151
4.1.2. Influencia de la aireación en los reactores de FES	153
4.1.3. Escalado de los reactores de FES	155
4.1.3.1. <i>Escalado de reactores sin agitación</i>	156
4.1.3.2. <i>Escalado de reactores con agitación</i>	158
4.1.4. Diferencias de diseño de un reactor de Fermentación en Estado Sólido (FES) y de Fermentación en Cultivo Sumergido (FCS).	159
<b>4.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO</b>	<b>161</b>
<b>4.3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>163</b>
4.3.1. Fermentadores en Estado Sólido	163
4.3.1.1. <i>Preparación del medio de fermentación</i>	163
4.3.1.2. <i>Reactor de lecho fijo</i>	164
4.3.1.3. <i>Reactor de bandejas</i>	166
4.3.1.4. <i>Reactor de tambor rotatorio</i>	168
4.3.1.5. <i>Extracción y medida de las enzimas</i>	171

4.3.2. Fermentador de cultivo sumergido (FCS)	172
4.3.2.1. Preparación del medio de fermentación	172
4.3.2.2. Puesta a punto del protocolo de inoculación	174
4.3.2.3. Reactor discontinuo de tanque agitado (RDTA)	175
4.3.2.4. Obtención y medida de las enzimas	179
<b>4.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>181</b>
4.4.1. FES en reactor de lecho fijo	182
4.4.1.1. Efecto de la aireación	182
4.4.2. FES en reactor de bandejas	186
4.4.2.1. Efecto de la aireación	186
4.4.3. FES en reactor de tambor rotatorio	199
4.4.3.1. Efecto de la aireación y la agitación	199
4.4.4. Comparación de actividades en los distintos reactores de FES	209
4.4.5. Fermentación en Cultivo Sumergido	212
4.4.6. Ventajas e inconvenientes de los distintos tipos de reactor utilizados	216
4.4.6.1. Reactor de lecho fijo	218
4.4.6.2. Reactor de bandejas	220
4.4.6.3. Reactor de tambor rotatorio	221
4.4.6.4. Reactor de tanque agitado	222
<b>4.5. CONCLUSIONES</b>	<b>225</b>
<b>5. CARACTERIZACIÓN, CONCENTRACIÓN, PURIFICACIÓN Y APLICABILIDAD DE LAS ENZIMAS EN ESTUDIO</b>	<b>227</b>
<hr/>	
<b>5.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>229</b>
5.1.1. Estabilidad de las enzimas	229
5.1.2. Concentración de las enzimas	233
5.1.3. Purificación de las enzimas	235
5.1.4. Aplicabilidad de las enzimas	237
<b>5.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO</b>	<b>239</b>
<b>5.3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>241</b>
5.3.1. Obtención de los extractos enzimáticos	241
5.3.2. Determinación de las proteínas totales en los extractos (método de Lowry)	242
5.3.3. Ensayos de estabilidad de las enzimas xilanasa y exo-PG	243

5.3.3.1. Efecto de la presencia de cationes	243
5.3.3.2. Efecto del pH	245
5.3.3.3. Efecto de la temperatura	247
5.3.4. Protocolos empleados en la concentración de las enzimas	248
5.3.4.1. Precipitación con distintos agentes químicos	249
5.3.4.2. Fraccionamiento de tres fases	250
5.3.4.3. Liofilización	252
5.3.5. Ensayos de aplicabilidad del extracto enzimático concentrado en la clarificación de mostos	252
5.3.6. Análisis de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE	255
5.3.7. Metodología de purificación de las enzimas por cromatografía de intercambio iónico	256
5.3.8. Estudio de la pureza de crudos enzimáticos comerciales	261
<b>5.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>265</b>
5.4.1. Caracterización de las enzimas xilanasas y exo-PG	265
5.4.1.1. Estudio de la estabilidad frente a distintos cationes	265
5.4.1.2. Estudio de la estabilidad frente a distintos pH	269
5.4.1.3. Estudio de la estabilidad con la temperatura. Cálculo de las constantes cinéticas de desactivación enzimática	273
5.4.2. Comparación de distintos métodos de concentración de las enzimas	282
5.4.3. Estudio de la aplicabilidad del extracto enzimático concentrado con etanol en la clarificación de mostos	286
5.4.4. Purificación de las proteínas por cromatografía de intercambio iónico	289
5.4.5. Comparación de los extractos parcialmente purificados con crudos comerciales	296
<b>5.5. CONCLUSIONES</b>	<b>303</b>
<b>6. CONCLUSIONES FINALES</b>	<b>305</b>
<b>6.1. CONCLUSIONES FINALES</b>	<b>307</b>
<b>7. RESUMEN EN INGLÉS</b>	<b>309</b>



1

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



## **1.1. INTRODUCCIÓN**

La industria agroalimentaria mundial, y en especial la de los países desarrollados, ha venido experimentado en los últimos años una sensible transformación derivada, entre otros motivos de índole comercial, por las crecientes exigencias legislativas relativas a la disminución del poder contaminante de sus procesos.

Los residuos agroindustriales presentan, en este sentido, dos aspectos contrapuestos; aunque su acumulación supone un gran problema económico y ecológico pueden considerarse una fuente prometedora y renovable de compuestos útiles por sus propiedades tecnológicas y nutricionales. Son materiales ricos en micronutrientes como carotenoides, polifenoles, tocoferoles, vitaminas, oligoelementos, etc., que tienen importantes efectos beneficiosos sobre la salud humana. Sin embargo, para un uso inmediato y económicamente rentable de estos materiales como alimento o como fertilizante es necesaria, en la mayoría de los casos, la aplicación de algunos pretratamientos y procedimientos de compostaje. Si bien es cierto que el aprovechamiento de estos sólidos no evita la necesidad de albergar grandes cantidades de residuos, si que se pueden obtener algunos beneficios económicos que hacen que el proceso sea más sostenible.

Los procesos de reutilización y revaloración de residuos agroindustriales, como puedan ser el salvado de trigo, la pulpa del café, el bagazo de caña de azúcar o el orujo de naranja entre otros, están siendo cada vez más empleados. Los procesos biotecnológicos, especialmente la fermentación en estado sólido (FES), han contribuido enormemente a dicha reutilización, ayudando a solventar problemas de contaminación causados por su acumulación. Esta técnica ha sido empleada en la biotransformación de residuos, en la biorremediación de compuestos peligrosos, en la detoxificación biológica de residuos agroindustriales, etc. Mediante FES también se

obtienen compuestos de interés como ácidos orgánicos, sustancias bioactivas (ácido giberélico, penicilina, tetraciclina, etc.), bioetanol, biopesticidas, u otros.

Una de las aplicaciones con más potencial de esta técnica es la producción de enzimas de interés industrial, que intervienen en procesos biotecnológicos y que, en muchos casos, reemplazan a procesos químicos tradicionales, más agresivos para el medio ambiente y menos rentables desde el punto de vista económico. Dentro de estas cabe destacar las enzimas hidrolíticas, por su participación en numerosos procesos industriales como en la extracción y clarificación de zumos de frutas, extracción de aceites vegetales, extracción de pigmentos y sabores de plantas, blanqueado de la pulpa y el papel, etc.

La gran mayoría de las enzimas de interés industrial son obtenidas mediante fermentación en cultivo sumergido (FCS). Sin embargo, debido a que esta técnica presenta costes elevados, una alternativa interesante a considerar es el empleo de la FES. En el crudo de FES la enzima está más concentrada, lo que presenta especial interés en procesos donde dicho crudo deba utilizarse directamente, sin etapas previas de purificación. Esta técnica también se destacaría frente a la FCS cuando se pretenden reutilizar y revalorar los sólidos agrícolas y los residuos agroindustriales, ya que generalmente son sustratos mejores para la FES.

La provincia de Cádiz es un área que cuenta con una gran tradición vitivinícola. En el proceso de elaboración del vino se genera como principal residuo el orujo de uva, que se ha reutilizado tradicionalmente en diferentes procesos como en la obtención de licores mediante destilación, fertilizante, alimento para animales, obtención de compuestos de interés, como ingrediente nutritivo, producción de ácido cítrico, etc. El problema radica en que generalmente se trata de procesos de bajo rendimiento, de ahí que se disponga en áreas abiertas causando problemas medioambientales.

## 1.2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de la presente Tesis es el desarrollo de una nueva vía para el aprovechamiento del orujo de uva, utilizando una tecnología respetuosa con el Medio Ambiente. Concretamente, se quieren obtener mediante fermentación en estado sólido concentrados enzimáticos con alto contenido en enzimas hidrolíticas, concretamente exo-poligalacturonasa (exo-PG: un tipo de pectinasa), xilanas y celulasa, que puedan ser aprovechados por las bodegas e industrias de zumos en las etapas de clarificación y filtración.

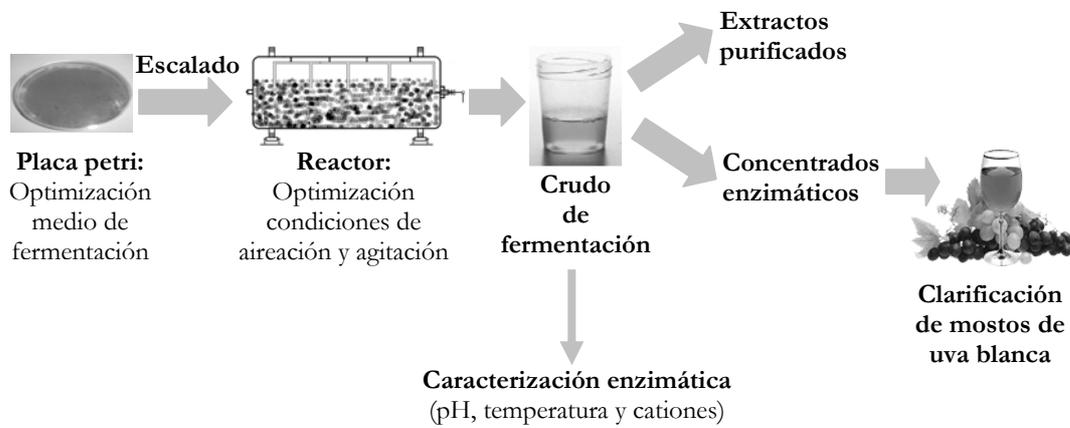
Para conseguir este objetivo general han de desarrollarse los siguientes objetivos más concretos:

- Evaluación, en placa petri, del orujo de uva como sustrato de fermentación para la producción enzimática y comparación de los resultados con los obtenidos tras fermentaciones llevadas a cabo enriqueciendo el medio de cultivo, ajustando su humedad inicial con una solución nutritiva o bien mezclándolo con otro residuo con mejores propiedades nutricionales.
- Estudiar la producción de xilanas, exo-PG y celulasa en diferentes configuraciones de reactor, en concreto, las tres comúnmente utilizadas en estado sólido (reactor de lecho fijo, tambor rotatorio y de bandejas) y en cultivo suspendido. El hecho de emplear modelos diferentes de reactor permitirá estudiar la conveniencia o no de agitar el sólido, el establecimiento de una velocidad óptima de aireación y la comparación de las productividades enzimáticas cuando se emplean distintas técnicas de cultivo (FES y FCS).

Para el desarrollo de las fermentaciones se utilizará el medio de cultivo que proporcione mejores resultados en placa petri.

- Seleccionar la configuración de reactor y las condiciones de operación más adecuadas para la producción de las enzimas objeto de estudio, de acuerdo con las productividades obtenidas y la facilidad de escalamiento.
- Estudiar, de cara a su posible aplicación industrial, la estabilidad del extracto enzimático frente a la temperatura, el pH y en presencia de cationes.
- Poner a punto una técnica de concentración de los extractos enzimáticos para facilitar su aplicación industrial.
- Estudiar la aplicabilidad de los extractos enzimáticos concentrados en la clarificación de mostos, comparándose su eficacia con la de otros preparados enzimáticos comerciales.
- Purificar parcialmente los extractos enzimáticos para una posible aplicación en procesos industriales que los requieran con un mayor grado de pureza.

A modo de esquema, en la figura 1.1 se muestran los objetivos a desarrollar en el presente trabajo.



*Figura 1.1: Esquema resumen de los objetivos desarrollados en la tesis.*

Con el trabajo que se propone se pretende mejorar la posición de la industria vitivinícola y de zumos en relación con su entorno. Para ello se quiere desarrollar un proceso de bajo impacto ambiental que utiliza como materia prima un residuo industrial.





# 2

## ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS



## 2.1. DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (FES)

### 2.1.1. Aspectos generales de la FES

La fermentación en estado sólido (FES) se basa en el crecimiento de microorganismos sobre soportes sólidos húmedos en ausencia de agua libre.<sup>1</sup> En este sistema, el agua está presente en el sustrato, cuya capacidad de retención de líquido varía según el tipo de material.<sup>2</sup>

La FES es una técnica que se ha utilizado tradicionalmente en países del Sudeste asiático, África y América central para la obtención de alimentos a partir de cereales, yuca, etc.

Típicos ejemplos de productos tradicionalmente obtenidos mediante FES son:<sup>3</sup>

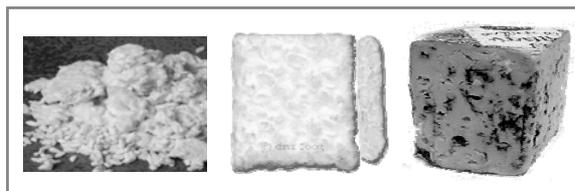
- El “koji” japonés, que utiliza arroz al vapor como sustrato sólido y *Aspergillus oryzae* como inóculo.
- El “tempeh” de Indonesia, que se obtiene por fermentación de la soja mediante el hongo *Rhizopus oryzae*.
- El “queso Roquefort”, obtenido por fermentación de queso fresco con *Penicillium roquefortii*.

---

<sup>1</sup> Pandey, A.; Soccol, C.; Rodríguez-Leon, J.; Nigam, P. (2001). Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. Asiatech Publishers, New Delhi.

<sup>2</sup> Graminha, E.; Gonçalves, R.; Pirota, R.; Balsalobre, M.; Da Silva, R.; Gomes, E. (2007). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, **144**, 1, 1-22.

<sup>3</sup> Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, **1**, 3.



**Figura 2.1: Fotos de koji, tempeh y queso Roquefort.**

La definición más general y reciente de la FES fue formulada por Viniegra-González y col. en 1997, quienes la describen como un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos con capacidad para absorber y contener agua, ya sea con o sin nutrientes solubles. Por este motivo, se trata de un proceso donde el sólido presenta una baja actividad del agua ( $a_w$ ), que influye en aspectos fisiológicos de los microorganismos como son el tipo de crecimiento, la esporulación y la germinación de esporas, además de la producción de metabolitos y enzimas y la actividad de las mismas.<sup>4</sup>

El agua presente en los sistemas de FES se encuentra en una forma compleja dentro de la matriz sólida como una fina capa, bien absorbida sobre la superficie de las partículas o con una interacción más débil en las regiones porosas del sólido.<sup>3</sup> El agua libre sólo aparece cuando se supera la capacidad de saturación de la matriz sólida.

Debido a la baja actividad del medio de cultivo en la FES, los hongos que en ella intervienen tienden a acumular en sus células polioles como glicerol, manitol, eritrol y arabitol. La composición de la mezcla de polioles depende de las condiciones de crecimiento y representa una adaptación a la baja humedad del medio en FES, necesaria para mantener la presión de turgencia de las células (presión que

---

<sup>4</sup> Hölker, U.; Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation-are there any biotechnological advantages?. *Current Opinion in Microbiology*, **8**, 3, 301-306.

proporciona rigidez a las células). El micelo excreta estas sustancias, que serán metabolitos que posteriormente se encuentran en el material fermentado.<sup>2,5,6</sup>

Otra clase de compuestos producidos en los cultivos de FES son los ácidos orgánicos. Así, por ejemplo, el hongo *Aspergillus niger* es un potente productor de ácido cítrico, cuya producción puede alcanzar 1g/kg de sustrato; *A. oryzae* produce ácido oxálico<sup>7,8</sup> y la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* produce ácido láctico.<sup>2,9</sup>

La FES es una técnica que está principalmente enfocada a la producción de alimentos, enzimas hidrolíticas, ácidos orgánicos, giberelinas, sabores y biopesticidas.<sup>3</sup> Generalmente, para la obtención de estos productos se utilizan como sustratos sólidos residuos agroindustriales,<sup>10</sup> lo que resulta de gran interés ya que, por un lado, se obtienen productos de interés industrial y, por otro, se resuelven problemas de deposición de residuos sólidos. De esta forma, sustratos de bajo coste como son los residuos de fruta y verdura, cortezas de árboles, cáscara de frutos secos, salvado de trigo, cáscara de café, bagazo de caña de azúcar, etc. pueden ser utilizados para la producción de etanol, enzimas, ácidos orgánicos, aminoácidos, metabolitos secundarios biológicamente activos, etc.

Además, mediante esta técnica se puede mejorar la calidad nutricional de alimentos como legumbres y cereales y mejorar las características sensoriales de otros ya que

---

<sup>5</sup> Hölker, U.; Höfer, M.; Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**, 175–186.

<sup>6</sup> Ruijter, G.; Visser, J.; Rinzema, A. (2004). Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. *Microbiology*, **150**, 1095–1101.

<sup>7</sup> Biesebeke, R.; Ruijter, G.; Rahardjo, Y.; Hoogschagen, M.; Heerikhuisen, M.; Levin, A.; Hondel, K.; Ronzema, A.; Punt, P. (2002). *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation. *Progress report on a multidisciplinary project. FEMS Yeast Research*, **2**, 245–248.

<sup>8</sup> Rodríguez, S.; Sanroman, M. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production—review. *Biochemical Engineering Journal*, **22**, 211–219.

<sup>9</sup> Rojan, P.; Nampoothiri, M.; Pandey, A. (2006). Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, **41**, 759–763.

<sup>10</sup> Pandey, A. (2003). Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 81–84.

durante el proceso se producen enzimas que, mediante hidrólisis, pueden disminuir o eliminar factores antinutricionales consiguiendo productos fermentados con mayor calidad nutricional.<sup>11</sup>

### 2.1.2. Historia y desarrollo de la FES

La fermentación en estado sólido es una técnica que ha sido utilizada desde la antigüedad principalmente en países del sudeste asiático, África y América Central. En la tabla 2.1 se expone de forma resumida la evolución histórica de la fermentación en estado sólido.<sup>12</sup>

Los procesos de fermentación en estado sólido fueron prácticamente ignorados en los países occidentales después del año 1940, debido a la adaptación de la tecnología de fermentación sumergida.<sup>10</sup> La producción de penicilina mediante fermentación en cultivo sumergido (FCS) y su enorme importancia durante la 2ª Guerra Mundial, hicieron que esta última tecnología se convirtiera en el modelo para la producción de cualquier compuesto vía fermentación. Por esta razón, investigadores de la época pusieron toda su atención en la fermentación en cultivo sumergido, desatendiendo a la fermentación en estado sólido.

---

<sup>11</sup> Cuevas-Rodríguez, E.; Verdugo-Montoya, N.; Angulo-Bejarano, P.; Milán-Carrillo, J.; Mora-Escobedo, R.; Bello-Pérez, L.; Garzón-Tiznado, Reyes-Moreno, C. (2005). Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays* L.). *Food science and technology*, **39**, 10, 1072-1079.

<sup>12</sup> Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **27**, 109–117.

Periodo	Desarrollo
2600 a.C	Producción de pan por los egipcios
Antes del nacimiento de Cristo	Producción de queso en Asia utilizando <i>Penicillium roqueforti</i>
2500 d.C	Fermentación de pescado/ conservación con azúcar, almidón, sales, etc. y obtención del koji
Siglo VII	Obtención de vinagre a partir de orujo
Siglo XVIII	Producción de ácido gálico que se utiliza en bronceado y en imprenta
1860–1900	Tratamiento de aguas residuales
1900–1920	Producción de enzimas fúngicas (principalmente amilasas)
1920–1940	Producción de otras enzimas fúngicas, ácido glucónico y ácido cítrico
1940–1950	Producción de penicilina
1950–1960	Transformación de esteroides por cultivos de hongos
1960–1980	Producción de micotoxinas, enriquecimiento de alimentos con proteínas
1980–presente	Producción de productos de alto valor añadido como alcohol y ácido giberélico

**Tabla 2.1: Evolución histórica de la fermentación en estado sólido.<sup>12</sup>**

La fermentación en estado sólido logró un hito importante durante 1960-1970, cuando se describió la producción de micotoxinas mediante esta técnica. Posteriormente, la utilización de residuos agroindustriales como sustrato para la obtención de proteínas enriquecidas para alimento de ganado, vislumbró el enorme potencial que esta técnica alternativa presentaba, al darle valor a residuos de bajo coste.

No es hasta finales de la década de los 70 cuando se promueve con fuerza el estudio científico de la FES con vistas a aprovechar sus ventajas económicas.<sup>13</sup> Desde entonces, ha habido un continuo desarrollo de esta técnica, acentuada en la última década. Actualmente, la FES ha sido aplicada en procesos industriales a gran escala, principalmente en Japón.<sup>3</sup> El tradicional koji, fabricado en pequeñas bandejas de madera y bambú, ha cambiado gradualmente a procesos más sofisticados en los que se emplean reactores de tambor rotatorio, bandejas con microprocesadores, etc.

Las aplicaciones más importantes que tiene esta técnica se explicarán de forma más detallada en el apartado 2.5 de este capítulo.

---

<sup>13</sup> Doelle, H.; Mitchel, D.; Rolz, C. (1992). *Solid Substrate Cultivation*. Elsevier Applied Science, **3**, 35. New York.

## **2.2. ASPECTOS BIOQUÍMICOS E INGENIERILES DE LA FES**

El estudio de parámetros como la temperatura, la aireación, la humedad, la agitación, el tamaño de partícula, el diseño del reactor, etc., es fundamental para el éxito de la FES debido a que de ellos va a depender tanto el crecimiento del microorganismo como la formación del producto final. Por este motivo, en el presente apartado se va a describir la influencia que cada uno de ellos tiene en el proceso.

### **2.2.1. Temperatura**

La temperatura es uno de los parámetros ambientales más influyentes en la velocidad de crecimiento de los microorganismos. De esta forma, existe una temperatura óptima en la que dicha velocidad es máxima y por encima de la cual la velocidad de crecimiento decae bruscamente produciéndose la muerte celular.

Según el rango de temperaturas al que pueden crecer los microorganismos se pueden establecer fundamentalmente tres grupos: psicrófilos o criófilos (temperatura mínima de crecimiento comprendida entre -5 y 5°C), mesófilos (temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 40°C y máxima entre 35 y 47°C) y termófilos (temperatura óptima entre 50 y 75°C y máxima comprendida entre 80 y 113°C). Por tanto, el diseño del reactor y, en particular los reactores de FES, debe tener en cuenta este rango óptimo.

Durante la fermentación en estado sólido se genera, además, una gran cantidad de calor que es directamente proporcional a la actividad metabólica de los microorganismos.<sup>10</sup> En los procesos aeróbicos la generación de calor se puede calcular conociendo la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> o la de consumo de O<sub>2</sub>. Así, por ejemplo, teniendo en cuenta que cada mol de CO<sub>2</sub> producido en la oxidación de

carbohidratos genera 673 kcal, se entiende que sea importante medir la evolución del CO<sub>2</sub> durante la fermentación, ya que puede relacionarse de manera directa con el aumento de la temperatura.<sup>3</sup>

La disipación de este calor puede estar limitada por su transmisión dentro o entre las partículas, o por la transferencia entre la superficie de la partícula y la fase gaseosa. Generalmente, los sustratos usados para la fermentación en estado sólido tienen bajas conductividades térmicas, lo que origina que la eliminación del calor sea un proceso muy lento, produciéndose gradientes de temperatura en el interior del sólido. Este hecho, junto con los bajos contenidos de humedad presentes en la FES, dificulta la transferencia de calor.<sup>10</sup>

En algunos casos, la temperatura del lecho puede llegar a aumentar 20°C por encima de la temperatura de fermentación. Aunque puede ser deseable en el caso del compostaje, de manera general es negativa para procesos biotecnológicos, afectando al crecimiento de los microorganismos, a la producción de esporas y a la germinación, o incluso provocar la desnaturalización de los productos formados.<sup>4</sup>

Probablemente, la eliminación de calor es uno de los principales problemas en los procesos de FES a gran escala. La implementación de sistemas de convección forzada o de enfriado pueden no ser suficientes para disipar el calor metabólico generado, produciéndose importantes gradientes de temperaturas. Únicamente, los sistemas de enfriamiento por evaporación poseen suficiente capacidad de eliminación de calor, ya que la evaporación del agua es el proceso más eficaz para controlar la temperatura.<sup>3</sup> Sin embargo, esto requiere altas tasas de aireación para compensar la producción de calor asociada a la creciente actividad metabólica.<sup>14</sup> El agua eliminada

---

<sup>14</sup> Viesturs, U.; Aspite, A.; Laukevies, J.; Ose, V.; Bekers, M. (1981). Solid state fermentation of wheat straw with *Chaeromium cellulolyticum* and *Trichoderma lignorum*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, **11**, 359–369.

por evaporación tiene que ser, en muchos casos, repuesta, lo cual produce un aumento local de la actividad del agua que no es deseable en procesos estáticos. En procesos semiestériles, este aumento de la actividad del agua puede provocar efectos adversos como facilitar el crecimiento de bacterias contaminantes.

### 2.2.2. Aireación

La aireación tiene diferentes funciones en la FES: la oxigenación de los microorganismos, la eliminación del CO<sub>2</sub> generado durante la fermentación, la disipación del calor (regulando la temperatura del medio), la distribución del vapor de agua (regulando la humedad) y la distribución de los compuestos volátiles producidos durante el metabolismo.<sup>2</sup> La tasa de aireación depende de la porosidad del medio, debiéndose optimizar los parámetros de presión parcial de oxígeno ( $pO_2$ ) y presión parcial de dióxido de carbono ( $pCO_2$ ) para cada tipo de sustrato, microorganismo y proceso.<sup>2,15</sup>

Así pues, la aireación es un parámetro muy importante en la FES, ya que el ambiente gaseoso puede afectar significativamente a los niveles relativos de biomasa y a la producción enzimática.<sup>3</sup> Como ejemplo se puede citar el estudio llevado a cabo por Yovita y col., que consistió en analizar el crecimiento del hongo *Aspergillus oryzae* y la producción de  $\alpha$ -amilasa a bajas concentraciones de oxígeno en un sistema de fermentación en estado sólido.<sup>16</sup> Determinaron que con un 0,25% de oxígeno en el medio no se alteraba el crecimiento individual de las hifas del hongo. Sin embargo, se observó una reducción de la tasa específica total de crecimiento como consecuencia

---

<sup>15</sup> Chahal, D. (1987). Growth characteristics in solid state fermentation for upgrading of protein values of lignocelluloses and cellulases production. *American Chemical Society Symposium Series*, **207**, 421–442.

<sup>16</sup> Rahardjo, Y.; Sie, S.; Weber, F.; Tramper, J.; Rinzema, A. (2005). Effect of low oxygen concentrations on growth and  $\alpha$ -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. *Biomolecular Engineering*, **21**, 163–172.

de la disminución de la frecuencia de ramificación de las hifas y una menor producción de  $\alpha$ -amilasa.

### 2.2.3. Humedad

El contenido en humedad del lecho es un factor crítico de los procesos en FES, ya que esta variable influye muy significativamente en el crecimiento microbiano, en la biosíntesis y secreción de diferentes metabolitos.<sup>17,18,19</sup> De esta forma, un bajo contenido en humedad dificulta la accesibilidad de los nutrientes del sustrato resultando un pobre crecimiento microbiano. Por otra parte, altos niveles de humedad provocan la disminución de la porosidad del sustrato, lo que dificulta la difusión de los nutrientes. Además, en estas condiciones se puede producir un impedimento estérico provocado por el crecimiento excesivo del hongo reduciendo la porosidad de la matriz sólida, lo cual dificultaría la transferencia de oxígeno.

Por este motivo, es conveniente buscar el nivel óptimo de humedad con objeto de optimizar el crecimiento del microorganismo o, en su caso, obtener una mayor producción de metabolitos (enzimas, ácidos orgánicos, etc.).

El contenido óptimo de humedad para el crecimiento de los hongos sobre sustratos sólidos en la FES se encuentra entre el 40 y el 70%, pero depende del microorganismo y el sólido utilizado para cada cultivo. Por ejemplo, el crecimiento de *Aspergillus niger* sobre sustratos de almidón como la casava y el salvado de trigo es

---

<sup>17</sup> Mamma, D.; Kourtoglou, E.; Christakopoulos, P. (2008). Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, **99**, 7, 2373-2383

<sup>18</sup> Krishna, C.; Chandrasekaran, M. (1996). Banana waste as substrate for  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid state fermentation. *Applied and Microbial Biotechnology*, **46**, 106–111.

<sup>19</sup> Ellaiah, P.; Adinarayana, Y.; Bhavani, P.; Padmaja, B.; Srinivasulu. (2002). Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochemistry*, **38**, 615–620.

óptimo a niveles de humedad considerablemente más bajos que sobre pulpa de café o bagazo de caña de azúcar, lo cual podría deberse a la gran capacidad de estos últimos sustratos de retener agua.<sup>3,20</sup>

Como se comentó en el apartado 2.1.1, en la FES el agua libre únicamente aparece cuando se supera la capacidad de saturación de la matriz sólida. Sin embargo, el nivel de humedad a partir del cual aparece agua libre varía considerablemente según el sustrato, encontrándose ejemplos desde un nivel bajo como en la corteza de arce (40%) o en el arroz y la casava (50-55%),<sup>3,20</sup> o altos como en la mayoría de los sustratos lignocelulósicos (80%).<sup>3,21</sup>

#### 2.2.4. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula también es un factor importante a tener en cuenta. Sustratos de partículas pequeñas proporcionan una gran área específica, lo que afecta de manera positiva al desarrollo del microorganismo.<sup>22</sup> Sin embargo, un tamaño de partícula demasiado pequeño, que genere a su vez un espacio interpartícula reducido, disminuye la eficiencia de la respiración/aireación dificultando el crecimiento microbiano. Debido a esto es necesario alcanzar un compromiso para el tamaño de partícula según el proceso del que se trate.

Kumar y col. estudiaron la influencia del tamaño de partícula del sustrato en la producción de ácido cítrico a partir de bagazo de caña de azúcar utilizando el hongo *Aspergillus niger*. Los tamaños de partículas evaluados se encontraban en un rango

---

<sup>20</sup> Oriol, E.; Raimbault, M.; Roussos, S.; Viniestra-Gonzales, G. (1988). Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **27**, 498-503.

<sup>21</sup> Moo-Young, M.; Moriera, A.; Tengerdy, R. (1983). Principles of solid state fermentation in the filamentous fungi. *Fungal Biotechnology*. Edward Arnold Publishers, London, **4**, 117-144.

<sup>22</sup> Pandey, A.; Soccol, C.; Mitchell, M. (2000). New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, **35**, 1153-1169.

comprendido entre 0,64 y 2 mm.<sup>23</sup> Los resultados del estudio determinaron que la máxima producción se obtenía cuando se utilizaban partículas de 1,2-1,6 mm, mientras que los valores más bajos se analizaban con partículas de 1,6-2 mm. Esto podría deberse a que las partículas de tamaño medio utilizadas presentaban mayor porosidad, lo que provoca una mejor transferencia de calor y materia aumentando la producción de ácido cítrico. Como ya se ha comentado, las partículas de mayor tamaño disponían de una menor superficie específica para el crecimiento del hongo, obteniéndose concentraciones de producto más bajas. Del mismo modo, cuando el sustrato tenía el tamaño de partícula menor se impedía la transferencia de calor y materia, determinándose bajas concentraciones de ácido cítrico.

### 2.2.5. pH

El rango de pH óptimo para el desarrollo de los microorganismos se encuentra próximo a la neutralidad, generalmente entre 5 y 8, aunque la mayor parte de los hongos están adaptados a un rango más amplio de pH. Sin embargo, para la mayoría de ellos alteraciones bruscas del pH del medio podrían tener efectos adversos sobre el microorganismo, afectando a la membrana y al transporte de solutos, inhibiendo la actividad de las enzimas, etc. Por este motivo, es muy importante controlar este parámetro durante la fermentación.

Como consecuencia del crecimiento microbiano y la actividad metabólica se puede producir un cambio en el balance de los protones y, por tanto, en el pH del medio de cultivo. La razón más obvia para esta variación es la secreción por el microorganismo de ácidos orgánicos como son el ácido cítrico, acético o láctico, los cuales podrían disminuir el pH del medio, tal y como ocurriría con el consumo de las sales de

---

<sup>23</sup> Kumar, D.; Jain, V.; Shanker, G.; Srivastava, A. (2003). Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochemistry*, **38**, 12, 1731-1738.

amonio.<sup>3</sup> Por otro lado, la asimilación de ácidos orgánicos, los cuales pueden estar presentes en ciertos medios, podría producir un aumento del pH, al igual que sucedería con la hidrólisis de la urea.

La cinética de variación del pH está muy relacionada con el microorganismo utilizado. De esta manera se ha observado cómo para especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus*, el pH suele caer rápidamente hasta un valor de 3. Sin embargo, para otros tipos de hongos de las especies de *Trichoderma*, *Sporotrichum* y *Pleurotus*, el pH se estabiliza entre 4 y 5. La naturaleza del sustrato también tiene gran influencia en la cinética del pH, aunque los materiales lignocelulósicos, que son los que normalmente se utilizan en la FES, presentan efectos tamponantes por su compleja composición.<sup>17</sup>

La medida y el control del pH durante todo el proceso de fermentación se hacen necesarios para evitar alcanzar valores donde puede llegar a producirse la muerte del microorganismo. Además, el control del pH permite reducir o eliminar los riesgos de contaminación bacteriana en fermentaciones en estado sólido de hongos y levaduras.<sup>3</sup>

### 2.2.6. Agitación

La agitación y la rotación se utilizan en FES normalmente con dos fines; establecer un contacto homogéneo entre las partículas y el aire y, por otro lado, acelerar la transferencia de calor y materia.<sup>24,25,26,27</sup>

---

<sup>24</sup> Fujian, X.; Hongzhang, C.; Zuohu, L. (2002). Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **30**, 1, 45–48.

<sup>25</sup> Fernandez, M.; Perez-Correa, J.R.; Solar, I.; Agosin, E. (1996). Automation of a solid-state substrate cultivation pilot reactor. *Bioprocess Engineering*, **16**, 1–4.

<sup>26</sup> De Reu, J.; Zwietering, M.; Rombouts, F.; Nout, M. (1993). Temperature control in solid substrate fermentation through discontinuous rotation. *Applied Microbiology Biotechnology*, **40**, 261–265.

<sup>27</sup> Rathbun, B.; Shuler, M. (1983). Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentations: design of fermentation chambers. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 929–938.

Los procesos de aireación y agitación convierten la difusión molecular de la fase gaseosa en una difusión convectiva. Sin embargo, en contrapartida, plantean inconvenientes como daños ocasionados al micelio, reducción de la porosidad de los sustratos o posibles desnaturalizaciones de las enzimas producidas.<sup>25,28,29,30</sup>

Con algunos sustratos (como el heno) ocurre que, cuando las partículas de sólido están húmedas se agrupan de forma que las partes internas no se ven afectadas por la agitación, siendo muy limitada la efectividad del proceso.

### 2.2.7. Diseño del reactor

Un aspecto muy importante de la fermentación en estado sólido es la búsqueda del diseño más conveniente de biorreactor para solventar problemas como la transferencia de calor y materia. Es muy importante que el diseño del reactor sea tal que haga posible mantener constantes la temperatura y el contenido en humedad del sólido simultáneamente, lo cual resulta complicado en procesos de gran escala.<sup>3</sup>

Los distintos tipos de reactor de FES existentes se explicarán de forma más detallada en el Capítulo 4. A modo de introducción, decir que de entre los tipos de fermentadores más utilizados se encuentran los de bandeja y los de tambor rotatorio.

---

<sup>28</sup> Oostra, J.; Tramper, J.; Rinzema, A. (2000). Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 652–663.

<sup>29</sup> Ramesh, M.; Lonsane, B. (1990). Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus Licheniformis* in a solid-state fermentation system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **33**, 501–505.

<sup>30</sup> Elibol, M.; Moreira, A. (2005). Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, **40**, 5, 1951-1956.

Sin embargo, en la actualidad los fermentadores de lecho fijo han cobrado gran importancia, ya que se tratan de sistemas prácticos, sencillos y económicos.<sup>31</sup>

Los *reactores de bandeja* consisten en una cámara, con control de temperatura y humedad relativa, en la que el aire circula a través de una serie de bandejas que contienen una fina capa de sustrato.<sup>32</sup> En este sistema, en el caso de necesitarse la mezcla del medio, esta suele llevarse a cabo de manera manual y, en general, una sola vez al día. Esta configuración de reactor es la más tradicional y no ha presentado avances significativos en la última década.

En los *reactores de tambor rotatorio* se produce la rotación del medio de fermentación de manera continua o intermitente. Si la agitación es intermitente, se comportan como los biorreactores de bandeja durante el periodo estático y como los de agitación continua durante el periodo de rotación. Este tipo de rotación intermitente es potencialmente menos dañina para el micelio del hongo que la rotación continua.

Los *reactores de lecho fijo* están constituidos por un lecho estático soportado sobre un plato perforado a través del cual se bombea aire. Son los biorreactores sin agitación más utilizados debido a que la aireación forzada permite controlar más fácilmente las condiciones ambientales del lecho mediante la manipulación de la temperatura y del caudal del aire de entrada.<sup>33</sup>

---

<sup>31</sup> Pandey, A. (2002). Solid-state fermentation. Biotechnology Division, Regional Research Laboratory, Council of Scientific and Industrial Research, Trivandrum, 695, 019.

<sup>32</sup> Mitchell, D.; Krieger, N.; Stuart, D.; Pandey, A. (2000). New developments in solid-state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, **35**, 1211–1225.

<sup>33</sup> Bhargav, S.; Panda, B.; Ali, M.; Javed, S. (2008). Solid-state fermentation: An overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, **22**, 1, 49-70.



### 2.3. DIFERENCIAS ENTRE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (FES) Y FERMENTACIÓN EN CULTIVO SUMERGIDO (FCS)

La fermentación en estado sólido es una técnica que transcurre en ausencia o casi ausencia de agua entre partículas.<sup>2</sup> Sin embargo, en la fermentación en cultivo sumergido (FCS), tanto los nutrientes como los microorganismos se encuentran distribuidos homogéneamente en agua.<sup>34</sup>

En toda fermentación el crecimiento microbiano y el metabolismo normalmente ocurren en contacto con la fase acuosa, en la cual se produce la difusión del soluto y/o los sustratos. Por otra parte, el intercambio de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> puede ocurrir en la fase líquida o la gaseosa. En la FES, la fase líquida representa una fina película acuosa que rodea las partículas mientras que la fase gaseosa ocupa el espacio entre partículas. Aunque la sustitución de la fase líquida por la gaseosa mejora la transferencia de oxígeno, puede dificultar la difusión de solutos y sustratos e interferir considerablemente en el crecimiento microbiano.<sup>2,35</sup> Las tres fases (sólida, líquida y gaseosa) están presentes tanto en la FES como en la FCS pero no en la misma proporción; esto implica que aparezcan diferencias en las características cinéticas, reológicas y termodinámicas de ambas (actividad del agua, presión osmótica, etc.). Además, en los procesos en estado sólido, la proporción de cada fase depende del tipo de sustrato utilizado.

En la tabla 2.2 se presentan de forma simplificada las principales diferencias entre ambas técnicas.<sup>3</sup>

---

<sup>34</sup> Grigelmo-Migeul, N.; Martin-Belloso, O. (1999). Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. *Food research international*, **31**, 355-361.

<sup>35</sup> Gervais, P.; Marrchal, P.; Molin, P. (1996). Water relations of solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**, 343-357.

Factor	Fermentación en cultivo sumergido	Fermentación en estado sólido
Sustrato	Sustrato soluble (azúcares)	Polímeros insolubles
Agua	Alto consumo de agua	Consumo limitado de agua
Calor metabólico	Fácil eliminación del calor	Baja capacidad de transferencia de calor
Aireación	Limitación de oxígeno soluble Se requieren grandes niveles de aire	Fácil aireación y alta superficie de intercambio aire/sustrato
Control de pH	Fácil control de pH	Sustratos sólidos tamponados
Agitación mecánica	Buena homogeneización	Preferible condiciones estáticas
Escala	Equipación industrial disponible	Necesidad de diseño de equipos
Inoculación	Sencilla	Inoculación con esporas
Modo de operación	Proceso continuo	Proceso discontinuo (Batch)
Contaminación	Riesgo de contaminación por bacterias	Bajo riesgo de contaminación por hongos
Consideraciones energéticas	Alto consumo de energía	Bajo consumo de energía
Volumen equipo	Volúmenes grandes y tecnología de alto coste	Volúmenes pequeños y bajo coste del equipo
Efluentes y contaminación	Grandes volúmenes de efluentes contaminantes	No se generan efluentes, menos polución
Concentración de sustratos y productos	30-80 g/l	100-300 g/l

**Tabla 2.2: Cuadro comparativo entre FCS y FES.**

La principal diferencia que existe entre la FES y la FCS es que en la última, la mezcla entre los componentes del proceso (microorganismos, nutrientes y metabolitos) es homogénea y está uniformemente distribuida en el fermentador. Esta mezcla perfecta previene la formación de capas diferenciadas alrededor de las células microbianas que limitan la difusión de nutrientes, metabolitos e intercambio gaseoso, afectando al crecimiento. A diferencia de esto, el medio sólido en la FES es mucho más heterogéneo en relación al crecimiento microbiano y a la concentración de soluto.<sup>2,36</sup> Para paliar, en parte, esta heterogeneidad se recomienda el uso de un sistema de mezcla y aireación forzada para eliminar el CO<sub>2</sub>, disipar el calor y distribuir la humedad de forma más homogénea.<sup>2,37</sup>

En cualquier caso, la fermentación en estado sólido presenta varias desventajas que desalentaron tradicionalmente su uso a escala industrial. Debido precisamente a esta heterogeneidad, en la FES se producen diferencias de gradientes de temperatura, pH, humedad, concentración de sustrato o presión parcial de oxígeno durante el cultivo, siendo difícil el control de estas variables cuando se trabaja por debajo de las disponibilidades límite de agua. Pero por encima de todo lo anterior, el principal obstáculo a la utilización de esta técnica a escala industrial ha sido la falta de conocimientos sobre algunos aspectos clave del proceso y la escasez de fermentadores adecuados.<sup>22</sup> Aun así, la fermentación en estado sólido ha adquirido un gran auge durante los últimos años debido a las ventajas que, como veremos a continuación, presenta frente a la fermentación en cultivo sumergido y a su gran potencial en la manufactura de diversos productos.<sup>5</sup>

La primera ventaja observable experimentalmente es que la fermentación en estado sólido es el mejor método para obtener esporas fúngicas a partir de hifas aéreas.<sup>4,5</sup>

---

<sup>36</sup> Griffin, D. (1981). Water and microbial stress. *Advances in Microbial Ecology*, **5**, 91–136.

<sup>37</sup> Gervais, P.; Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 85–101.

Las propiedades de las esporas producidas mediante esta técnica difieren significativamente de las obtenidas mediante fermentación en cultivo sumergido. Son más estables, más resistentes a la deshidratación y presentan una tasa de germinación mayor después de ser congeladas. Esto puede deberse a su mayor hidrofobicidad, mayor rigidez de la pared celular y menor volumen de las conidiosporas obtenidas en los cultivos de FES.<sup>2,38,39</sup>

Las esporas fúngicas usadas como agentes de biocontrol contra patógenos fúngicos de plantas, como por ejemplo *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, etc., son producidas preferentemente mediante FES porque presentan una calidad superior.<sup>40,41</sup>

Sin embargo, han sido otras ventajas de índole productivo las que pueden explicar el despegue de esta técnica: producción de mayor masa celular en menor tiempo, similitud con el habitat natural de los hongos filamentosos (lo cual permite usar microorganismos no modificados genéticamente que generalmente dan mejores resultados y son biológicamente más seguros), obtención de mayores concentraciones de producto, simplificación de los post-tratamientos, disminución de los efluentes contaminantes, disminución general del coste del proceso, etc.<sup>2,42,43</sup>

---

<sup>38</sup> Pascual, S.; De Cal, A.; Magan, N.; Melgarejo, P. (2000). Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged cultures. *Journal of Applied Microbiology*, **89**, 847–853.

<sup>39</sup> Munoz, G.; Agosin, E.; Cotoras, M.; San Marin, R.; Volpe, D. (1995). Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, **125**, 63–70.

<sup>40</sup> Deshpande, M. (1999). Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. *CRC Microbiology*, **25**, 229–243.

<sup>41</sup> Tengerdy, R.; Szakacs, G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 169–179.

<sup>42</sup> Robinson, T.; Singh, D.; Nigam, P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**, 284–289.

<sup>43</sup> Saiz-Jimenez, C. (1995). Microbial melanin in stone monuments. *Science of the Total Environment*, **167**, 273–286.

En el caso concreto de la producción de enzimas mediante FES se consiguen mayores rendimientos de producción y se obtienen en mayores concentraciones y con alta especificidad.<sup>22,44</sup> Así, por ejemplo, la producción de poligalacturonasa y pectinilasa por *A. niger* es 5 y 1,3 veces superior en FES que en FCS, respectivamente.<sup>45</sup> Solis-Pereyra y col. compararon la producción de endo-poligalacturonasa y exo-poligalacturonasa utilizando el hongo *A. niger* por ambas técnicas, obteniendo mayor producción de las dos enzimas mediante FES.<sup>46</sup> Además, el tiempo requerido para la síntesis era menor en FES y su producción se estimulaba cuando el sustrato contenía una elevada concentración de azúcares, mientras que en la FCS en estas condiciones la producción disminuía por represión catabólica.

Otro ejemplo ilustrativo que aparece en la bibliografía es la producción de invertasa mediante *A. niger*. En este caso, el hongo crece de forma más eficaz y produce más enzima en FES que en FCS cuando los niveles de sacarosa son elevados. Estos estudios sugirieron que altos niveles de azúcares evitan la desnaturalización de la enzima en FES.<sup>47</sup> Al contrario que ocurre con la invertasa, la producción de pectinasa es superior en FCS siempre y cuando la cantidad de sacarosa no sea alta; este hecho es indicativo de que la producción enzimática es más sensible a represión catabólica en FCS.<sup>3,48,49</sup> Un comportamiento análogo se ha observado en la obtención de amilasa

---

<sup>44</sup> Aguilar, C.; Contreras-Esquivel, J.; Rodríguez, R.; Prado, L.; Loera, O. (2004). Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures. *Food Science and Biotechnology*, **13**, 109–113.

<sup>45</sup> Tagarano, V.; Pilosof, A. (1999). Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme Microbiology and Technology*, **25**, 411–419.

<sup>46</sup> Solis-Pereyra, S.; Favela-Torres, E.; Gutierrez-Rojas, M.; Roussos, S.; Saucedo-Castaneda, G.; Gunasekaran, P.; Viniestra-Gonzales, G. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinases by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **39**, 36–41.

<sup>47</sup> Viniestra-Gonzalez, G.; Favela-Torres, E.; Aguilar, C.; Romero-Gómez, S.; Diaz-Godínez, G.; Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 157–167.

<sup>48</sup> Nandakumar, M.; Thakur, M.; Raghavarao, K.; Ghildyal, N. (1999). Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. *Letters in Applied Microbiology*, **29**, 380–384.

microbiana en cultivo sumergido cuando hay glucosa presente en el medio.<sup>48,50,51,52</sup> Esta capacidad de la FES de minimizar significativamente la represión catabólica en la producción de diferentes enzimas hidrolíticas ha sido ampliamente descrita.<sup>53,54,55,56</sup>

Las propiedades intrínsecas de las proteínas microbianas extracelulares como la termoestabilidad, la estabilidad a distintos pH y la afinidad por el sustrato, también están influenciadas por el tipo de proceso fermentativo utilizado para su producción.<sup>57</sup> Acuña-Argüelles y col. compararon las propiedades de las enzimas endo y exo-poligalacturonasa producidas por *A. niger* en FES y FCS. La estabilidad enzimática a diferentes pH y temperaturas y la afinidad de sustrato eran diferentes según las condiciones del cultivo. Cuando se incubaban a 60°C durante 30 minutos, la endo y la exo-poligalacturonasa producidas por FES mantenían el 90 y el 70% de su actividad inicial mientras que mediante FCS mantenían sólo el 40%. La endo-poligalacturonasa resultó ser estable en un rango de pH más amplio (entre 2,6 y 6,0) cuando se obtenía mediante FES que cuando se producía mediante FCS (6-7), de igual manera que ocurría para la exo-poligalacturonasa (estable entre 3,5 y 5,0 cuando

---

<sup>49</sup> Rahardjo, Y.; Tramper, J.; Rinzema, A. (2006). Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnology Advanced*, **24**, 161–179.

<sup>50</sup> Murygina, V. (1988). Regulation of alpha-amylase biosynthesis in *Bacillus diastaticus* mutants with various levels of enzyme synthesis. *Mikrobiologiya*, **57**, 734-739.

<sup>51</sup> Ray, R.; Jana, S.; Nanda, G. (1996). Induction and catabolite repression in the biosynthesis of  $\beta$ -amylase by *Bacillus megaterium* B6. *Biochemistry and Molecular Biology Journals*, **38**, 223-230.

<sup>52</sup> Sadhukhan, R.; Roy, S.; Raha, S.; Manna, S.; Chakrabarty, S. (1992). Induction and regulation of  $\alpha$ -amylase synthesis in a cellulolytic thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* D14 (ATCC 48104). *Indian Journal of Experimental Biology*, **30**, 482-486.

<sup>53</sup> Babu, K.; Satyanarayana, T. (1995).  $\alpha$ -amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **30**, 305-309.

<sup>54</sup> Gessesse, A.; Mamo, G. (1999). High-level xylanase production by an alkaliphic *Bacillus* sp. using solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**, 68-72.

<sup>55</sup> Ramesh, M.; Lonsane, B. (1991). Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **35**, 591-593.

<sup>56</sup> Siqueira, E.; Mizuta, K.; Giglio, J. (1997). *Pycnoporus sanguineus*: a novel source of alpha-amylase. *Mycological Research*, **101**, 188-190.

<sup>57</sup> Alazard, D.; Raimbault, M. (1981). Comparative study of amyolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **12**, 113–117.

era producida mediante FES y mediante FCS sólo entre 4,0 y 5,0). Además se observó que la endo-poligalacturonasa producida mediante FES tenía gran afinidad por el sustrato, aunque no se observó esta diferencia para el caso de la exo-poligalacturonasa.<sup>58</sup>

Realmente no hay una escala establecida o método validado para comparar los rendimientos entre la fermentación en estado sólido y en cultivo sumergido, aunque si se han realizado estudios para evaluarlos.<sup>10</sup> Así, Viniestra-González y col.<sup>47</sup> compararon los resultados obtenidos en la producción de tres enzimas fúngicas mediante FES y FCS. Afirmaron que los mejores rendimientos encontrados para la FES se debían a que funciona como un cultivo discontinuo alimentado con una rápida oxigenación y a que se trata de un proceso estático sin gastos de energía mecánica.

Sin embargo, la razón exacta para poder explicar las altas productividades generalmente obtenidas en la FES frente al cultivo sumergido no se conoce con precisión. La razón lógica dada es que las condiciones de la FES reproducen el hábitat natural de los microorganismos. El agua libre no parece ser el entorno natural para la mayoría de los microorganismos,<sup>5</sup> ni siquiera para los marinos, donde más del 98% de los aislados han sido obtenidos del agua que rodea la superficie de los sustratos sólidos.

Desde el punto de vista económico, Castilho y col.<sup>59</sup> realizaron un análisis comparativo entre ambas técnicas en el proceso de producción de lipasas mediante

---

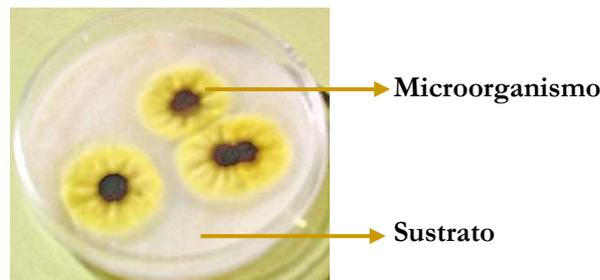
<sup>58</sup> Acuna-Argüelles, M.; Gutierrez-Rojas, M.; Viniestra-González, G.; Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**, 808–814.

<sup>59</sup> Castilho, L.; Polato, C.; Baruque, E.; Sant'Anna, G.; Freire, D. (2000). Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, **4**, 239–247.

*Penicillium restrictum*. Encontraron que, para una planta que producía 100 m<sup>3</sup> de lipasa concentrada por año, el proceso de FCS necesitaba una inversión de capital superior en un 78% a la de FES y sus productos tenían un coste superior en un 68% al precio del producto en el mercado. De las ventajas de tipo operativo condensadas en la tabla 2.2 puede evidenciarse el porqué de estos reducidos costes.

## 2.4. COMPONENTES DE LA FES

Los principales componentes de la fermentación en estado sólido son el microorganismo, ser vivo que lleva a cabo el proceso, y el sustrato, medio sobre el cual se va a desarrollar el proceso fermentativo.



*Figura 2.2: Componentes de la FES.*

### 2.4.1. Microorganismo

De los tipos de microorganismos empleados en la fermentación en estado sólido, los hongos filamentosos han sido los más utilizados (50%), seguidos de las levaduras (30%), los actinomicetos (15%) y las bacterias (5%).<sup>60</sup> Posiblemente esto se deba a que los hongos son los más eficaces ya que penetran en el sólido, al contrario que las levaduras y las bacterias que únicamente crecen en la superficie.<sup>12</sup> Dentro de los usos de las levaduras se encuentran la producción de etanol y alimentos,<sup>3,61,62</sup> mientras que las bacterias están involucradas generalmente en el compostaje, en el ensilado y en algunos procesos alimentarios.<sup>3,13</sup>

<sup>60</sup> Gutiérrez-Rojas, M.; Richard, A.; Jean Claude, B.; Sergio, R. (1995). A mathematical model for solid state fermentation of mycelial fungi on inert support. *Chemical Engineering Journal*, **60**, 189-198.

<sup>61</sup> Saucedo-Castañeda, G.; Lonsane, B.; Navarro, J.; Roussos, S.; Raimbault, M. (1992). Potential of using a simple fermenter for biomass built up, starch hydrolysis and ethanol production: Solid state fermentation system involving *Schwanniomyces castellii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **36**, 47-61.

<sup>62</sup> Saucedo-Castañeda, G.; Lonsane, B.; Krishnaiah, M.; Navarro, J.; Roussos, S.; Raimbault, M. (1992). Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system. *Process Biochemistry*, **27**, 97-107.

Los hongos, microorganismos eucariotas heterótrofos, tienen muchas aplicaciones a nivel industrial. Las tecnologías tradicionales los emplean en la producción de alimentos, como el queso roquefort, el tempeh, el koji, el sake, etc., en la potenciación del aroma de los mismos, en la producción de compuestos obtenidos de su metabolismo como el ácido cítrico y de antibióticos como la penicilina, etc.<sup>63</sup>

Los hongos están considerados generalmente quimioheterótrofos estrictos. Son incapaces de realizar la fotosíntesis y, por consiguiente, necesitan sustratos altamente energéticos para alcanzar sus requerimientos de energía y biomasa.<sup>64</sup> Producen una gran cantidad de enzimas, principalmente oxidasas e hidrolasas y pueden utilizar la mayor parte de los sustratos orgánicos que existen en la naturaleza, incluyendo la celulosa, la quitina, el almidón, azúcares, hemicelulosas y lignina. Normalmente los carbohidratos son las principales fuentes de carbono accesibles a los hongos; son metabolizados para proporcionar energía y actúan como precursores para la síntesis de material celular.<sup>65</sup> Utilizan nitrógeno fundamentalmente en forma de amonio, aunque casi todos pueden usar nitrato.<sup>66</sup>

Los hongos filamentosos, que se caracterizan por su crecimiento mediante hifas, son los microorganismos más eficientes y competitivos en sustratos sólidos por su gran potencial de excreción de enzimas hidrolíticas, su gran tolerancia a baja actividad del agua y su resistencia a condiciones de alta presión osmótica.<sup>60</sup> La gran ventaja del crecimiento mediante hifas es que resulta más fácil la colonización de los sustratos sólidos y la utilización de los nutrientes disponibles. El crecimiento mediante hifas da a los hongos filamentosos el poder de penetrar en el sustrato sólido. La estructura de

---

<sup>63</sup> Eveleigh, D. (1981). The microbial production of industrial chemicals. *Scientific American*, **245**, 155-178.

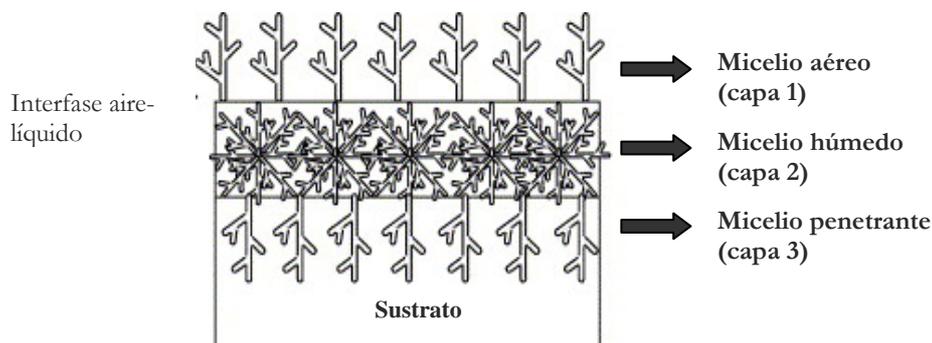
<sup>64</sup> Berry, D. (1988). *Physiology of Industrial Fungi*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

<sup>65</sup> Gadd, G. (1988). Carbon nutrition and metabolism, in *Physiology of Industrial Fungi*. Berry, D.R. (Ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 21-57.

<sup>66</sup> Wainwright, M. (1995). *Introducción a la Biotecnología de los hongos*. Editorial Acribia, UK.

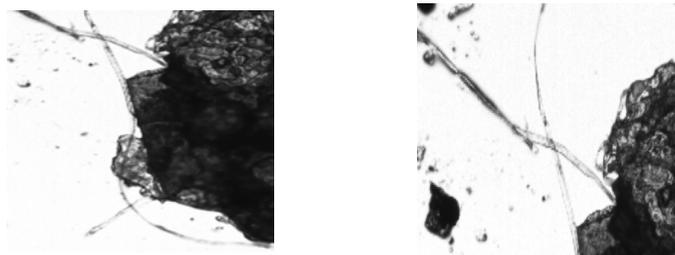
la pared celular conectada con las terminaciones y las ramas del micelio asegura una firme y sólida estructura.

Las hifas del hongo forman una red porosa tridimensional que se conoce como micelio. El hongo se dispone en diferentes capas sobre el sustrato sólido: micelio aéreo (capa 1), micelio húmedo (capa 2) y micelio penetrante (capa 3).<sup>49</sup>



**Figura 2.3: Diferentes capas del hongo filamentoso en el sustrato sólido.**

La velocidad de penetración de las hifas en el sustrato depende de si hay oxígeno disponible en el medio. Así, a medida que se produce el crecimiento del hongo, la capa 1 se hace tan densa que empieza a transformarse en la capa 2, que se caracteriza por tener sus poros llenos de agua. Posteriormente, debido a que el hongo sigue creciendo, se produce el aumento de la densidad de la capa 2 y su ensanchamiento, tanto que su parte inferior se vuelve anaerobia. Esto hace que el oxígeno no pueda acceder a la matriz sólida del sustrato. Bajo condiciones anaerobias, el micelio en las capas 2 y 3 detiene su crecimiento y comienza a fermentar.



**Figura 2.4: Imágenes al microscopio óptico (objetivo de 40 aumentos) de las hifas de *Aspergillus awamori* penetrando en el orujo de uva.**

Para poder acceder al sustrato los hongos establecen un estrecho contacto entre las hifas y la superficie del sustrato, lo que posibilita que los nutrientes puedan entrar en el micelio a través de la membrana celular para promover la biosíntesis y la actividad metabólica del hongo. Este excreta las enzimas hidrolíticas a través de las terminaciones de las hifas, sin una gran dilución como ocurre en la fermentación en cultivo sumergido, lo cual hace que su acción sea muy eficiente.

La mayor parte de los hongos filamentosos que son importantes en biotecnología son miembros de los *Denteromicetos* (u hongos imperfectos) perteneciendo a este grupo los del género *Aspergillus*. Los *Aspergillus* son miembros ubicuos de la micoflora del aire y por ello se encuentran frecuentemente como contaminantes de los medios de cultivo. Las especies de *Aspergillus* producen numerosas enzimas exocelulares, muchas de las cuales se utilizan en biotecnología.<sup>66</sup> De esta forma, los preparados comerciales de enzimas pectinolíticas proceden frecuentemente de *A. niger* y especies relacionadas, debido a su efectividad y su aceptabilidad para su utilización en la industria alimentaria.<sup>67</sup> Así, por ejemplo, *Aspergillus awamori* se emplea en numerosas aplicaciones, habiéndose utilizado para la producción de enzimas como tanasas,<sup>68</sup>

---

<sup>67</sup> Goodfrey, T.; Reichelt, J. (1983). Industrial Enzymology. Macmillan editions, London, 503-544.

<sup>68</sup> Mahapatra, K.; Kumar, R.; Sekher, S.; Banerjee, R.; Pandey, A.; Szakacs, G. (2005). Purification, characterization and some studies on secondary structure of tannase from *Aspergillus awamori* nakazawa. *Process Biochemistry*, **40**, 10, 3251-3254.

glucoamilasa,<sup>69</sup>  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas,<sup>70</sup>  $\alpha$ -glucosidasas,<sup>71</sup> xilanasas<sup>72</sup> o pectinasas.<sup>73,74</sup>

Además de la producción de enzimas *Aspergillus awamori* es usado para la manufactura de productos de alimentación de consumo humano, ya que no es tóxico ni patógeno.<sup>75</sup>

#### 2.4.2. Sustrato

La selección de un soporte adecuado para el cultivo en estado sólido es esencial ya que de ello depende el éxito del proceso.<sup>8</sup> Los factores más importantes a tener en cuenta a la hora de seleccionar un soporte son el tamaño de partícula, la porosidad y la composición química. Además de estos factores, también es de gran importancia su disponibilidad y precio.<sup>76,77</sup>

<sup>69</sup> Koutinas, A.; Wang, R.; Kookos, I.; Webb, C. (2003). Kinetic parameters of *Aspergillus awamori* in submerged cultivations on whole wheat flour under oxygen limiting conditions. *Biochemical Engineering Journal*, **16**, 1, 23-34.

<sup>70</sup> Koseki, T.; Okuda, M.; Sudoh, S.; Kizaki, Y.; Iwano, K.; Aramaki, I.; Matsuzawa, H. (2003). Role of two  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas in arabinoxylan degradation and characteristics of the encoding genes from shochu koji molds, *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus awamori*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **96**, 3, 232-241.

<sup>71</sup> Anindyawati, T.; Ann, Y.; Ito, K.; Lizuka, M.; Minamiura, N. (1998). Two kinds of novel  $\alpha$ -glucosidasas from *Aspergillus awamori* KT-11: Their purifications, properties and specificities. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **85**, 5, 465-469.

<sup>72</sup> Siedenberg, D.; Gerlach, S.; Czwalinna, A.; Schügerl, K.; Giuseppin, M.; Hunik, J. (1997). Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on complex medium in stirred tank and airlift tower loop reactors. *Journal of Biotechnology*, **56**, 3, 205-216.

<sup>73</sup> Hours, R.; Katsuragi, T.; Sakai, T. (1994). Growth and protopectinase production of *Aspergillus awamori* in solid-state culture at different acidities. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **78**, 6, 426-430.

<sup>74</sup> Blandino, A.; Dravillas, K.; Cantero, D.; Pandiella, S.; Webb, C. (2001). Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. *Process Biochemistry*, **37**, 5, 497-503.

<sup>75</sup> Cui, Y.; Van der Lans, R.; Giuseppin, M.; Luyben, K. (1998). Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. *Enzyme and Microbial Technology*, **23**, 157-167.

<sup>76</sup> Pastrana, L.; Gonzalez, M.; Pintado, J.; Murado, M. (1995). Interactions affecting gibberellic acid production in solid-state culture: a factorial study. *Enzyme and Microbial Technology*, **17**, 784-790.

La gran variedad de materiales sólidos utilizados en la FES pueden clasificarse en dos grandes grupos:<sup>78,79</sup>

- *Materiales inertes*: Aquellos que únicamente actúan como soporte físico para el anclaje de los microorganismos.
- *Materiales no inertes*: Aquellos que no sólo actúan como soporte, sino que además proporcionan algunos nutrientes a los microorganismos. Estos sustratos son típicamente composts y productos heterogéneos de agricultura o subproductos de la industria agraria.<sup>3</sup> Los materiales no inertes se dividen en:
  - ✓ Residuos con fibra:
    - Con alta digestibilidad: Como la pulpa de cítricos, el salvado de gluten de maíz, el residuo de cebada, etc.
    - Con baja digestibilidad: Como el bagazo de caña de azúcar, los cereales, el maíz, la paja de soja y algodón, la cáscara de algodón, la cáscara de soja, la cáscara de cacahuete, el orujo de uva, etc.
  - ✓ Salvados, a los que pertenecen el arroz, los cacahuetes, la soja y el algodón.

---

<sup>77</sup> Murado, M.; González, M.; Torrado, A.; Pastrana, L. (1996). Amylase production by solid state culture of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. *Process Biochemistry*, **32**, 35–42.

<sup>78</sup> Durand, A.; Renaud, R.; Almanza, S.; Maratray, J.; Diez, M.; Desgranges, C. (1993). Solid-state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant. *Biotechnology Advances*, **11**, 591–597.

<sup>79</sup> Ralph, B. (1976). Solid substrate fermentations. *Food Technology in Australia*, **28**, 247–251.

En algunas ocasiones, este tipo de sustratos tienen que ser sometidos a pretratamientos antes del proceso de fermentación para que sean más asimilables por los microorganismos. Los pretratamientos más habituales son:<sup>3</sup>

- Reducción de tamaño mediante molido, rallado o picado.
- Hidrólisis de los polímeros vía física, química o enzimática para aumentar su disponibilidad para el hongo.
- Suplementación externa con nutrientes: adición de fósforo, nitrógeno, sales, etc.
- Ajuste del pH y de la humedad utilizando una solución mineral. Este pretratamiento es muy habitual, ya que puede ocurrir que los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos se encuentren disponibles en los sustratos en concentraciones por debajo de las óptimas, o incluso pueden no estar presentes en los mismos.
- Cocido y tratamiento de vapor para conseguir una degradación previa de las macromoléculas y la eliminación de los principales contaminantes.

Cuando se utilizan los materiales inertes como sustratos de fermentación, como por ejemplo la espuma de poliuretano, estos tienen que impregnarse en una disolución de nutrientes. Para estos sustratos es relativamente más sencillo y barato aislar los productos que si se utilizan materias primas naturales. Cuando se emplean sustratos naturales, mientras se extrae el producto de interés después de la fermentación, se extraen también otros componentes solubles en agua dificultando la purificación de los productos de interés.<sup>3</sup>

Otra ventaja de los sustratos inertes es que es relativamente sencillo medir biomasa, objetivo que resulta bastante complicado en los sistemas de fermentación en estado sólido.<sup>80</sup>

Un ejemplo de producción sobre sustrato inerte se describe en el trabajo llevado a cabo por Montiel-González y col., que consistía en estudiar la producción de invertasas por *Aspergillus niger* utilizando como soporte espuma de poliuretano de baja densidad ( $17 \text{ kg/m}^3$ ), al cual se le añadió una solución que contenía  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , urea,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{ZnCl}_2$  y sacarosa, obteniendo buenos resultados.<sup>81</sup>

Sin embargo, los residuos agroindustriales son considerados generalmente los mejores sustratos para la FES debido, principalmente, a que su utilización ayuda a solventar problemas económicos y medioambientales causados por su acumulación.<sup>12,22</sup> Además, presentan una estructura básica macromolecular compuesta por celulosa, almidón, pectina, lignocelulosa, etc., potencialmente asimilable por una amplia gama de microorganismos quimioheterótrofos.<sup>10</sup>

La elección de un sustrato inerte o de un residuo agroindustrial puede modificar por completo el rendimiento de una fermentación. De esta manera se recoge en el trabajo de Hakil y col., quienes estudiaron la eliminación de cafeína mediante FES del hongo *Aspergillus tamarii* utilizando dos soportes diferentes: espuma de poliuretano y bagazo de caña de azúcar. En ambos casos añadieron sacarosa como fuente de carbono, una solución con fuente de nitrógeno (urea y sulfato amónico) y sales de iones

---

<sup>80</sup> Hakil, M.; Voisinet, F.; Viniestra-González, G.; Augur, C. (1999). Caffeine degradation in solid state fermentation by *Aspergillus tamarii*: effects of additional nitrogen sources. *Process Biochemistry*, **35**, 1-2, 103-109.

<sup>81</sup> Montiel-González, A.; Viniestra-González, G.; Fernández, F.; Loera, O. (2004). Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, **39**, 12, 2085-2090.

metálicos.<sup>80</sup> La principal diferencia que encontraron entre estos dos soportes fue el tiempo necesario para completar la fermentación; con el bagazo de caña, los sustratos (cafeína, sulfato amónico y urea) se degradaban casi dos veces más rápido que con la espuma de poliuretano. Sin embargo, utilizando espuma de poliuretano como soporte fue posible la determinación de la biomasa fúngica, lo cual no se logró con el bagazo de caña de azúcar.

La composición de este tipo de soportes debería de ser elegida, en cualquier caso, en función del producto que se pretende obtener. Así, por ejemplo, si se quieren producir enzimas, el sustrato debería contener sustancias que actuaran como inductores de las mismas.<sup>10</sup> Es el caso, por ejemplo, de la lignina peroxidasa, cuya producción está favorecida por la utilización de residuos orgánicos ricos en lignina,<sup>82</sup> la lacasa, que se estimula con residuos orgánicos ricos en celulosa, o las amilasas, cuya producción se favorece en sustratos con alto contenido en almidón.<sup>83,84</sup>

Muchos de los residuos agroindustriales como el bagazo de caña de azúcar, el bagazo de cítricos, piel de frutas, etc., han sido utilizados para la producción de enzimas. En la tabla 2.3 se citan algunos ejemplos:

---

<sup>82</sup> Rodríguez, S.; Rodríguez, R.; Gallego, P.; Sanromán, A. (2003). Biodegradation of grape cluster stems and ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* during semi-solid-state cultivation. *Acta Biotechnology*, **23**, 62–64.

<sup>83</sup> Lorenzo, M.; Moldes, D.; Rodríguez, S.; Sanromán, A. (2002). Improvement in laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, **82**, 109–113.

<sup>84</sup> Rodríguez, S. (1999). Producción de enzimas ligninolíticos en cultivos en estado semi-sólido por *Phanerochaete chrysosporium* y *Phlebia radiata*. Ph.D. Thesis, University of Vigo, Spain.

Fuente	Microorganismo	Enzima	Referencia
Piel de mango	<i>Aspergillus niger</i>	Poligalacturonasas	Couri y col., 2000 <sup>85</sup>
Paja de sorgo	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Xilanasas	Sonia y col., 2005 <sup>86</sup>
Deshechos de plátano	<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Lacasas Amilasas	Reddy y col., 2003 <sup>87</sup> Krishna y Chandrasekaran, 1996 <sup>18</sup>
Maíz	<i>Sporotrichum sp.</i>	Lignocelulasas	Jaszek y col., 1998 <sup>88</sup>
Cáscara de naranja	<i>Aspergillus niger</i>	Enzimas hidrolíticas	Mamma y col., 2008 <sup>17</sup>
Cáscara de patata	<i>Bacillus subtilis</i>	Proteasas alcalinas	Mukherjee y col., 2008 <sup>89</sup>
Salvado de trigo	<i>Aspergillus oryzae</i>	Fructosil transferasa	Sangeetha y col., 2004 <sup>90</sup>

<sup>85</sup> Couri, S.; da Costa Terzi, S.; Saavedra Pinto, G.; Pereira Freitas, S.; Augusto da Costa, A. (2000). Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochemistry*, **36**, 255-261.

<sup>86</sup> Sonia, K.; Chadha, B.; Saini, H. (2005). Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D<sub>2</sub>W<sub>3</sub>) under solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, **96**, 1561-1569.

<sup>87</sup> Reddy, G.; Ravindra, B.; Komaraiah, P.; Roy, K.; Kothari, I. (2003). Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species. *Process Biochemistry*, **38**, 1457-1462.

<sup>88</sup> Jaszek, M.; Malarczyk, E.; Leonowicz, A. (1998). Investigation of ligninolytic enzymes during solid state fermentation of cotton wastes by selected strains of basidiomycetes. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry.

<sup>89</sup> Mukherjee, A.; Adhikari, H.; Rai, S. (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrica grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*, **39**, 2, 353-361.

<sup>90</sup> Sangeetha, P.; Ramesh, M.; Prapulla, S. (2004). Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**, 530-537.

(Continuación de la tabla anterior)

Fuente	Microorganismo	Enzima	Referencia
Torta de aceite de sésamo	<i>Sporotrichum thermophile</i>	Fitasas	Singh y Satyanarayana <sup>91</sup>
Orujo de uva	<i>Aspergillus awamori</i>	Enzimas hidrolíticas	Botella y col., 2005 <sup>92</sup>

**Tabla 2.3: Algunos ejemplos de obtención de enzimas a partir de residuos agroindustriales mediante FES.**

Tal y como se describe en la tabla 2.3, el orujo de uva puede utilizarse como sustrato para la FES. Así, ha sido empleado en diversos bioprocesos, como la producción de ácido cítrico,<sup>93</sup> ácido glucónico,<sup>94</sup> carotenoides,<sup>95</sup> xantano,<sup>96</sup> etanol,<sup>97</sup> polifenoles,<sup>98</sup> enzimas, etc.<sup>92</sup>

<sup>91</sup> Singh, B.; Satyanarayana, T. (2008). Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potential applications. *Bioresource Technology*, **99**, 8, 2824-2830.

<sup>92</sup> Botella, C.; de Ory, I.; Webb, C.; Cantero, D.; Blandino, A. (2005). Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*, **26**, 100-106.

<sup>93</sup> Hang, Y.; Woodams, E. (1985). Grape pomace a novel substrate for microbial production of citric acid. *Biotechnology Letters*, **7**, 253-254.

<sup>94</sup> Buzzini, P.; Gobetti, M.; Rossi, J. (1993). Utilization of grape must and concentrated rectified grape must to produce gluconic acid by *Aspergillus niger* in batch fermentations. *Biotechnology Letters*, **15**, 151-156.

<sup>95</sup> Buzzini, P.; Martini, A. (2000). Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw material of agro-industrial origin. *Bioresource Technology*, **71**, 41-44.

<sup>96</sup> Stredonsky, M.; Conti, E. (1999). Xanthan production by solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **34**, 581-587.

<sup>97</sup> Hang, Y.; Lee, C.; Woodams, E. (1986). Solid-state fermentation of grape pomace for ethanol production. *Biotechnological letters*, **8**, 53-56.

<sup>98</sup> Larrauri, J.; Ruperez, P.; Saura-Calixto, F. (1996). Antioxidant activity of wine pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47**, 369-372.

#### 2.4.2.1. El orujo de uva como sustrato para la FES

La uva (*Vitis vinifera* L.) es una de las frutas más cosechadas en el mundo, obteniéndose en la actualidad más de 60 millones de toneladas métricas.<sup>99,100</sup> Es cultivada principalmente para la producción de vino, siendo España uno de los mayores productores del mundo (de 30,9 a 50 millones de Hl por año en el periodo comprendido entre el 2000 y 2005).<sup>100</sup>

El orujo de uva es el residuo sólido obtenido tras la extracción del zumo de la uva y constituye el principal subproducto del proceso de elaboración del vino.<sup>101,102</sup> Uno de los principales problemas de las bodegas y las destilerías es la generación de grandes cantidades de este residuo en cortos periodos de tiempo al año. Además, el orujo de uva presenta algunas características contaminantes como son un bajo pH y un alto contenido en sustancias fenólicas fitotóxicas y antibacterianas, que dificultan su degradación biológica.<sup>103</sup>

La Unión Europea genera unos 30 millones de toneladas de este residuo al año siendo los principales productores España, Italia y Francia, en los cuales se ha tratado de reutilizar mediante diversos procesos.<sup>100</sup> Así, por ejemplo, la fermentación alcohólica del orujo de uva produce varios compuestos volátiles que se recuperan de

---

<sup>99</sup> Ruberto, G.; Renda, A.; Amico, V.; Tringali, C. (2008). Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L. *Bioresource Technology*, **99**, 2, 260-268.

<sup>100</sup> www.fao.org

<sup>101</sup> Soto, M.; Moure, A.; Domínguez, H.; Parajó, J. (2008). Charcoal adsorption of phenolic compounds present in distilled grape pomace. *Journal of Food Engineering*, **84**, 1, 156-163.

<sup>102</sup> Rice, A. (1976). Solid waste generation and by-product recovery potential from winery residues. *American Journal of Enology Viticulture*, **27**, 21-26.

<sup>103</sup> Bustamante, M.; Moral, R.; Paredes, C.; Pérez-Espinosa, A.; Moreno-Caselles, J.; Pérez-Murcia, M. (2008). Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management*, **28**, 2, 372-380.

la corriente de destilación para obtener licores.<sup>101,104,105</sup> Por otra parte, el orujo de uva puede utilizarse para la alimentación del ganado o bien puede quemarse para producir energía. También se ha empleado para la extracción del aceite a partir de sus semillas.<sup>99,106,107</sup> Mediante la extracción del orujo de uva se pueden obtener subproductos de alto valor añadido que pueden utilizarse con fines farmacológicos como son los compuestos antioxidantes. Estos se utilizan para prevenir o reducir el deterioro de los alimentos y para tratar enfermedades degenerativas humanas y están presentes tanto en la uva como en los residuos obtenidos del proceso de elaboración del vino.<sup>108,109</sup> A este grupo de compuestos pertenecen los polifenoles antioxidantes como antocianinas y flavonoles que también han sido extraídos a partir del orujo de uva.<sup>101,110</sup> Además, el orujo de uva se ha utilizado como fertilizante de suelos, describiéndose en la bibliografía sus efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas.<sup>111,112</sup> Sin embargo, algunos autores han observado efectos negativos que están

<sup>104</sup> Silva, M.; Malcata, F. (1999). Effects of time grape pomace fermentation and distillation cuts on the chemical composition of grapes marcs. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-forschung A – Food Research and Technology*, **208**, 134–143.

<sup>105</sup> Silva, M.; Macedi, A.; Malcata, F. (2000). Review: steam distilled from fermented grape pomace. *Food Science and Technology International*, **6**, 285–300.

<sup>106</sup> Molero, A.; Pereyra, C.; Martínez, E. (1995). Caracterización del aceite de semilla de uva extraído con dióxido de carbono supercrítico (Characterisation of grape seed oil extracted with supercritical carbon dioxide). *Grasas y Aceites*, **46**, 29–34.

<sup>107</sup> Molero, A.; Pereyra, C.; Martínez, E. (1995). Optimización del proceso de extracción del aceite de semilla de uva con dióxido de carbono líquido y supercrítico (Optimisation of the extraction process of grape seed oil with liquid and supercritical carbon dioxide). *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **3**, 35–40.

<sup>108</sup> Hras, A.; Hadolin, M.; Knez, Z.; Bauman, D. (2002). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with tocoferol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, **71**, 2, 229–233.

<sup>109</sup> De Campos, L.; Leimann, F.; Curi, R.; Ferreira, S. (2008). Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource Technology*, **99**, 17, 8413–8420.

<sup>110</sup> Makris, D.; Kallithraka, S.; Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 5, 396–404.

<sup>111</sup> Mariotti, M.; Masoni, A.; Ercoli, L. (2000). Distribuzione dei fanghi di cantina alla soia. Nota I. Accrescimento epigeo ed ipogeo (Distribution of winery sludge in soy). *Rivista di Agronomia*, **34**, 227–233.

<sup>112</sup> Ferrer, J.; Paéz, G.; Mármol, Z.; Ramones, E.; Chandler, C.; Marín, M.; Ferrer, A. (2001). Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. *Bioresource Technology*, **76**, 39–44.

asociados con una inmovilización inicial del nitrógeno después de la adición del orujo al suelo.<sup>111,113,114</sup>

La mayoría de estos procesos de reutilización del orujo de uva tienen bajos rendimientos, de ahí que, por lo general, se disponga en áreas abiertas causando serios problemas medioambientales.<sup>92</sup> Por ello, en los últimos años se han desarrollado procesos alternativos para su utilización como materia prima en la obtención de productos químicos y compuestos de interés mediante fermentación en estado sólido.

El orujo de uva está formado por la piel, las semillas y el raspón, constituyendo un 13% del peso de la uva procesada.<sup>99</sup> Su composición química es bastante compleja: alcoholes, ácidos, aldehidos, ésteres, polifenoles, sustancias minerales, azúcares, etc.<sup>99,115,116,117,118</sup> En su composición incluye carbohidratos, fibra, grasas, proteínas y sales minerales. El principal componente de la fibra es la lignina, seguida de hemicelulosa, celulosa y pectina.<sup>92,119</sup>

---

<sup>113</sup> Bustamante, M.; Pérez Murcia, M.; Paredes, C.; Moral, R.; Pérez Espinosa, A.; Moreno-Caselles, J. (2004). Short-term carbon and nitrogen mineralisation in soil amended with winery and distillery organic wastes. In: 11th International Conference of the FAO ESCORENA Network on Recycling of Agricultural, Municipal and Industrial Residues in Agriculture (RAMIRAN), Murcia.

<sup>114</sup> Flavel, T.; Murphy, D.; Lalor, B.; Fillery, I.; Gross, N. (2005). Mineralization rates after application of composted grape marc to soil *Soil Biology and Biochemistry*, **37**, 1397–1400.

<sup>115</sup> Bonilla, F.; Mayene, M.; Merida, J.; Mulina, M. (1999). Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidant. *Food Chemistry*, **66**, 209–215.

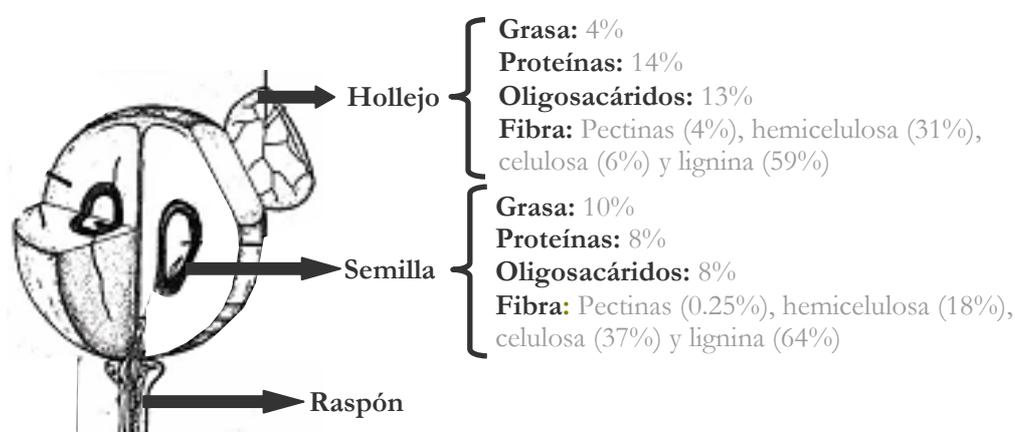
<sup>116</sup> Mantell, C.; Rodríguez, M.; de la Ossa, E. (2003). A screening analysis of the high-pressure extraction of anthocyanins from red grape pomace with carbon dioxide and cosolvent. *Engineering in Life Science*, **3**, 38–42.

<sup>117</sup> Murthy, K.; Singh, R.; Jayaprakasha, G. (2002). Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5909–5914.

<sup>118</sup> Saquet, J.; Labarbe, B.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M. (2000). Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 1076–1080.

<sup>119</sup> Díaz, A.; Caro, I.; de Ory, I.; Blandino, A. (2007). Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme and Microbial Technology*, **41**, 3, 302–306.

La variedad de uva predominante en la zona de Jerez es la uva blanca *Palomino Fino*, la cual presenta un alto contenido de carbohidratos (8% en las semillas, 13% en la piel), donde la fibra representa en torno al 50% de la masa total. El principal componente de la fibra es la lignina, representando el 64% de la fibra en las pepitas y el 59% en la piel. Los otros componentes de la fibra son las hemicelulosas (18% en la fibra de las pipas y el 31% en la piel) y celulosa (17.75% y 6% en pipas y piel respectivamente). El componente minoritario de la fibra es la pectina, representando el 0.25% de la fibra presente en las pepitas y 4% en la piel.<sup>120</sup>



**Figura 2.5: Composición media de la uva *Palomino Fino*.**

Como aparece en la figura 2.5, la semilla contiene un 10% de grasas dentro de las cuales están incorporados los aceites esenciales, que presentan gran interés debido a que son comúnmente utilizados en las industrias farmacéutica y cosmética.<sup>109</sup>

<sup>120</sup> Igartuburu, J. (1989). Estudio de subproductos agrícolas: aminoácidos y fibra alimentaria de la semilla y el hollejo de la uva palomino. Tesis doctoral, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz, España.

La semilla también presenta compuestos fenólicos como taninos, azúcares, minerales y otras sustancias. Por otra parte el raspón es rico en taninos, que incluyen las sustancias fenólicas con alto potencial nutracéutico y farmacológico.<sup>109,121,122</sup>

---

<sup>121</sup> Murga, R.; Ruiz, R.; Beltrán, S.; Cabezas, J. (2000). Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 8, 3408–3412.

<sup>122</sup> Ju, Z.; Howard, L. (2003). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, **51**, 5207–5213.

## 2.5. APLICACIONES DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

La FES, al ser una tecnología de bajo coste, es ampliamente utilizada. Como ejemplos de su uso destacan la producción tradicional de alimentos fermentados como el “koji” japonés, el “tempeh” de Indonesia o el “ragi” de India. Su uso se ha extendido actualmente a la producción de compuestos de alto valor añadido como enzimas, ácidos orgánicos, biopesticidas, biofuel y saborizantes. Además, en los últimos años también se han desarrollado nuevas aplicaciones en el control medioambiental como la biorremediación y la biodegradación de compuestos peligrosos, en la detoxificación de residuos agroindustriales, etc.<sup>22,123</sup>

En la tabla 2.4 se resumen las aplicaciones más importantes de la FES divididas en tres sectores económicos: medioambiental, agroindustrial y aplicación en procesos industriales.<sup>22,123</sup>

---

<sup>123</sup> Pérez-Guerra, N.; Torrado-Agrasar, A.; López-Macías, C.; Pastrana, L. (2003). Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **2**, 343-350.

Sector económico	Aplicación
Medioambiental	Biorremediación y detoxificación biológica de compuestos peligrosos
Agroindustrial	Biotransformación de cosechas o residuos de cosechas
Aplicación en procesos industriales	Pulpeado biológico Producción de compuestos bioactivos Producción de ácidos orgánicos Producción de enzimas Producción de bioetanol Producción de otros compuestos de interés

**Tabla 2.4: Aplicaciones de la FES divididas en diferentes sectores.**

### 2.5.1. Biorremediación y detoxificación biológica de compuestos peligrosos

La FES es una herramienta útil para la biorremediación de compuestos peligrosos. Como ejemplo, Masaphy y col. propusieron un sistema para la biodegradación de la atrazina, herbicida artificial utilizado para controlar el crecimiento de las malas hierbas en la agricultura, añadiéndola a una mezcla de algodón con paja de trigo e inoculando con el hongo *Pleurotus pulmonarius*.<sup>22,124</sup> La aplicación de *Pleurotus* sp. también fue propuesta por Fan y col. para la biorremediación de residuos que contenían cafeína.<sup>125</sup>

<sup>124</sup> Masaphy, S.; Levanon, D.; Henis, Y. (1996). Degradation of atrazine by the lignocellulolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* during solid state fermentation. *Bioresource Technology*, **56**, 207–214.

<sup>125</sup> Fan, L.; Pandey, A.; Vandenberghe, L.; Soccol, C. (1999). Effect of caffeine on *Pleurotus* sp. and bioremediation of caffeinated residues. IX European Congress on Biotechnology, Brussels, Belgium, 2664.

De manera análoga, Kastanek y col. estudiaron el uso de reactores de FES para mejorar el proceso de dehalogenación de bifenoles policlorados (PCBs) y etenos clorados volátiles (CIUs) presentes en suelos contaminados y aguas subterráneas.<sup>126</sup>

Además, ciertos residuos agroindustriales contienen compuestos tóxicos o antinutricionales como cianuro de hidrógeno, cafeína, taninos, polifenoles, etc., cuya acumulación se convierte en un problema para las industrias de procesado ya que provoca serios problemas medioambientales.<sup>22</sup>

La FES ha resultado ser una solución a estos problemas llegándose a aplicar para la detoxificación de residuos de manera efectiva. Por ejemplo, en el procesado del café se generan como residuos la pulpa y la cáscara, que contienen cafeína, taninos y polifenoles que son compuestos antifisiológicos.<sup>22,127,128,129</sup> Aunque inicialmente se les había dado un uso alternativo (empleo como fertilizante, alimento para ganado, composts, etc.), para estas aplicaciones sólo puede utilizarse una fracción de la cantidad disponible, y además no son procesos muy eficientes. Sin embargo, mediante la FES se puede disminuir el contenido de estos compuestos tóxicos en los residuos agroindustriales. Así, Boccas y col. estudiaron la degradación de cafeína y taninos presentes en la cáscara del café bajo condiciones óptimas de humedad inicial,

---

<sup>126</sup> Kastanek, F.; Demmerova, K.; Pazlarova, J.; Burkhard, J.; Maleterova, Y. (1999). Biodegradation of polychlorinated biphenyls and volatile chlorinated hydrocarbons in contaminated soils and ground water in field conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **44**, 39–47.

<sup>127</sup> Soccol, C.; Krieger, N. (1998). Brazilian experiments for the valorization of agro-industrial residues by solid state fermentation. *Advances in Biotechnology*, Educational Publishers, New Delhi, 25–40.

<sup>128</sup> Fan, L.; Pandey, A.; Soccol, C. (1999). Cultivation of *Pleurotus* sp. on coffee residues. In: Broderick A, Nair T, editors. Proceedings of the Third International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products and AMGA's 26th National Mushroom Industry Conference, 301–11.

<sup>129</sup> Fan, L.; Pandey, A.; Soccol, C. (1999). Growth of *Lentinus edodes* on the coffee industry residues and fruiting body production. In: Broderick A, Nair T, editors. Proceedings of the Third International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products & AMGA's 26th National Mushroom Industry Conference, 293–300.

pH del sustrato, tamaño del inóculo, etc., consiguiendo reducir estos compuestos en un 87 y 65% respectivamente.<sup>130</sup>

Otro ejemplo representativo se muestra en el trabajo de Ofuya y Obilor, que estudiaron el efecto de la FES sobre compuestos tóxicos presentes en la cáscara de casava. Así, tras 96 horas de fermentación, se produjo una drástica reducción del contenido en HCN (aproximadamente del 95%) en la cáscara y un 42% en los taninos solubles.<sup>131</sup>

### 2.5.2. Biotransformación de cosechas o residuos de cosechas

La biotransformación de cosechas o residuos de cosechas para mejorar sus calidades nutricionales se encuentra dentro de las aplicaciones más importantes de la FES. Los hongos que causan la podredumbre blanca se han empleado comúnmente con este propósito.

La casava, la cual juega un papel importante en la alimentación de millones de personas en África, Asia y Sudamérica, no es un alimento equilibrado ya que presenta un bajo contenido en proteínas, vitaminas y minerales. Además, carece de aminoácidos que contienen azufre. Por este motivo, se han realizado varios intentos para mejorar su calidad nutricional y la de sus residuos mediante FES.<sup>22,132,133,134,135,136</sup>

---

<sup>130</sup> Boccas, F.; Roussos, M.; Gutierrez, L.; Serrano, L.; Vinegra-Gonzalez, G. (1994). Production of pectinases from coffee pulp in solid-state fermentation system: Selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three steps screening technique. *Journal of Food Science and Technology*, **31**, 22-26.

<sup>131</sup> Ofuya, C.; Obilor, S. (1994). The effects of solid state fermentation on the toxic components of cassava peel. *Process Biochemistry*, **29**, 25–28.

<sup>132</sup> Porres, C.; Alvarez, D.; Calzada, J. (1993). *Biotechnology Advances*, **11**, 519–522.

<sup>133</sup> Balagopalan, C. (1996). Improving the nutritional value of cassava by solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**, 479–482.

<sup>134</sup> Soccol, C. (1996). Biotechnology products from cassava root by solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**, 358–364.

<sup>135</sup> Soccol, C.; Leon, J.; Marin, B.; Roussos, S.; Raimbault, M. (1993). Growth kinetics of *Rhizopus arrhizus* in solid state fermentation of treated cassava. *Biotechnology Technology*, **7**, 563–568.

Los residuos lignocelulósicos obtenidos tras las cosechas presentan un gran potencial para ser utilizados como alimento de rumiantes. Aunque estos residuos se caracterizan por tener un alto contenido en celulosa y hemicelulosa (además de algo de lignina), son pobres en contenido protéico siendo en algunas ocasiones poco digestivos, lo que limita su utilización como alimento ideal para animales. Para su utilización es necesario mejorar su calidad nutricional, lo que se podría conseguir mediante métodos físicos, químicos y microbianos.<sup>22,137</sup> Debido a que los dos primeros son procesos caros y requieren gran cantidad de energía, se ha centrado el estudio en el desarrollo de los métodos microbianos como es el caso de la FES, la cual tiene un gran potencial para este propósito.<sup>133,138</sup> Así, por ejemplo, Zadrazil y col. estudiaron la bioconversión de lignocelulosa en alimento para rumiantes enriquecido en proteínas, utilizando hongos que producen podredumbre blanca.

### 2.5.3. Pulpeado biológico

El pulpeado consiste en la separación de las fibras tal y como se encuentran en la madera para obtener una masa fibrosa apta para la posterior producción del papel. Este proceso se puede llevar a cabo mediante procedimientos mecánicos, térmicos, químicos, biológicos o por combinación de algunos de ellos.

El pulpeado biológico es un tratamiento previo al pulpeado mecánico que consiste en tratar las virutas de madera con hongos capaces de degradar la lignina. Este proceso, que sería una fermentación en estado sólido sobre las virutas, reduce la energía

---

<sup>136</sup> Soccol, C.; Marin, B.; Raimbault, M.; Lebeault, J. (1994). Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**, 330–336.

<sup>137</sup> Singh, K.; Punia, A.; Singh, S. (1996). Biotransformation of crop residues into animal feed by solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**, 472–478.

<sup>138</sup> Zadrazil, F.; Kamra, D.; Isikuemhen, O.; Schuchardt, F. (1996). Bioconversion of lignocellulose into ruminant feed with white rot fungi. *Journal of Applied Animal Research*, **10**, 105–124.

eléctrica requerida, aumenta el rendimiento de la molienda, mejora la resistencia del papel y reduce el impacto ambiental del pulpeado.<sup>139</sup>

Los hongos responsables de la llamada podredumbre blanca tienen especial interés en el pulpeado biológico, destacando dos especies: *Phanerochaete chrysosporium* y *Ceriporiopsis subvermispora*. El proceso da buenos resultados sin necesidad de esterilizar el sólido en el autoclave ni enriquecer con una solución nutritiva.<sup>22,140</sup>

#### 2.5.4. Producción de compuestos bioactivos

La FES cuenta con grandes ventajas en la producción de metabolitos secundarios biológicamente activos como son las micotoxinas, las endotoxinas bacterianas, los antibióticos, los fármacos inmunosupresores, los alcaloides, etc., ya que se pueden utilizar residuos como sustrato, la productividad del proceso es mucho mayor que en cultivo sumergido y se consiguen concentraciones máximas de producto en un menor tiempo de fermentación.<sup>22</sup>

En la tabla 2.5 se muestran algunos ejemplos.

---

<sup>139</sup> Akhtar, M.; Lentz, M.; Swaney, R.; Scott, G.; Horn, E.; Kirk, T. (1998). Commercialization of biopulping for mechanical pulping. 7<sup>th</sup> International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Vancouver, Canadá.

<sup>140</sup> Wall, M.; Cameron, D.; Lightfoot, D. (1993). Biopulping process design and kinetics. *Biotechnology Advances*, **11**, 645–662.

Compuesto	Fuente	Sustrato	Función	Referencia
Aflatoxina	<i>A. oryzae</i> , <i>A. parasitus</i>	Trigo, avena, arroz, maíz, cacahuetes	Micotoxina	141, 142
Endotoxinas bacterianas	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Residuos de coco	Insecticida	141
Ácido giberélico	<i>Gibberella fujicuroi</i> , <i>Fusarium moniliforme</i>	Salvado de trigo, mazorca de maíz, harina de casava, bagazo de caña de azúcar	Hormona para el crecimiento de plantas	143, 144, 145, 146, 147, 148
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Bagazo de caña de azúcar	Antibiótico	141, 149
Cefalosporina	<i>Cephalosporium armonium</i>	Cebada	Antibiótico	141
Tetraciclina	<i>S. viridifaciens</i>	Residuo de patata dulce	Antibiótico	141
Ciclosporina A	<i>Tohyocladium inflatum</i>	Salvado de trigo	Fármaco inmuno-supresor	150, 151, 152

<sup>141</sup> Balakrishnan, K.; Pandey, A. (1996). Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**, 365–372.

<sup>142</sup> Barrios-Gonzalez, J.; Tosmani, A. (1996). Production of aflatoxins in solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**, 424–430.

<sup>143</sup> Pasttrana, L.; Gonzalez, M.; Pintado, J.; Murado, M. (1995). Interactions affecting gibberellic acid production in solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **17**, 784–790.

<sup>144</sup> Durand, A.; Almanza, S.; Renaud, R.; Maratray, J. (1997). Solid state fermentation: an attractive alternative to submerged liquid fermentations. *Agro Food Industry Hi-Tech*, **8**, 39–42.

<sup>145</sup> Tomasini, A.; Fajardo, C.; Barrios-Gonzalez, J. (1997). Gibberellic acid production using different solid state fermentation systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **13**, 203–206.

<sup>146</sup> Bandelier, S.; Renaud, R.; Durand, A. (1997). Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. *Process Biochemistry*, **32**, 141–145.

<sup>147</sup> Kumar, P.; Sankar, K.; Lonsane, P. (1991). Supercritical fluid extraction from dry moldy bran for the purification of gibberellic acid from the concomitant products produced during solid state fermentation. *The Chemical Engineering*, **46**, B53–B58.

<sup>148</sup> Machado, C.; Oliveira, B.; Pandey, A.; Soccol, C. (1999). Coffee husk as a substrate for the production of gibberellic acid by fermentation. III International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agro-Industry, Londrina, Brazil, 39.

<sup>149</sup> Barrios-Gonzalez, J.; Gonzalez, H.; Mekia, A. (1993). Effect of particle size, packing density and agitation on penicillin production in solid state fermentation. *Biotechnology Advances*, **11**, 539–47.

(Continuación de la tabla anterior)

Compuesto	Fuente	Sustrato	Función	Referencia
Antifúngicos volátiles	<i>Bacillus subtilis</i>	Arcilla impregnada sobre composta	Compuestos antifúngicos	141
Ácido clavulánico	<i>S. clavuligerus</i>	Trigo con harina de soja y pastel de girasol	Inhibidor $\beta$ -lactamasa, antibacteriano	153

**Tabla 2.5: Compuestos bioactivos producidos por FES.<sup>22</sup>**

A pesar de que la FES tiene un gran potencial para la producción de metabolitos secundarios bioactivos, aun son necesarias importantes mejoras del proceso para lograrse su producción comercial.<sup>22</sup>

### 2.5.5. Producción de ácidos orgánicos

El ácido cítrico se ha producido históricamente mediante FES mientras que el ácido láctico, fumárico y oxálico se han retrasado hasta la década actual.<sup>22</sup>

La obtención de estos ácidos mediante FES utilizando como fuente de carbono residuos agroindustriales tiene un gran potencial. En la tabla 2.6 se muestran algunos ejemplos de ácidos orgánicos producidos utilizando estos sustratos.

<sup>150</sup> Murthy, M.; Mohan, E.; Sadhukhan, A. (1999). Cyclosporin A production by *Tolypocladium inflatum* using solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **34**, 269–280.

<sup>151</sup> Sekar, C.; Balaraman, K. (1998). Optimization studies on the production of cyclosporin A by solid state fermentation. *Bioprocess Engineering*, **18**, 293–296.

<sup>152</sup> Sekar, C.; Rajasekar, W.; Balaraman, K. (1997). Production of cyclosporin A by solid state fermentation. *Bioprocess Engineering*, **17**, 257–259.

<sup>153</sup> Sircar, A.; Sridhar, P.; Das, P. (1998). Optimization of solid state medium for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry*, **33**, 283–289.

Ácido producido	Microorganismo	Sustrato	Referencia
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Patata dulce	154
	<i>A. foetidus</i>	Resíduo de piña	155
	<i>A. niger</i>	Resíduo de piña	155, 156
	<i>A. niger</i>	Resíduo de soja	157
	<i>A. niger</i>	Chaucha	158
	<i>A. niger</i>	Casava	136
	<i>A. niger</i>	Cáscara de café	159
Ácido fumárico	<i>Rhizopus sp.</i>	Casava	136
Ácido láctico	<i>Rhizopus sp.</i>	Casava	134,160
	<i>R. oryzae</i>	Residuo del procesado de la zanahoria	161
	<i>R. oryzae</i>	Bagazo de caña de azúcar	160

<sup>154</sup> Leangon, S.; Maddox, I.; Brooks, J. (1999). Influence of the glucolytic rate on production of citric acid and oxalic acid by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **15**, 493–495.

<sup>155</sup> Tran, C.; Sly, L.; Mitchell, D. (1998). Selection of a strain of *Aspergillus* for the production of citric acid from pineapple waste in solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **14**, 399–404.

<sup>156</sup> Lima, V.; Stamford, T.; Salgueiro, A. (1995). Citric acid production from pineapple waste by solid state fermentation using *Aspergillus niger*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **38**, 773–783.

<sup>157</sup> Khare, S.; Jha, K.; Gandhi, A. (1995). Citric acid production from okara (soy-residue) by solid state fermentation. *Bioresource Technology*, **54**, 323–325.

<sup>158</sup> Roukas, T. (1999). Citric acid production from carob pod by solid fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 54–59.

<sup>159</sup> Shankaranand, V.; Lonsane, B. (1994). Coffee husk — an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid state fermentation system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **10**, 165–168.

<sup>160</sup> Soccol, C. (1998). Citric acid and glucoamylase production from cassava by-products in solid state fermentation. Solid State Fermentation — International Training Course FMS97, 125–136.

<sup>161</sup> Garg, N.; Hang, Y. (1995). Microbial production of organic acids from carrot processing waste. *Journal of Food Science and Technology*, **32**, 119–121.

(Continuación de la tabla anterior)

Ácido producido	Microorganismo	Sustrato	Referencia
Ácido oxálico	<i>A. niger</i>	Patata dulce	154
Ácido gálico	<i>Rhizopus oryzae</i>	Sustrato mezcla rico en taninos	162
Ácido L-glutámico	<i>Brevibacterium sp.</i>	Bagazo de caña de azúcar	163

**Tabla 2.6: Ácidos orgánicos producidos por FES.<sup>22</sup>**

A tenor de estos resultados, la FES es una tecnología prometedora para la producción de compuestos de alto valor añadido como los ácidos orgánicos, proporcionando en algunas ocasiones mayores rendimientos que la FCS.

### 2.5.6. Producción de enzimas

La FES tiene un elevado potencial para la producción de enzimas a partir de microorganismos.<sup>22,164,165</sup> Un gran número de procesos industriales en las áreas de biotecnología industrial, medioambiental y alimentaria utilizan enzimas en alguna etapa. Debido a la gran relevancia que presentan las enzimas en el ámbito industrial y por ser el objeto principal de la presente tesis, se tratarán de una forma más detallada en el apartado 2.6 de este capítulo.

<sup>162</sup> Kar, B.; Banerjee, R.; Bhattacharyya, B. (1998). Biotransformation of tannic acid to gallic acid by solid state fermentation. *Advances in Biotechnology*. Educational Publishers, 67–74.

<sup>163</sup> Nampoothiri, K.; Pandey, A. (1996). Solid state fermentation for L-glutamic acid production using *Brevibacterium sp.* *Biotechnology Letters*, **16**, 2, 199–204.

<sup>164</sup> Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C.; Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, **77**, 1, 149–162.

<sup>165</sup> Soccol, C.; Ayala, L.; Soccol, V.; Krieger, N.; Santos, H. (1997). Spore production by entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* from de-classified potatoes by solid state fermentation. *Review of Microbiology*, **28**, 34–42.

### 2.5.7. Producción de bioetanol

Se ha investigado la FES como una tecnología alternativa para la producción de etanol a partir de residuos agroindustriales. Este proceso cuenta con una serie de ventajas como es la eliminación del proceso de extracción de los azúcares (reduciendo costes), reducción del volumen de reactor (debido a la eliminación de la adición de agua), disminución de los costes energéticos, etc.<sup>22</sup>

La mayoría de los estudios realizados en este campo han involucrado cultivos de levaduras,<sup>166</sup> aunque también se han utilizado cepas de bacterias como *Zymomonas mobilis* obteniendo buenos resultados.<sup>167</sup> Así, por ejemplo, Saucedo-Castaneda y col. estudiaron la hidrólisis del almidón mediante FES para la producción de etanol utilizando *Schwanniomyces castellii* obteniendo un buen rendimiento.<sup>168</sup>

### 2.5.8. Producción de otros compuestos de interés

Hay otra serie de compuestos que pueden obtenerse mediante FES entre los que se encuentran:

#### - Biopesticidas

En la actualidad ha adquirido un notable interés el uso de biopesticidas, compuestos respetuosos con el medio ambiente que se utilizan para combatir insectos y plagas que perjudican a la agricultura. Como nuevas estrategias de trabajo han cobrado

---

<sup>166</sup> Sandhu, D.; Joshi, V. (1997). Solid state fermentation of apple pomace for concomitant production of ethanol and animal feed. *Journal of Science and Industrial Research*, **56**, 86–90.

<sup>167</sup> Amin, G. (1992). Conversion of sugar beet particles to ethanol by the bacterium *Zymomonas mobilis* in solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, **114**, 499–504.

<sup>168</sup> Saucedo-Castaneda, B.; Lonsane, K.; Navarro, J.; Roussos, S.; Raimbault, M. (1992). Potential of using a single fermenter for biomass built-up, starch hydrolysis and ethanol production — solid state fermentation system involving *Schwanniomyces castellii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**, 47–61.

reciente notoriedad el uso de hongos entomopatógenos y micoparásitos para ser utilizados con este propósito.

Como ejemplo cabe destacar el proceso desarrollado por Soccol y col. basado en la FES de distintos sustratos agroindustriales para producir esporas de *Beauveria bassiana*, que posteriormente serían utilizadas en el control biológico de plagas que atacan a las plantaciones de banana, caña de azúcar, soja y café.<sup>22,165</sup>

#### - Compuestos aromáticos

La mayoría de los saborizantes se producen actualmente mediante síntesis química o extracción a partir de materiales naturales.<sup>22</sup> Sin embargo, recientes encuestas de mercado han demostrado que los consumidores prefieren los alimentos etiquetados como naturales. Las plantas han sido las fuentes más importantes de aceites esenciales y saborizantes pero su uso depende de factores naturales que dificultan su control, como son las condiciones meteorológicas y las enfermedades que padecen las mismas. Una ruta alternativa a la síntesis de saborizantes se basa en la biosíntesis microbiana o en la bioconversión.<sup>169</sup>

La capacidad conocida de algunos microorganismos (tanto bacterias como hongos) para la producción de compuestos aromáticos, ha reactivado el uso de la FES utilizando residuos agroindustriales tropicales como el bagazo de casava, la caña de azúcar, la cáscara y pulpa del café, etc.<sup>22,170,171,172,173</sup> A partir de sustratos naturales se

---

<sup>169</sup> Janssens, L.; de Pooter, H.; Vandamme, E.; Schamp, N. (1992). Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry*, **27**, 195–215.

<sup>170</sup> Berger, R. (1995). *Aroma Biotechnology*, Springer-Verlag, 240.

<sup>171</sup> Pandey, A.; Soccol, C. (1998). Bioconversion of biomass — a case study of lignocellulosics bioconversions in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **42**, 379–390.

<sup>172</sup> Pandey, A.; Soccol, C.; Nigam, P.; Soccol, V.; Vandenberghe, L.; Mohan, R. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues: II Cassava bagasse. *Bioresource Technology*, **74**, 69–80.

<sup>173</sup> Soccol, C.; Krieger, N. (1998). Brazilian experiments for the valorization of agro-industrial residues by solid state fermentation. *Advances in Biotechnology*. Pandey, A. (Ed.), New Delhi, India, 25–40.

pueden obtener compuestos aromáticos de bajo coste aptos para el consumo humano. Sin embargo, uno de los principales problemas que presenta este proceso es el aislamiento de los compuestos producidos, especialmente si muestran bajos puntos de ebullición.

Además de los ejemplos anteriores, en la tabla 2.7 se muestran otros productos de interés producidos mediante FES.

Producto	Microorganismo	Sustrato	Referencia
Pigmentos	<i>Monascus purpureus</i>	Bagazo de caña de azúcar	174
Carotenoides	<i>Penicillium</i> sp.	Maíz	175
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schwanniomyces castelli</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Torula utilis</i>	Orujo de manzana, sorgo dulce, patata dulce, remolacha azucarera, harina de trigo y almidón de arroz	172, 176, 177
Compuestos aromáticos	<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Ceratocystis frimbriata</i> , <i>B. subtilis</i>	Bagazo de caña de azúcar, bagazo de casava, cáscara de café, soja	176, 177, 178
Biosurfactantes	<i>Bacillus subtilis</i>	Residuos agroindustriales, melazas	179
Biopesticidas/ bioherbicidas	Hongos entomopatógenos y micoparásitos	Sorgo dulce, harina de arroz, agar de maíz perlado	40, 165, 180, 181

**Tabla 2.7: Otros compuestos de interés producidos por FES.<sup>22</sup>**

<sup>174</sup> Chiu, S.; Chan, S. (1992). Production of pigments by *Monascus purpureus* using sugarcane bagasse in roller bottle cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **8**, 68–70.

<sup>175</sup> Han, J. (1998). Sclerotia growth and carotenoid production by *Penicillium* sp. PT95 during solid state fermentation of corn meal. *Biotechnology Letters*, **20**, 1063–1065.

<sup>176</sup> Pandey, A.; Soccol, C.; Nigam, P.; Soccol, V. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues: I Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, **74**, 81–87.

<sup>177</sup> Kiransree, N.; Sridhar, M.; Rao, L.; Pandey, A. (1999). Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast. *Process Biochemistry*, **34**, 2, 115–119.

<sup>178</sup> Larroche, C.; Besson, I.; Gros, J. (1999). High pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid substrate fermentation on ground soybeans. *Process Biochemistry*, **34**, 6–7, 667–674.

<sup>179</sup> Makkar, R.; Cameotra, S. (1999). Biosurfactant production by micro-organisms on unconventional carbon sources. *Journal of Surfactants and Detergents*, **2**, 237–241.

<sup>180</sup> Desgranges, C.; Vergoignan, C.; Lereec, A.; Riba, G.; Durand, A. (1933). Use of solid state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of European cornborer. *Biotechnology Advances*, **11**, 577–587.

<sup>181</sup> Silman, R.; Bothast, R.; Schisler, D. (1993). Production of *Colletrichum truncatum* for use as a mycoherbicide — effects of culture, drying and storage on recovery and efficacy. *Biotechnology Advances*, **11**, 561–575.

## 2.6. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Las enzimas, biocatalizadores altamente específicos y eficientes, fueron descubiertas en la segunda mitad del siglo XIX. Los avances de la biotecnología en las últimas décadas, especialmente en genética e ingeniería de proteínas, han otorgado a las enzimas un papel fundamental dentro de los procesos industriales.<sup>182</sup>

La producción de enzimas es un campo que está en continuo crecimiento en el área de biotecnología con unas ventas anuales mundiales de aproximadamente dos billones de dólares.<sup>183</sup> La tendencia actual consiste en reemplazar algunos procesos químicos tradicionales por procesos biotecnológicos que impliquen microorganismos y/o enzimas. Entre sus ventajas se encuentran que constituyen una alternativa menos agresiva para el medio ambiente y además, son más rentables desde el punto de vista económico.<sup>184</sup>

Las enzimas son proteínas que intervienen como biocatalizadores en un gran número de reacciones. En los sistemas vivos las enzimas participan en la obtención de energía y nuevos materiales a partir de macromoléculas, siendo indispensables para el crecimiento, la reparación y el mantenimiento de las células.<sup>185</sup> Aunque todos los organismos podrían ser utilizados como fuente de producción de enzimas, para la aplicación comercial de las enzimas industriales los microorganismos son la fuente más importante, ya que producen una mayor cantidad y se puede mejorar su

---

<sup>182</sup> Alkorta, I.; Garbisu, C.; LLama, M.; Serra, J. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biotechnology*, **33**, 21-28.

<sup>183</sup> Greiner, R.; Konietzny, U. (2006). Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*, **44**, 125-140.

<sup>184</sup> Viikari, L.; Tenkanen, M.; Suurnäkki. (2001). Biotechnology in the pulp and paper industry. *Biotechnology*. Rehm HJ (Ed.), Weinheim-New York, **10**, 523-546.

<sup>185</sup> Ibrahim, C. (2008). Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. *Bioresource Technology*, **99**, 11, 4572-4582.

producción optimizando los parámetros físico-químicos o mediante manipulación genética. Además, las enzimas obtenidas a partir de microorganismos, especialmente las extracelulares, se extraen fácilmente mediante procesos de post-tratamiento con bajos costes. Es importante señalar que la elección del organismo productor de las enzimas determinará la estabilidad y viabilidad del sistema de producción.

Aproximadamente el 90% de todas las enzimas industriales son producidas por fermentación en cultivo sumergido, frecuentemente utilizando microorganismos manipulados genéticamente. Sin embargo, este proceso mejorado presenta altos costes de producción.<sup>5,185</sup>

Una alternativa interesante para la producción de enzimas y su aplicación podría ser la fermentación en estado sólido, debido a su elevado potencial para la producción de las mismas y por sus numerosas ventajas sobre la fermentación en cultivo sumergido.<sup>1</sup> La enzima en el crudo de FES está más concentrada, lo que presenta especial interés en procesos donde los productos del crudo fermentado pueden utilizarse directamente como fuente de enzimas sin etapas previas de purificación. Como ejemplos se pueden citar la elaboración de aditivos en la alimentación, la hidrólisis de materias lignocelulósicas y el procesado natural de fibras.<sup>22</sup>

Como ventaja adicional de la FES, cabe señalar la posibilidad de utilizar sólidos agrícolas o residuos agroindustriales como sustratos para el crecimiento microbiano.<sup>2,10,22,186,187,188</sup> Estos sustratos generalmente son los mejores para la FES y

---

<sup>186</sup> Couto, S.; Sanroman, M. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *Journal of Food Engineering*, **76**, 291-302.

<sup>187</sup> Panagiotou, G.; Kekos, D.; Macris, B.; Christakopoulos, P. (2003). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, **18**, 37–45.

<sup>188</sup> Hesseltine, C. (1972). Solid state fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, **14**, 517–532.

la producción de enzimas como pectinasas,<sup>189</sup> celulasas y xilanasas,<sup>190,191,192</sup> amilasas, ligninasas,<sup>8</sup> inulinasas,<sup>193</sup> chitinasas,<sup>194</sup> y fitasas.<sup>195,196,197</sup>

Otra ventaja a señalar de la FES frente a la FCS respecto a la obtención de enzimas se refiere a los costes de producción, que en la primera son, en muchos casos, inferiores. Por ejemplo, en la producción de celulasa, mientras que el crudo de fermentación de cultivo sumergido cuesta sobre 20 \$/kg, el de FES tiene un valor de 0,2 \$/kg.<sup>198</sup> De forma análoga, un análisis económico sobre la producción de la enzima lipasa con el hongo *Penicillium restrictum* demostró que el capital a invertir en cultivo sumergido era un 78% superior al del proceso en SSF, para una producción anual de 100 m<sup>3</sup>.<sup>199</sup>

---

<sup>189</sup> Martins, E.; Silva, D.; Da Silva, R.; Gomes, E. (2002). Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, **37**, 949–954.

<sup>190</sup> Carmona, E.; Fialho, M.; Buchgnani, E.; Coelho, G.; Brocheto-Braga, M.; Jorge, J. (2005). Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. *Process Biochemistry*, **40**, 359–364.

<sup>191</sup> Kang, S.; Park, Y.; Lee, J.; Hong, S.; Kim, S. (2004). Production of cellulose and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **91**, 153–156.

<sup>192</sup> Kalogeris, E.; Christakopoulos, P.; Katapodis, P.; Alexiou, A.; Vlachou, S.; Kekos, D.; Macris, B. (2003). Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. *Process Biochemistry*, **38**, 1099–1104.

<sup>193</sup> Mazutti, M.; Bender, J.; Treichel, H.; Di Luccio, M. (2006). Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 56–59.

<sup>194</sup> Binod, P.; Pusztahelyi, T.; Nagy, V.; Sandhya, C.; Szakacs, G.; Pocs, I.; Pandey, A. (2005). Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **36**, 880–887.

<sup>195</sup> Roopesh, K.; Sumitra Ramachandran, K.; Nampoothiri, M.; Szakacs, G.; Pandey, A. (2006). Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource Technology*, **97**, 506–511.

<sup>196</sup> Chantasartrasamee, K.; Israngkul, D.; Intarareugsorn, A.; Dharmsthiti, S. (2005). Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. *Process Biochemistry*, **40**, 2285–2289.

<sup>197</sup> Papagianni, M.; Nokes, S.; Filer, K. (1999). Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solidstate fermentation. *Process Biochemistry*, **35**, 397–402.

<sup>198</sup> Tengerdy, R. (1996). Cellulase production by solid substrate fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**, 313–316.

<sup>199</sup> Castilho, L.; Polato, C.; Baruque, E.; Sant'Anna Jr., G.; Freire, D. (2000). Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, **4**, 3, 239–247.

Una ventaja adicional de la producción de enzimas mediante FES es la estabilidad de las mismas cuando se producen a altas temperaturas o pH extremos.<sup>58,200</sup>

En la tabla 2.8 se muestran algunos ejemplos de enzimas obtenidas por fermentación en estado sólido a partir de residuos agroindustriales.

Enzima	Microorganismo	Sustrato
Celulasa, $\beta$ -glucosidasa, carboximetilcelulasa, lacasa, poligalacturonasa, ligninasa	Cepas de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Lentinula</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Pleurotus</i> sp., <i>Neurospora</i> sp., <i>Sporotrichum</i> sp., <i>Cerrena</i> sp., <i>Botrytis</i> sp., <i>Gliocladium</i> sp., <i>Phanerochaete</i> sp., etc.	Bagazo, fibra de coco, piel de arroz, paja de arroz, salvado de trigo, paja de trigo, residuo de té, sorgo dulce, ensilaje, pulpa de remolacha azucarera, serrín, orujo de uva, residuo de aceite de palma, residuo de casava, cáscara de soja, etc.
Xilanasa, $\beta$ -xilosidasa, $\alpha$ -arabinofuranosidasa, acetoesterasa, catecoloxidasa	Cepas de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Phlebia radiata</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>Melanocarpus albomyces</i> , <i>P. sanguineus</i> , <i>Thermomyces lanuginosa</i> , <i>Humicola lanuginosa</i> , <i>Thermascus aurantiacus</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> , <i>Thermomonospora</i> sp.	Paja de arroz, cáscara de maíz, mazorca de maíz, salvado de trigo, paja de trigo, bagazo, tallo de arroz, cáscara de soja, pulpa de remolacha azucarera, cáscara de arroz, orujo de manzana, residuo del procesado del café, paja de cebada, paja de avena
Lacasa, Li-peroxidasa, Mn-peroxidasa, aril-alcoholoxidasa, catalasa, fenol oxidasa,	Cepas de <i>Penicillium</i> sp., <i>Pleurotus</i> sp., <i>Phlebia radiata</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Polyporus</i> sp., <i>Panus tigrinus</i> , <i>Trichoderma versicolor</i> .	Bagazo, salvado de trigo, paja de trigo, serrín, tallo de algodón, polvo de celulosa, virutas de madera

<sup>200</sup> Deschamps, F.; Huet, M. (1985). Xylanase production in solid-state fermentation: a study of its properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **22**, 177–180.

(Continuación de la tabla anterior)

Enzima	Microorganismo	Sustrato
Proteasas	Cepas de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp.	Salvado de trigo, harina de girasol, salvado de arroz, salvado de maíz, cáscara de arroz, madera de álamo, residuo de patata dulce
Lipasas	Cepas de <i>Candida</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Neurospora sitophila</i> , <i>P.candidum</i> , <i>Mucor</i> sp.	Salvado de trigo, torta de cacahuets triturados, torta de coco, salvado de arroz

**Tabla 2.8. Algunas de las enzimas producidas mediante fermentación en estado sólido.<sup>22</sup>**

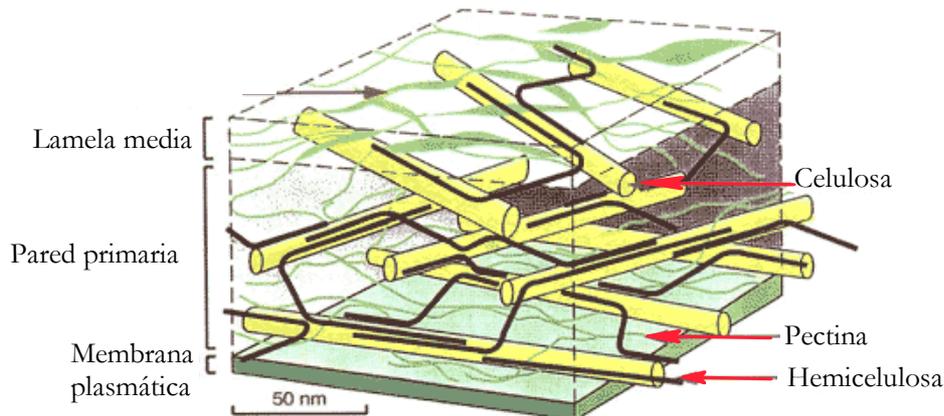
A continuación, se describirán con mayor detalle las características principales de las enzimas hidrolíticas obtenidas mediante FES.

### 2.6.1. Enzimas hidrolíticas

Dentro de las enzimas, las hidrolíticas tienen una gran aplicación en la industria textil, en la de producción de zumos y extractos de frutas, de la pulpa y el papel y en la alimentaria. La mayoría de estas enzimas degradan polisacáridos de la pared celular vegetal, como celulosas, hemicelulosas y pectinas.

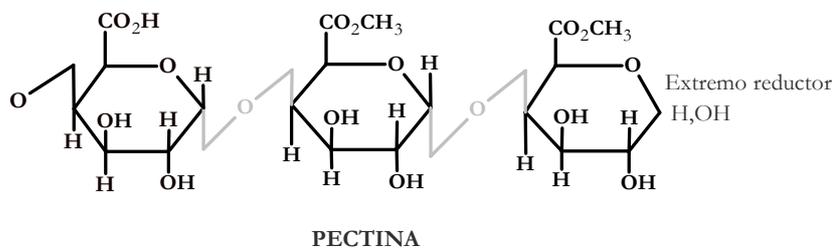
#### 2.6.1.1. Pectinasas

La pectina es un complejo heteropolisacárido que se encuentra en la lamela media de las plantas y en la pared celular.



**Figura 2.6: Estructura de la pared celular de las plantas.**

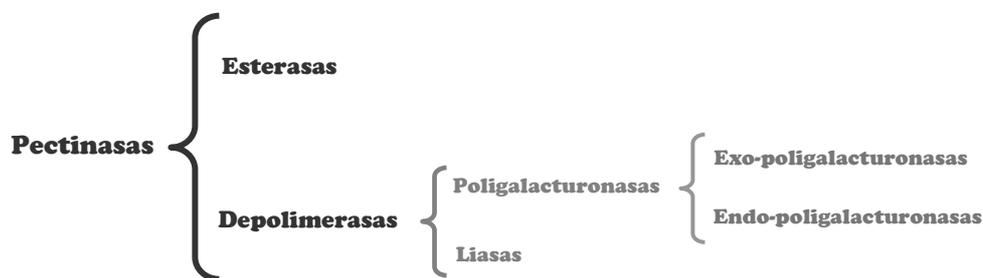
La pectina está formada principalmente por cadenas de ácido D-galacturónico, que forman cadenas homogalacturonadas con diferentes porcentajes de ésteres metilo unidos por enlace  $\alpha$ -[1,4].<sup>201</sup> El ácido galacturónico se presenta en forma de cadenas de zig-zag con ramificaciones cortas de azúcares neutros (L-ramnosa, D-glucosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-galactosa).



**Figura 2.7: Estructura de la pectina.**

<sup>201</sup> BeMiller, J. (1986). An introduction to pectins: structure and properties. *Chemistry and Function of Pectins*. Fishman and Jen Editors, Washington, 2–12.

Las enzimas que degradan la pectina pueden clasificarse en función del modo de ataque a la parte galacturonada de la molécula de pectina en esterasas (pectinesterasas) y depolimerasas (hidrolasas y liasas).<sup>202</sup> Las pectinesterasas son capaces de de-esterificar la pectina mediante la hidrólisis del grupo metil éster, mientras que las depolimerasas rompen la cadena principal.<sup>201</sup> Las depolimerasas se dividen en poligalacturonasas (PG), las cuales rompen los enlaces glicosídicos por hidrólisis, y liasas (PL), las cuales rompen los enlaces glicosídicos por  $\beta$ -eliminación de las unidades de ácido D-galacturónico esterificadas.<sup>203</sup>



**Figura 2.8: Clasificación general de las pectinasas.**

Dentro de las poligalacturonasas se encuentra la exo-poligalacturonasa, que hidroliza los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -[1,4] entre dos ácidos D-galacturónicos adyacentes.<sup>204</sup>

Las poligalacturonasas producidas por hongos tienen distintas aplicaciones industriales, que se muestran resumidas en la figura 2.9.<sup>205</sup>

<sup>202</sup> Annapurna, S.; Ramakrishna, M.; Appu, A. (1999). Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. *Process Biochemistry*, **35**, 411-417.

<sup>203</sup> Masoud, W.; Jespersen, L. (2006). Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology*, **110**, 3, 291-296.

<sup>204</sup> Parenicová, L. (2000). Pectinases of *Aspergillus niger*: a molecular and biochemical characterisation. *Thesis*, Wageningen.

<sup>205</sup> Jain, S.; Durand, H.; Tiraby, G. (1990): Production of extracellular pectinase enzymes by a mutant (Po16) of *Penicillium occitanis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **34**, 308-312.



**Figura 2.9: Principales aplicaciones de las pectinasas.**

También se han investigado nuevas aplicaciones de estas en la producción de oligogalacturónidos como componentes funcionales de alimentos.<sup>206</sup>

Las poligalacturonasas son producidas por plantas y por microorganismos como bacterias del género *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Xantomonas* y *Erwinia* y por los hongos *Aspergillus* y *Penicillium*.<sup>207</sup> La mayoría de las preparaciones comerciales de pectinasas se obtienen a partir de hongos, especialmente del género *Aspergillus*, como

---

<sup>206</sup> Lang, C.; Dornenburg, H. (2000). Perspectives in the biological function and the technological application of poygalacturonases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **53**, 366-375.

<sup>207</sup> Aguilar, G.; Huitron, C. (1987). Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus sp.* by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme and Microbial Technology*, **9**, 690-696.

*A. niger*, *A. oryzae* y *A. wentii*, ya que los hongos producen diferentes enzimas extracelulares con actividad pectinolítica.

La fermentación en estado sólido ha sido utilizada por varios autores para la producción de pectinasas utilizando como sustratos diferentes sólidos agrícolas o residuos agroindustriales como el salvado de trigo,<sup>17,208</sup> el salvado de soja,<sup>209</sup> el orujo de manzana,<sup>210</sup> el orujo de arándano y fresa,<sup>211</sup> la pulpa de remolacha azucarera,<sup>212</sup> la cáscara y la pulpa de café,<sup>130</sup> el cacao,<sup>213</sup> la cáscara de naranja y limón,<sup>214</sup> el bagazo de caña de azúcar,<sup>215</sup> etc.

#### 2.6.1.2. Xilanasas

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas de gran aplicación industrial, que hidrolizan al azar los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 del xilano para producir varios xilo-oligómeros.<sup>216</sup>

---

<sup>208</sup> Castilho, L.; Alves, T.; Medronho, R. (1999). Recovery of pectinolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, **34**, 181–186.

<sup>209</sup> Castilho, L.; Alves, T.; Medronho, R. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, **71**, 45–50.

<sup>210</sup> Hours, R.; Voget, C.; Ertola, R. (1998). Some factories affecting pectinase production from apple pomace in solid states cultures. *Biological Wastes*, **24**, 147–157.

<sup>211</sup> Zheng, Z.; Shetty, K. (2000). Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochemistry*, **35**, 825–830.

<sup>212</sup> Spagnuolo, M.; Crecchio, C.; Pizzigallo, M.; Ruggiero, P. (1997). Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp. *Bioresource Technology*, **60**, 215–222.

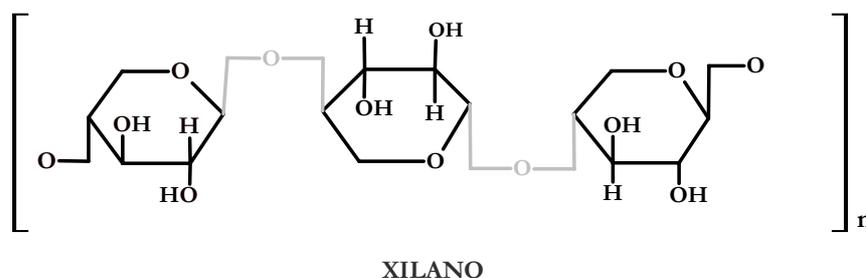
<sup>213</sup> Schwan, R.; Cooper, R.; Wheals, A. (1997). Endopolygalacturonase secretion by *hyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, **21**, 234–244.

<sup>214</sup> Garzón, C.; Hours, R. (1992). Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. *Bioresource Technology*, **39**, 93–95.

<sup>215</sup> Acuña-Argüelles, M.; Gutiérrez-Rojas, M.; Viniestra-González, G.; Favela-Torres, E. (1994). Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH<sub>4</sub> on solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, **16**, 23–28.

<sup>216</sup> Tseng, M.; Yap, M.; Ratanakhanokchai, K.; Kyu, K.; Chen, S. (2002). Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **30**, 5, 590-595.

El xilano, el polímero más abundante de las hemicelulosas de la pared de las células vegetales, tiene una estructura lineal que consiste en residuos de xilosa unidos por enlace  $\beta$ -1,4 que, dependiendo del origen, pueden contener ramificaciones de L-arabinofuranosil, acetil, glucuronosil y residuos (1-4) de 4-O-metilglucuronosil.<sup>217</sup>



**Figura 2.10: Estructura del xilano.**

Constituye entre el 20 y el 40 % de la biomasa total de la planta, por lo que su hidrólisis es muy importante para el aprovechamiento del material lignocelulósico más abundante en la naturaleza.<sup>218,219,220,221,222</sup>

La hidrólisis química del xilano es ampliamente utilizada en las industrias. A pesar de tratarse de un proceso rápido, está acompañada por la formación de compuestos tóxicos y peligrosos para el medio ambiente.<sup>221</sup>

<sup>217</sup> Silveira, F.; Ximenes, F.; Cacaís, A.; Milagres, A.; Medeiros, C.; Puls, J.; Filho, E. (1999). Hydrolysis of xylans by enzyme systems from solid cultures of *Trichoderma harzianum* strains. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **32**, 947-952.

<sup>218</sup> Ninawe, S.; Kapoor, M.; Chander, R. (2008). Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology*, **99**, 5, 1252-1258.

<sup>219</sup> Kuhad, R.; Singh, A. (1993). Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, **13**, 151-172.

<sup>220</sup> Kuhad, R.; Singh, A.; Eriksson, K. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell wall. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **57**, 47-125.

<sup>221</sup> Beg, Q.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**, 326-338.

<sup>222</sup> Polizeli, M.; Rizzattim, A.; Monti, R.; Terenzi, H.; Jorge, J.; Amorim, D. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **67**, 577-591.

La hidrólisis del xilano mediante el uso de enzimas como las xilanasas constituye una alternativa viable a la hidrólisis química de este polisacárido, debido a su alta especificidad y a que se trata de un proceso respetuoso con el medio ambiente.<sup>223</sup> Esto explica el continuo esfuerzo en esta dirección y la estimulación para la investigación en hemicelulasas microbianas.

El sistema de enzimas xilanolíticas que degradan el xilano se compone normalmente de un conjunto de enzimas hidrolíticas:  $\beta$ -1,4-endoxilanasas,  $\beta$ -xilosidasas,  $\alpha$ -1-arabinofuranosidasas,  $\alpha$ -glucuronidasas, acetil xilano esterasa, y ácido fenólico (ácidos ferúlico y p-cumárico) esterasa.<sup>221</sup>

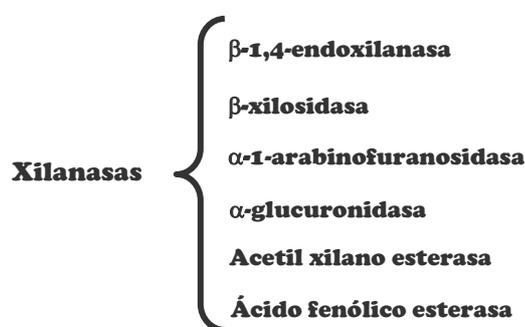


Figura 2.11: Principales tipos de xilanasas.

La aplicación más importante de estas enzimas es su utilización en el proceso del blanqueado en la industria de la pulpa y el papel, ya que disminuyen la cantidad de cloro necesaria para el proceso y, en consecuencia, disminuyen el impacto medio ambiental del proceso.<sup>224,225,226,227,228,229,230,231</sup> De esta forma, la adición de xilanasas antes

<sup>223</sup> Bajpai, P. (1997). Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*, **43**, 141–194.

<sup>224</sup> Viikari, L.; Kantelinen, A.; Sundquist, J.; Linko, M. (1994). Xylanase in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews*, **13**, 335–350.

<sup>225</sup> Bajpai, P. (2004). Biological bleaching of pulps. *Critical Reviews in Biotechnology*, **24**, 1–58.

<sup>226</sup> Ninawe, S.; Kuhad, R. (2006). Bleaching of wheat straw-rich soda pulp with xylanase from a thermoalkalophilic *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology*, **97**, 2291–2295.

del proceso del blanqueo permite reemplazar entre el 20 y el 30% del cloro necesario y reducir al 50% los compuestos orgánicos halogenados que se generan.

Las xilanasas tienen otras aplicaciones industriales, resumiéndose en la figura 2.12.



**Figura 2.12: Principales aplicaciones de las xilanasas.** <sup>220,221,232,233</sup>

---

<sup>227</sup> Kapoor, M.; Kapoor, R.; Kuhad, R. (2007). Differential and synergistic effects of xylanase and laccase mediator system (LMS) in bleaching of soda and waste pulps. *Journal of Applied Microbiology*, **103**, 2, 305-317.

<sup>228</sup> Senior, D.; Hamilton, J.; Bernier, R.; Dumanoir, J. (1992). Reduction in chlorine use during bleaching of kraft pulp following xylanase treatment. *Tappi Journal*, **11**, 125-130.

<sup>229</sup> Mutsaers, J. (1991). Xylanase in breadmaking. *Xylans and Xylanases*. International Symposium, Amsterdam, 48.

<sup>230</sup> Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnology*, **3**, 286-290.

<sup>231</sup> Wong, K.; Tan, L.; Saddler, J. (1988). Multiplicity of  $\beta$ -1,4 xylanase in microorganisms: functions, properties and applications. *Microbiology Review*, **52**, 305-317.

<sup>232</sup> Bedford, M.; Classen, H. (1992). The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chick. *Xylans and Xylanases*, Elsevier, Amsterdam, 361-370.

2.6.1.3. Celulasas

Las celulasas son un grupo de enzimas hidrolíticas de gran aplicación industrial, que están constituidas por un sistema enzimático complejo compuesto por 1,4- $\beta$ -D-glucanasa, exo-1,4- $\beta$ -glucanasa y  $\beta$ -D-glucosidasa.

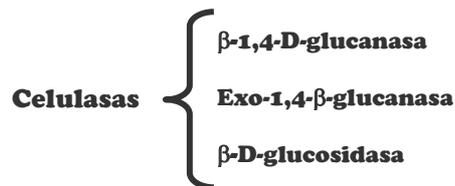


Figura 2.13: Composición del complejo enzimático celulasa.

La celulosa consiste en una estructura simple constituida por un homopolímero de unidades de glucosa unidas mediante un enlace glicosídico  $\beta$ -1,4.

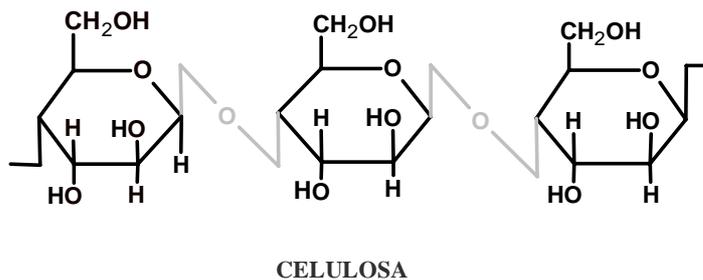


Figura 2.14: Estructura de la celulosa.<sup>2</sup>

La comunidad científica ha mostrado un gran interés por estas enzimas por su aplicación industrial en el procesado de la celulosa, en la producción de alimento para animales, en la fermentación alcohólica de granos, en la extracción de zumos de

<sup>233</sup> Kapoor, M.; Kuhad, R. (2007). Immobilization of xylanase from *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in production of xylo-oligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **142**, 2, 125-138.

frutas y verduras, en la industria de la pulpa y el papel, en las industrias textil, alimentaria, química, de combustibles, etc.<sup>164,234,235,236</sup>

Estas enzimas también se han utilizado junto con hemicelulasas para conseguir una conversión eficaz de la biomasa lignocelulósica en combustible.<sup>191,237</sup> Además, los hidrolizados enzimáticos producidos tras la actuación de celulasas y hemicelulasas se han utilizado como sustrato para la producción de sustancias de gran interés como productos químicos (polifenoles, ácidos orgánicos, etc.) y disolventes (acetona, butanol, etc).<sup>219</sup>

La producción de estas enzimas mediante fermentación en estado sólido, utilizando como sustratos materiales lignocelulósicos, es muy interesante ya que su obtención a partir de celulosa pura es muy costosa.<sup>238,239,240</sup>

## 2.6.2. Concentración y purificación de extractos enzimáticos

Se ha comentado anteriormente que la FES tiene un interés especial en procesos industriales en los que puede utilizarse directamente el crudo de fermentación. Sin embargo, hay procesos que requieren enzimas puras, en cuyo caso es necesario

---

<sup>234</sup> Gao, J.; Weng, H.; Zhu, D.; Yuan, M.; Guan, F.; Xi, Y. (2008). Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*, **99**, 16, 7623-7629.

<sup>235</sup> Adsul, M.; Bastawde, K.; Varma, A.; Gokhale, D. (2007). Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. *Bioresource Technology*, **98**, 1467-1473.

<sup>236</sup> Kaur, J.; Chadha, B.; Kumar, B.; Saini, H. (2007). Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Bioresource Technology*, **98**, 74-81.

<sup>237</sup> Mielenz, J. (2001). Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*, **4**, 324-329.

<sup>238</sup> Yang, X.; Chen, H.; Gao, H.; Zuohu, L. (2001). Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, **78**, 3, 277-280.

<sup>239</sup> Gupte, A.; Madamwar, D. (1997). Solid state fermentation of lingocellulosic waste for cellulase and  $\beta$ -Glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. *Biotechnology Progress*, **13**, 166-169.

<sup>240</sup> Chahal, P.; Chahal, D. (1996). Production of cellulase in solid state fermentation with *Trichoderma reesei* MCG80 on wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **57/58**, 433-442.

purificarlas. Para ello en la bibliografía se describen diferentes métodos que se utilizan con este propósito y que serán detallados en la introducción del Capítulo 5.

Para la aplicación de los extractos enzimáticos obtenidos tras la fermentación en un determinado proceso industrial, es importante que la enzima se encuentre disuelta en el menor volumen posible, principalmente en la industria alimentaria, para que el medio sobre el que se va a adicionar no se vea alterado. Por este motivo, también resulta interesante concentrar las enzimas presentes en los crudos obtenidos tras la fermentación, utilizando distintos métodos que se explicarán en profundidad en el Capítulo 5.





# 3

DESARROLLO DE FERMENTACIONES EN ESTADO  
SÓLIDO SOBRE ORUJO DE UVA PARA LA  
PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS



### 3.1. INTRODUCCIÓN

En el Capítulo 2 se presentó la fermentación en estado sólido (FES) como una alternativa muy interesante para el aprovechamiento de los residuos agroindustriales, que permite obtener productos de alto valor añadido como son las enzimas. A pesar de esta potencialidad, es habitual que los residuos naturales que normalmente se utilizan para la producción de las enzimas carezcan de algunos de los nutrientes necesarios para un crecimiento óptimo del microorganismo, o bien estén disponibles en bajas concentraciones. En estos casos, el sustrato debe suplementarse para estimular o mejorar la producción enzimática mediante la adición de una fuente de carbono apropiada (como maltosa, sacarosa, pectina cítrica, glucosa, fructosa, glicerol, lactosa, almidón soluble o manitol), de nitrógeno (como sulfato amónico o fosfato, extracto de levadura, peptona, triptona, extracto de malta, extracto de ternera, cloruro amónico, nitrato sódico), u otros compuestos como aminoácidos, vitaminas, etc.<sup>241,242,243,244,245,246</sup>

La suplementación también puede llevarse a cabo mediante el ajuste de la humedad inicial del residuo con una solución que contenga sales inorgánicas como KCl, MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O u orgánicas

---

<sup>241</sup> Mahanta, N.; Gupta, A.; Khare, S. (2008). Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. *Bioresource Technology*, **99**, 4572-4582.

<sup>242</sup> Patil, S.; Dayanand, A. (2006). Exploration of Regional Agrowastes for the Production of Pectinase by *Aspergillus niger*. *Food Technology and Biotechnology*, **44**, 289-292.

<sup>243</sup> Galiotou-Panayotou, M.; Kapantai, M. (1993). Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin. *Letters of Applied Microbiology*, **17**, 145-148.

<sup>244</sup> Sodhi, H.; Sharma, K.; Gupta, J.; Soni, S. (2005). Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry*, **40**, 525-534.

<sup>245</sup> Khandeparkar, R.; Bhosle, N. (2005). Bleach-enhancing abilities of *Thermomyces lanuginosus* xylanases produced by solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **40**, 3230-3235.

<sup>246</sup> Gao, J.; Weng, H.; Zhu, D.; Yuan, M.; Guan, F.; Xi, Y. (2006). Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology*, **97**, 2054-2058

como acetato sódico,<sup>244,247,248,249</sup> o bien por combinación con otros residuos sólidos. Como ejemplo de esta última opción, en la bibliografía se recoge el uso de mezclas de trigo y bagazo de naranja,<sup>250</sup> salvado de algodón y pulpa de naranja,<sup>251</sup> paja de arroz y salvado mezclados con serrín (para la producción de xilanasas y celulasas),<sup>252</sup> mezcla de salvado de trigo con salvado de soja (para producir enzimas lignocelulíticas), etc.<sup>253</sup>

En este trabajo se ha utilizado orujo de uva como sustrato de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas. Sin embargo, la composición de este residuo (en el que la fibra ronda el 50% de su masa total) cambia en función de la estación, el tipo de uva, las condiciones ambientales, etc., por lo que no es fácil asegurar productividades enzimáticas reproducibles. Por este motivo, en el presente capítulo se presenta un protocolo para el ajuste de la composición de nutrientes del orujo de uva con el fin de mejorar la producción de algunas enzimas hidrolíticas de interés industrial. Este proceso consiste en el lavado inicial del sustrato sólido para eliminar el exceso de azúcares reductores y el enriquecimiento posterior con otros nutrientes.

---

<sup>247</sup> Liu, J.; Yuan, X.; Zeng, G.; Shi, J.; Chen, S. (2006). Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 732-742

<sup>248</sup> Christopher, L.; Bissoon, S.; Singh, S.; Szendefy, J.; Szakacs, G. (2005). Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **40**, 431-435.

<sup>249</sup> Virupakshi, S.; Babu, K.; Gaikwad, S.; Naik, G. (2007). Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *Journal of Food Engineering*, **81**, 54-59.

<sup>250</sup> Martin, N.; Guez, M.; Leite, R.; Da Silva, R.; Gomes, E. (2007). Study of pectinase produced by thermophilic fungi *Rhizomucor* sp. N31 in FES. *Journal of Biotechnology*, **131**, 2, Supplement 1, S158.

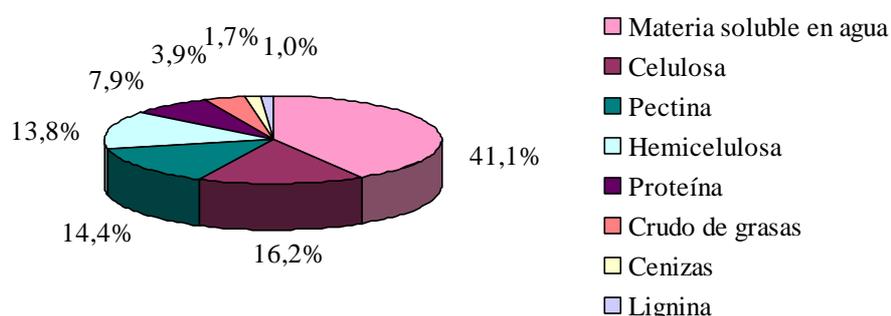
<sup>251</sup> Neves, E.; Buzon, R.; Lopes, A.; Alvares, M.; da Silva, R.; Gomes, E. (2007). Production and evaluation of exogenous fibrolytic enzymes in presence of the rumen fluid and in vitro digestibility of tropical forage using enzymatic complex. *Journal of Biotechnology*, **131**, 2, Supplement 1, S227.

<sup>252</sup> Liu, J.; Yuan, X.; Zeng, G.; Shi, J.; Chen, S. (2006). Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, **41**, 11, 2347-2351.

<sup>253</sup> Papinutti, V.; Forchiassin, F. (2007). Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *Journal of Food Engineering*, **81**, 1, 54-59.

La reducción de la concentración inicial de los azúcares reductores del orujo de uva mediante el lavado permite estimular la producción de enzimas hidrolíticas.<sup>254,255</sup> Así, por ejemplo, Farani y col. realizaron un lavado previo de la caña de azúcar antes de utilizarla como sustrato de fermentación para la producción de xilanasas.<sup>256</sup> Como inconveniente destacar que con la operación de lavado se solubilizan otras sustancias necesarias para el metabolismo del microorganismo, de ahí que sea necesaria su suplementación con distintos nutrientes o residuos agrarios. Con este propósito se decidió utilizar una mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja como sustrato sólido para el desarrollo de las fermentaciones. La cáscara de naranja es un residuo rico en fibras como pectina, celulosa y hemicelulosa y además es abundante y fácil de conseguir.

La composición de las cáscaras de naranja secas expresada en % (peso) se muestra en el siguiente diagrama de sector:<sup>17</sup>



**Figura 3.1: Composición de las cáscaras de naranja.**

<sup>254</sup> Gan, Q.; Allen, S.; Taylor, G. (2003). Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*, **38**, 7, 28, 1003-1018.

<sup>255</sup> Gan, Q.; Allen, S.; Taylor, G. (2002). Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, **12**, 223-229.

<sup>256</sup> Farani, D.; Marque de Souza, C.; Peralta, R. (2001). Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamaritii* in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **36**, 8-9, 835-838.

Como puede apreciarse en la figura 3.1, el material soluble está compuesto por un 14,6 % de glucosa, 15,5% de fructosa y 10,9% de sacarosa.

La piel es el principal subproducto de la industria del procesado de los cítricos y constituye aproximadamente el 50% del peso de la fruta fresca. Uno de los principales problemas que presentan estas fábricas es la acumulación de grandes cantidades de cáscaras frescas. Normalmente, las industrias que producen zumos a partir de cítricos secan el residuo y lo venden como materia prima para la extracción de la pectina y el pelletizado de alimento para animales. El problema radica en que se trata de procesos que aportan bajos beneficios.

Al igual que para otros residuos obtenidos del procesado de alimentos, se han propuesto varias transformaciones microbianas de la cáscara de los cítricos para la producción de sustancias de alto valor añadido como son el biogas, etanol, ácido cítrico, productos químicos, varias enzimas, compuestos volátiles saborizantes, ácidos grasos y biomasa microbiana, entre otros.<sup>17</sup>

### **3.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO**

Los principales objetivos que se pretenden conseguir durante el desarrollo de este capítulo son:

- Evaluar el orujo de uva lavado como sustrato de fermentación en estado sólido para la producción de las enzimas xilanasas, exo-PG y celulasa, estudiando distintas soluciones para ajustar su humedad inicial.
- Estudiar el orden de magnitud de las actividades enzimáticas alcanzadas a partir de la FES de las cáscaras de naranja.
- Evaluar la mezcla constituida por orujo de uva y cáscaras de naranja como posible sustrato de fermentación para la producción de las enzimas en estudio, comparando los resultados con los obtenidos tras el empleo de cada sustrato de forma independiente.



### 3.3. MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente apartado se describirán los distintos medios fermentativos utilizados para el crecimiento celular mediante fermentación en estado sólido, los métodos de ajuste de la humedad de dichos medios e inoculación, así como los protocolos de fermentación y medida de la actividad enzimática.

#### 3.3.1. Preparación del medio de fermentación

Para el análisis de las mejores condiciones de crecimiento del hongo se evaluaron cuatro medios de fermentación distintos; uno sintético y tres naturales. La justificación de su uso se describe a continuación.

##### 3.3.1.1. Medio sintético

Se realizó un estudio preliminar con idea de evaluar el orden de magnitud en el que se obtenían las enzimas en estudio utilizando el hongo *Aspergillus awamori*. Para ello, se empleó un medio típico para el crecimiento de hongos, que contenía como única fuente de carbono xilano y pectina, inductores de xilanasas y pectinasas, respectivamente.

El medio de cultivo sintético estaba compuesto por 1 g/L de peptona, 0,5 g/L de extracto de levadura, 15 g/L de agar, 3,5 g/L de xilano y 3,5 g/L pectina. Para el desarrollo de las fermentaciones, se adicionaron 20 mL de dicho medio a erlenmeyers de 100 mL.

### 3.3.1.2. Orujo de uva natural

Se utilizó como sustrato natural de fermentación orujo de uva blanca de la variedad *Palomino Fino*, procedente de la bodega “Domeq” en Jerez de la Frontera. La composición en peso seco que se midió en una muestra de orujo seco fue de 47,9% de hollejo, 43,7% de semilla y 8,4% de raspón.

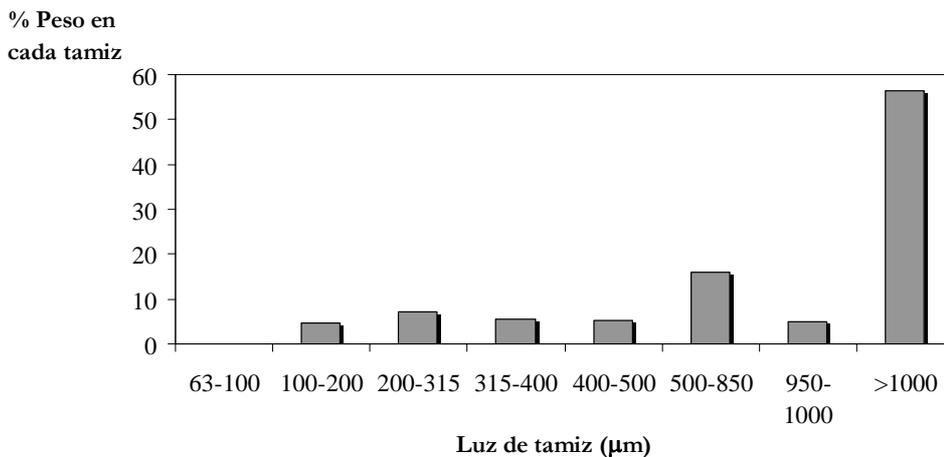
El sólido se recogió a la salida de la prensa horizontal, en la cual la uva es prensada para la extracción del mosto. Por tratarse de una de las etapas iniciales a la que el orujo es sometido en la bodega, este aún contenía una elevada concentración de azúcares, concretamente de 1,009 mmol/gss (mmol de azúcar por gramo de sólido seco).



**Figura 3.2: Orujo de uva molido y seco.**

El orujo recogido se almacenó en un congelador a -20°C para su mejor conservación hasta su posterior uso. Para su utilización, se secó en una estufa a 60°C durante 48 horas, posteriormente se molió en un molino comercial y se mezcló para que resultara lo más homogéneo posible.

Un factor importante en el desarrollo de la FES es el tamaño de partícula. Debido a ello, se realizó un estudio de la distribución del tamaño de partícula en el sólido una vez molido, aplicando un tamizado. Para llevarlo a cabo, se introdujo una porción del sólido en un tamiz (Retsch AS200), operando con una amplitud de 60 y un tiempo de 50 minutos, obteniéndose la siguiente distribución:



**Figura 3.3: Distribución de tamaño de partícula del orujo de uva molido y seco.**

Como puede apreciarse en la figura 3.3, en las condiciones de trabajo el 56,3% en peso del sólido está constituido por partículas de más de 1 mm.

Antes de su uso, el sólido molido se sometió a dos ciclos de esterilización de 20 min a 120 °C en el autoclave.

### 3.3.1.3. Orujo de uva lavado

En el apartado de Discusión de resultados, se explicará cómo la concentración de azúcares reductores en el orujo de uva (descrito en el apartado 3.3.1.2) era tan alta que inhibía la producción de las enzimas en estudio. Por este motivo, en este trabajo se plantea el lavado del orujo de uva como una posible alternativa para reducir el contenido de azúcares reductores del medio. Para el lavado se pusieron en contacto 500 g de sólido con 5 litros de agua durante media hora. Transcurrido este tiempo, el sólido se filtró a vacío con ayuda de un embudo buchner y se mezcló con otros 5 litros de agua limpia, repitiendo el mismo proceso. Posteriormente, el sólido filtrado se lavó dos veces más con 2 litros de agua en cada ciclo. Finalmente, se secó en una

estufa a 60°C durante 48 horas y se esterilizó dos veces en el autoclave (a 120°C durante 20 minutos) antes de ser utilizado.

#### 3.3.1.4. Cáscaras de naranja

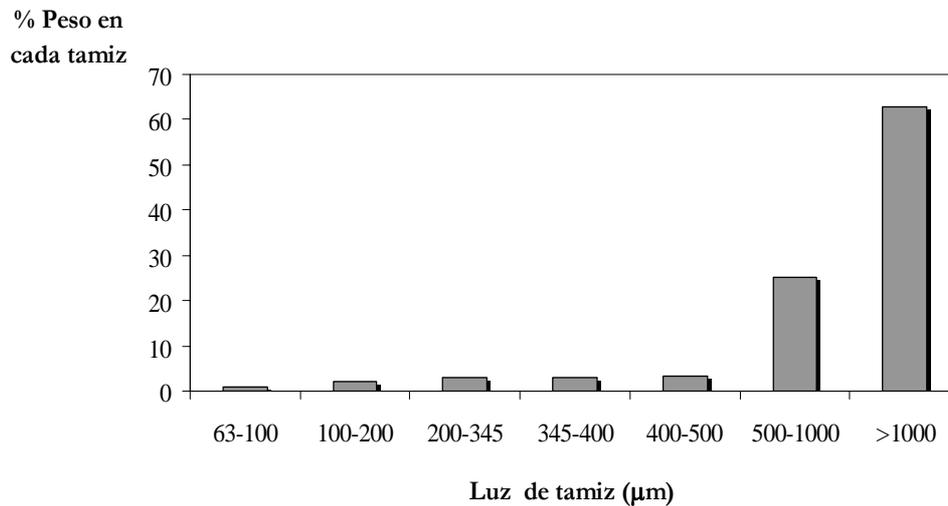
Como se detallará en el apartado 3.4.4 de Discusión de resultados, las actividades enzimáticas obtenidas con el orujo de uva lavado eran muy bajas, principalmente para la exo-PG. Este hecho podría deberse al empobrecimiento del sólido por la solubilización de sales minerales y otras sustancias esenciales para el crecimiento del hongo y, en consecuencia, para la producción de enzimas. Por este motivo, tal y como se comentó en la Introducción de este capítulo, se complementó el orujo de uva lavado con otro residuo como son las cáscaras de naranja, que contiene entre otras sustancias pectina, la cual podría inducir la producción de pectinasas.

Antes de utilizar una mezcla de estos dos sustratos, se evaluaron las cáscaras de naranja como único sustrato de fermentación para la producción de las enzimas objeto de estudio. Las cáscaras de naranja a utilizar en los experimentos, de la variedad *Washington Navel*, se recogieron en un extractor comercial tras la extracción del zumo y se almacenaron en un congelador a -20°C para su conservación. Para su uso, se lavaron varias veces con abundante agua con objeto de eliminar los azúcares reductores que podrían inhibir la producción de las enzimas hidrolíticas. Posteriormente, se molieron y secaron a 60°C durante 48 horas y, finalmente, se sometieron a dos ciclos de esterilización de 20 min a 120°C.



**Figura 3.4:** Cáscaras de naranja lavadas molidas y secas.

Como ya se comentó anteriormente, el tamaño de partícula es un factor muy importante a tener en cuenta en un proceso de FES. Por este motivo, se estudió la distribución de tamaño de partícula de las cáscaras de naranja molidas y secas, de igual forma que se hizo para el orujo de uva.



**Figura 3.5:** Distribución de tamaño de partícula de las cáscaras de naranja lavadas, molidas y secas.

Como se observa en la figura 3.5, el 62,8% en peso está constituido por partículas de más de 1 mm y el 25,1% por aquellas que presentan un tamaño comprendido entre 500 y 1000  $\mu\text{m}$ .

#### 3.3.1.5. Mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja

Como se explicará en el apartado 3.4.4 de Discusión de resultados, con las cáscaras de naranja se obtuvieron actividades exo-PG más altas que con el orujo de uva lavado, posiblemente por la presencia de la pectina en su composición. Por este motivo, se decidió utilizar este residuo para suplementar el orujo de uva en una proporción 1:1 (p/p). Los dos sustratos se prepararon independientemente, de igual

forma que se explicó en los apartados anteriores. Una vez mezclados, se sometieron a dos ciclos de esterilización en el autoclave a 120°C durante 20 min.

### 3.3.2. Humedad inicial del sólido

Como ya se señaló en el Capítulo 2, la humedad es uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta en la FES. El agua presente en los sistemas de FES se encuentra dentro de la matriz sólida, como una fina capa absorbida sobre la superficie de las partículas o débilmente unida a las regiones capilares del sólido.<sup>3</sup> El agua libre sólo aparece cuando se supera la capacidad de saturación de la matriz sólida.

El contenido óptimo de humedad para el crecimiento de los microorganismos se encuentra, de acuerdo con la bibliografía, entre el 40 y el 70% (p/p), pero depende del organismo y sustrato particular usado en el cultivo.

#### 3.3.2.1. Ajuste de la humedad inicial del sólido con agua destilada

La expresión que permite calcular la cantidad de agua que es necesario adicionar al sólido, según la humedad que se pretende establecer es la siguiente:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{g H}_2\text{O añadidos} + \text{g H}_2\text{O contenidos sólido}}{\text{g H}_2\text{O añadidos} + \text{g sólido húmedo}} \cdot 100$$

Los gramos de agua contenidos en el sólido se calcularon mediante la diferencia de masa de una cierta cantidad de sólido, antes y después de ser introducido en una estufa a 90°C durante 24 horas.

En la expresión anterior es preciso tener en cuenta que el agua a añadir calculada debe incluir el volumen de inóculo líquido requerido para las fermentaciones.

En los experimentos realizados con orujo de uva y cáscaras de naranja se estableció la humedad inicial del sólido en un 70% ya que, en experiencias previas, se comprobó que permite un buen crecimiento del hongo.

### 3.3.2.2. Ajuste de la humedad inicial del sólido con una solución nutritiva con sacarosa

Otra posible alternativa para suplementar el orujo de uva lavado y estimular la producción de las enzimas en estudio, consiste en ajustar la humedad inicial con una solución nutritiva que contenga fuente adicional de nitrógeno, carbono, sales de iones metálicos e inductor de pectinasas (pectina).

En la bibliografía se recogen una gran cantidad de artículos en los que se emplean soluciones nutritivas para mejorar el valor nutricional de residuos agroindustriales. Así, por ejemplo, Solis-Pereira y col. obtuvieron actividades exo-PG muy altas al ajustar la humedad inicial del bagazo de caña de azúcar con una solución nutritiva que contenía, entre otras sustancias, pectina.<sup>257</sup> Una solución de composición similar a la descrita en este artículo se eligió para suplementar al orujo de uva lavado, que contenía 2,4 g/L de urea, 9,8 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5,0 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,001 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0008 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,004 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,001 g/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 11,5 g/L de sacarosa y 11,5 g/L de pectina. Se esterilizó por una parte la solución con las sales y la urea (ajustando el pH de la disolución a 5) y, por otra, la pectina junto con la sacarosa.

---

<sup>257</sup> Solis-Pereira, S.; Favela-Torres, E.; Viniegra-González, G.; Gutiérrez-Rojas, M. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **39**, 36-41

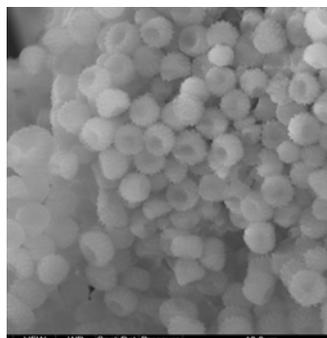
Para calcular la cantidad de solución nutritiva a añadir se utilizó la expresión descrita en el apartado 3.3.2.1.

### 3.3.2.3. Ajuste de la humedad inicial del sólido con solución nutritiva sin sacarosa

La solución nutritiva descrita en el apartado anterior contenía sacarosa, que es un azúcar fácilmente asimilable por los microorganismos.<sup>258</sup> Como este compuesto no es propiamente un inductor de la producción de enzimas sino exclusivamente un potenciador del crecimiento fúngico que, incluso, podría perjudicar la producción enzimática, se llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando la misma solución nutritiva pero sin sacarosa.

### 3.3.3. Preparación y almacenamiento del inóculo

En las fermentaciones en estado sólido se utilizó el hongo filamentoso *Aspergillus awamori* (NRRL 3312), con conocida actividad hidrolítica sobre sustratos naturales.



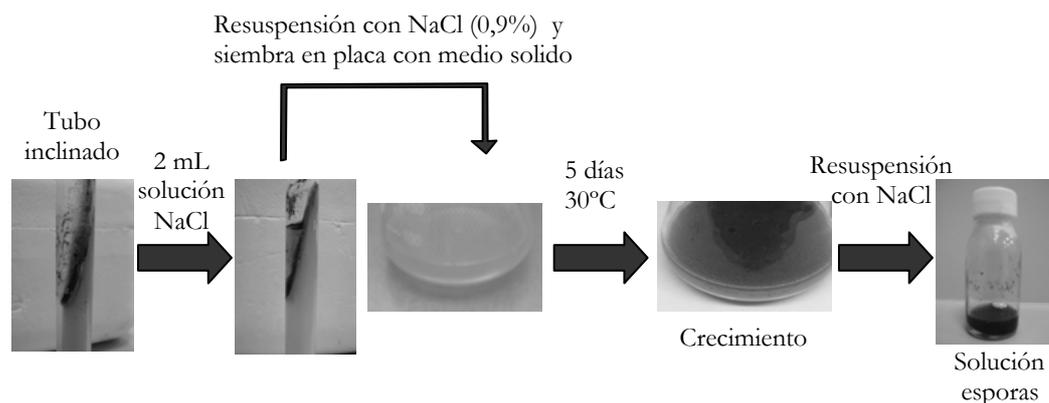
**Figura 3.6:** Imagen al microscopio electrónico de las esporas de *Aspergillus awamori*.

---

<sup>258</sup> Hossain, M.; Brooks, J.; Maddox, I. (1984). The effect of sugar source on citric acid production by *A. niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **19**, 393-397.

Para preparar la solución de esporas que se iba a utilizar en cada uno de los experimentos, se partió de un inóculo en un tubo de agar inclinado (constituido por peptona (0,1%), extracto de levadura (0,05%), agar (1,5%), xilano (0,6%), pectina (0,1%), agua destilada y unas gotas de silicona), que se encontraba almacenado a 4°C. Este medio contenía xilano y pectina como únicas fuentes de carbono para inducir la producción de xilanasas y exo-PG.

Las esporas almacenadas en el medio sintético se resuspendieron con la adición de 2 mL de una solución de NaCl (0,9%). A continuación, se añadieron 200 µl de la suspensión a ocho placas petri, que contenían 25 mL del mismo medio sintético, y se incubaron a 30°C durante 5 días. Transcurrido este tiempo se recogieron las esporas adicionando a cada placa 500 µl de la solución de NaCl (0,9%).



**Figura 3.7: Protocolo para la obtención del inóculo.**

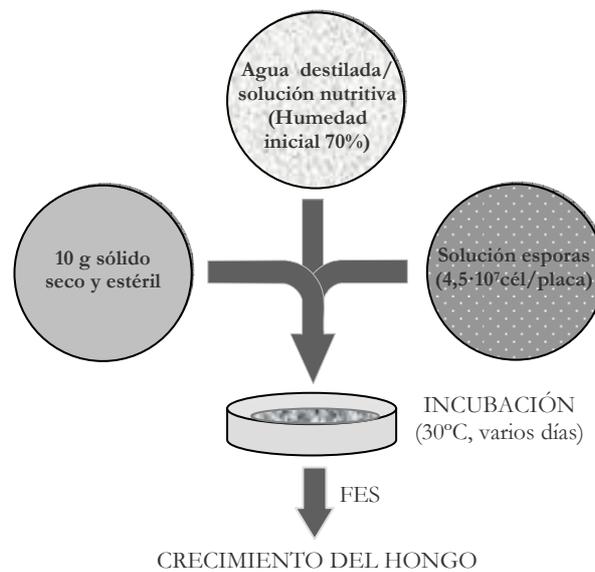
### 3.3.3.1. Obtención del inóculo

La determinación de la concentración de esporas en el inóculo se llevó a cabo mediante un recuento estadístico en cámara Neubauer con ayuda de un microscopio óptico (Leica DME, equipado con oculares de 10 aumentos y objetivos de 4, 10, 40 y 100).

Para el desarrollo de las fermentaciones, cada placa petri se inoculó con  $4,5 \cdot 10^7$  células, añadiendo el volumen necesario de solución de esporas. Se utilizó esta concentración por encontrarse dentro del rango utilizado por la mayoría de los autores.

### 3.3.4. Desarrollo de las fermentaciones

A excepción de los experimentos con medio sintético, las fermentaciones se llevaron a cabo en placas petri de 9 cm de diámetro, a las cuales se adicionó la cantidad de agua destilada o solución nutritiva necesaria (según el experimento) para ajustar la humedad inicial del sólido al 70%, un volumen de inóculo tal que cada placa contuviera  $4,5 \cdot 10^7$  células y 10 gramos de sustrato estéril. En el caso de las fermentaciones realizadas sobre cáscaras de naranja se utilizaron 5 gramos de sólido en lugar de 10. En todos los casos las placas se incubaron en una cámara de cultivo (Ibercex) a 30°C durante varios días. Cada experimento se realizó por duplicado.



**Figura 3.8:** Esquema del desarrollo de las fermentaciones.

Se realizaron diversos experimentos con idea de estudiar la producción de las enzimas en distintas condiciones. De este modo, se probaron distintos tipos de sólido (orujo de uva, orujo de uva lavado, cáscaras de naranja y mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja, ambos lavados) y distintas soluciones de ajuste de la humedad inicial del sólido (agua destilada y una solución nutritiva).

Con objeto de resumir los experimentos realizados y sus condiciones se junta la tabla 3.1.

Hongo utilizado	Sustrato	Solución ajuste humedad	
<i>Aspergillus awamori</i>	Medio sintético		
	Orujo de uva	Agua destilada	
	Orujo de uva lavado	Agua destilada	Solución nutritiva
			Solución nutritiva sin sacarosa
	Cáscaras de naranja	Solución nutritiva sin sacarosa ni pectina	
Mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja, ambos lavados	Solución nutritiva sin sacarosa ni pectina		

**Tabla 3.1:** Tabla resumen de los distintos experimentos realizados sobre placa petri.

Cada uno de estos experimentos, a excepción del correspondiente al medio sintético, se realizó por duplicado, calculando los límites de confianza de los resultados obtenidos con un 95% de probabilidad.

### 3.3.5. Extracción de las enzimas

Las condiciones utilizadas para la extracción de las enzimas se habían optimizado previamente. Dicho estudio consistió en evaluar el efecto de distintas variables que influían en la extracción a partir del orujo de uva:<sup>119</sup>

- Tipo de disolvente. Se analizó el efecto de distintos disolventes sobre la extracción de las enzimas en estudio entre los que se encontraban el agua destilada, el tampón citrato 0,005 M (pH 5,4), el tampón acetato 0,1 M (pH 5,0), el NaCl 0,1 M y el Tween 80 (0,1%).
- Temperatura de extracción. Las temperaturas analizadas fueron 4, 20, 30 y 40°C.
- Tiempo de extracción. Se evaluaron los tiempos de extracción de 15, 30, 45 y 60 minutos.
- Velocidad de agitación. Las velocidades estudiadas fueron de 0, 100, 150, 200 y 250 rpm.
- Volumen de disolvente. Se probaron distintos volúmenes de agua destilada, concretamente de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mL, por cada 10 gramos de sustrato sólido fermentado.
- Número de etapas de extracción: Se realizaron extracciones sucesivas del mismo sólido fermentado empleando nuevo disolvente cada vez. Para ello, tras cada extracción se separaba el sólido del líquido, siendo el primero de ellos extraído nuevamente con otros 50 mL de agua destilada. Este proceso se repitió durante seis veces obteniéndose finalmente 6 extractos.

Se estudió cada variable de forma independiente manteniendo el resto de los valores en condiciones estándar, siendo estos 50 mL de agua destilada, 30 min de agitación, 30°C y 200 rpm.

La descripción más detallada de los experimentos de extracción se presentó en la memoria para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados. En este trabajo se concluyó que las condiciones recomendadas para la extracción óptima de las enzimas en estudio a partir de orujo de uva eran 50 mL de Tween 80 (0,1%), 4°C, 30 min y 150 rpm. Por este motivo, fueron las que se utilizaron para la extracción de los

distintos sustratos empleados en este capítulo, a excepción del medio sintético y la mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja, en los que el volumen de disolvente era de 15 y 70 mL, respectivamente.

Atendiendo a este protocolo optimizado, una vez transcurrido el tiempo de fermentación el sólido fermentado se mezcló con el volumen correspondiente de Tween 80 (0,1%) en un erlenmeyer de 250 mL, que se introdujo en un agitador orbital a 4°C, 150 rpm durante 30 minutos.



*Figura 3.9: Extracción del sólido fermentado en el agitador orbital.*

Los extractos obtenidos, una vez centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se almacenaron en el congelador a -20°C.

### **3.3.6. Medidas de la actividad enzimática**

En los extractos obtenidos tras las FES de los distintos sustratos utilizados se evaluó la actividad de las enzimas xilanas (EC 3.2.1.8), exo-poligalacturonasa (exo-PG) (EC 3.2.1.67) y celulasa (EC 3.2.1.4), para lo cual fue necesaria la preparación de las siguientes disoluciones:

- **DNS:** 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 18,9 g de NaOH, 8,1396 g de DNS, 8,6 g de metabisulfito sódico y 30,75 g de tartrato de sodio y potasio en 1500 mL de agua.
- **Pectina 0,5%:** 4,10 g de acetato sódico anhidro y 2,5 g de pectina de manzana en 500 mL de agua, ajustando el pH a 5.
- **Xilano 0,5%:** 2,5 g de xilano y 7,35 g de tri-sodiocitrato-2-hidrato en 500 mL de agua, ajustando el pH a 5,4
- **Celulosa 1%:** 5 g de carboximetilcelulosa y 1,88 g de glicina en 500 mL de agua, ajustando el pH a 9.

### 3.3.6.1. Determinación de la actividad *exo*-PG

Como ya se indicó en el Capítulo 2, las exopoligalacturonasas son un tipo de pectinasas que hidrolizan los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -[1,4] entre dos ácidos D-galacturónicos adyacentes de la pectina. Para su determinación se realizó el siguiente protocolo:

En cada tubo de ensayo se adicionan 0,8 mL de disolución de pectina de manzana y 0,2 mL de extracto enzimático. Para la medida de la absorbancia a tiempo cero se retiran inmediatamente 0,2 mL de la mezcla anterior y se añaden a un tubo de ensayo que contiene 0,8 mL de agua destilada y 1 mL de disolución de DNS. El resto de la mezcla se incuba a 45°C durante 10 minutos. Durante este tiempo, las exopoligalacturonasas presentes en el extracto enzimático degradan la pectina formándose ácido D-galacturónico. Transcurridos los 10 minutos de incubación, se retiran otros 0,2 mL de la mezcla y se añaden a un tubo de ensayo que contiene, al igual que el anterior, 0,8 mL de agua destilada y 1 mL de la disolución de DNS. El ácido D-galacturónico generado se determina a partir del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para ello, los tubos obtenidos para los tiempos 0 y 10 se

hierven durante 10 minutos y, una vez fríos, se adicionan 8 mL de agua destilada para proceder a la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro (Hitachi, U-2001) a 540 nm.

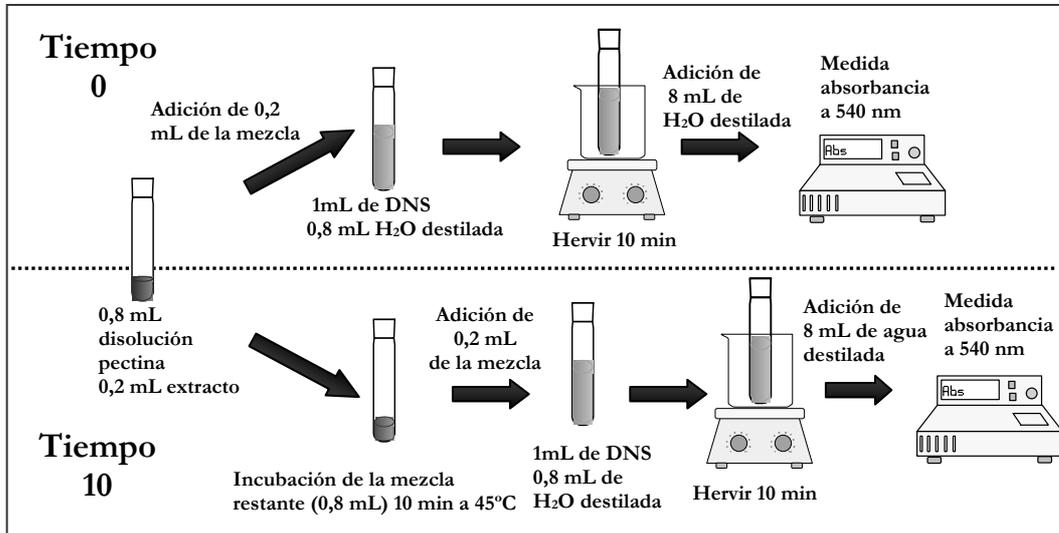


Figura 3.10: Determinación de la actividad de la enzima exo-PG.

La actividad exo-PG se determinó mediante la medida del ácido D-galacturónico generado, calculando la diferencia de la concentración analizada entre tiempo 10 y tiempo 0. Una unidad de actividad exo-PG se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu$ mol por minuto de ácido D-galacturónico a 45°C y pH 5.

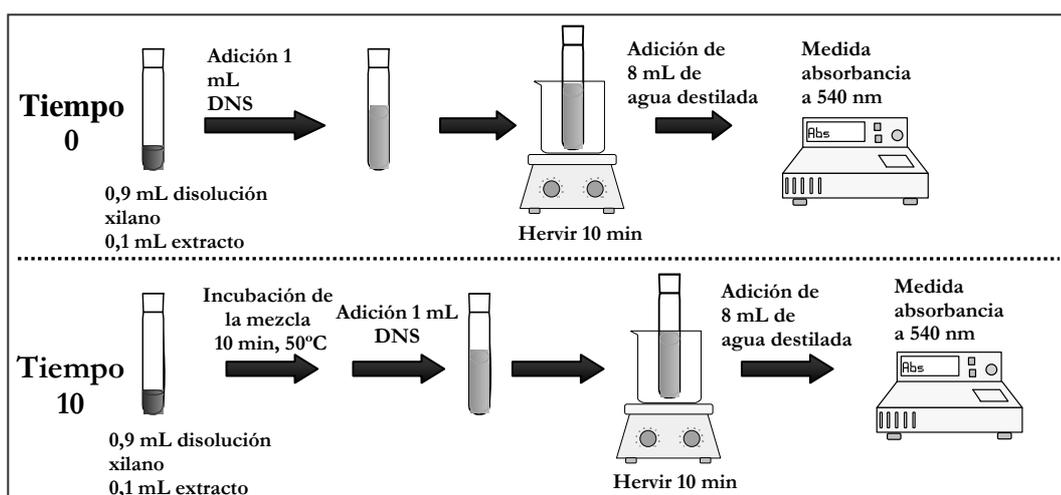
### 3.3.6.2. Determinación de la actividad xilanasas

Las xilanasas son enzimas que hidrolizan al azar los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos del xilano. Para su determinación en el extracto enzimático se realizó el siguiente protocolo:

En cada tubo de ensayo se adicionan 0,9 mL de disolución de xilano de madera de abedul y 0,1 mL de extracto enzimático. La mezcla se incuba durante 10 minutos en un baño a 50°C. En este tiempo se produce la ruptura de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 del xilano por las xilanasas presentes en el extracto enzimático. Para detener la reacción, a los 10 minutos se adiciona 1 mL de la disolución de DNS.

Como tiempo cero se toma un tubo que contiene 0,9 mL de disolución de xilano y 1 mL de disolución de DNS al que posteriormente se adicionan 0,1 mL de extracto enzimático.

Los tubos correspondientes a los tiempos 0 y 10 se hierven durante 10 minutos añadiéndoles, una vez fríos, 8 mL de agua para la lectura de absorbancia a 540 nm.



*Figura 3.11: Determinación de la actividad de la enzima xilanasas.*

La actividad xilanasas se determinó mediante la diferencia de la D-xilosa formada entre los tiempos 10 y 0.

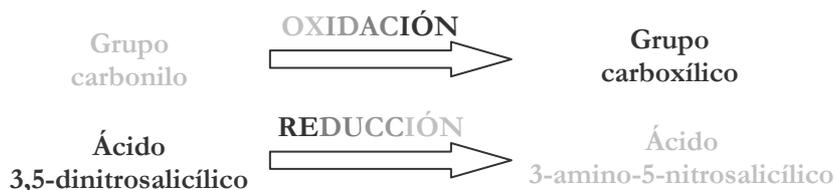
Una unidad de actividad xilanasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  por minuto de D-xilosa a 50°C y pH 5,4.

### 3.3.6.3. Determinación de la actividad celulasa

Las celulasas son enzimas que hidrolizan al azar los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos de la celulosa. Para su determinación en el extracto enzimático se llevó a cabo el mismo protocolo seguido para la determinación de la xilanasa, pero en este caso se utilizó como sustrato carboximetilcelulosa, formándose D-glucosa tras la actuación de la enzima.

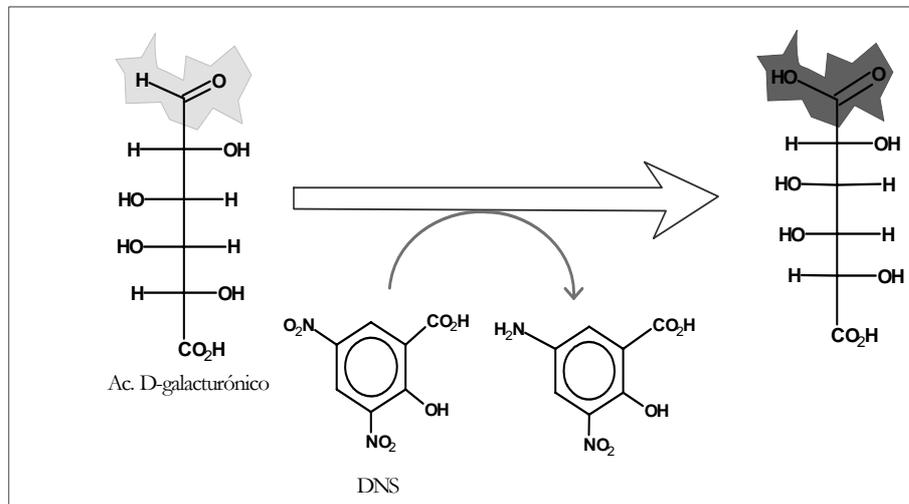
### 3.3.6.4. Determinación de los azúcares reductores

Tras la aplicación de los test enzimáticos anteriormente descritos para la determinación de las actividades exo-PG, xilanasa y celulasa se genera ácido D-galacturónico, D-xilosa y D-glucosa, respectivamente, que son azúcares reductores. Para su medida se utilizó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que se basa en la oxidación del grupo carbonilo del azúcar reductor a ácido carboxílico, a la vez que el DNS se reduce a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.



Esta reacción se puede seguir mediante la medida de la absorbancia a 540 nm, ya que el ácido 3,5-dinitrosalicílico, que es de color amarillo, se oxida a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que presenta un color pardo oscuro-marrón. La intensidad de este

compuesto depende de la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra, ya que cada mol de azúcar reductor reacciona con un mol de DNS.



**Figura 3.12:** Oxidación del ácido *D*-galacturónico en presencia del reactivo *DNS*.

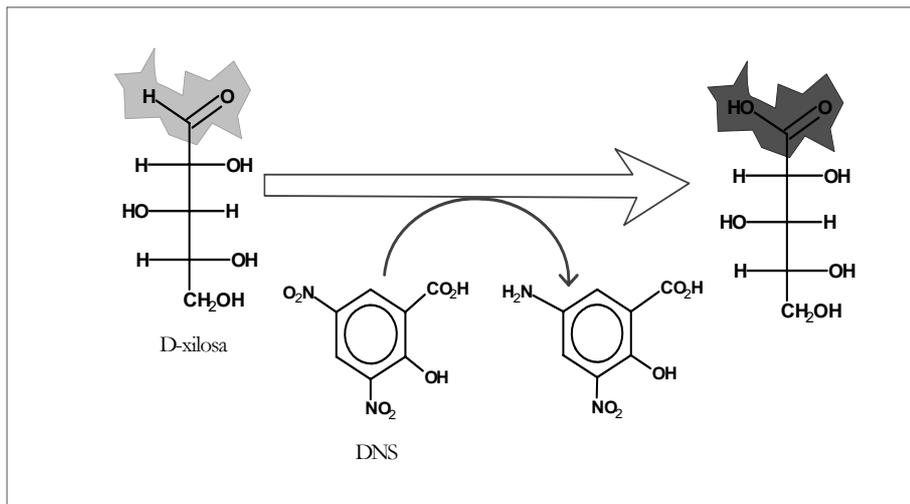


Figura 3.13: Oxidación de la D-xilosa en presencia del reactivo DNS.

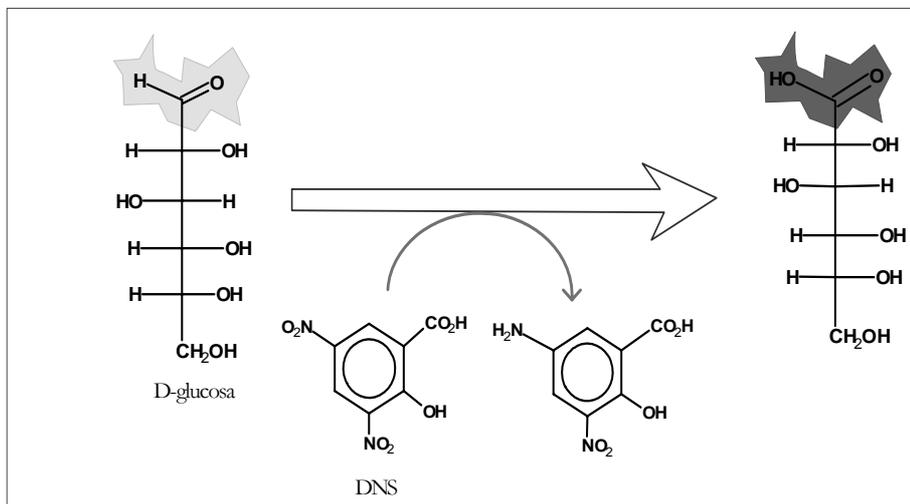


Figura 3.14: Oxidación de la D-glucosa en presencia del reactivo DNS.



### **3.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

En los extractos obtenidos tras las FES se analizó la concentración de azúcares reductores, el pH y la actividad de las enzimas xilanasa, exo-PG y celulasa (a excepción del medio sintético en el que no se determinó la actividad celulasa). Tanto la concentración de azúcares reductores como las unidades de actividad enzimática se expresaron por gramo de sólido seco (mmol/gss y UA/gss, respectivamente).

En primer lugar se mostrarán los resultados obtenidos con el medio de cultivo sintético que, como se comentó anteriormente, presentaba como única fuente de carbono pectina y xilano. Posteriormente, se expondrán los resultados analizados para los distintos medios naturales descritos en el apartado de Material y métodos: orujo de uva, orujo de uva lavado, cáscaras de naranja y mezcla de los dos últimos.

En el caso del orujo de uva lavado se contrastarán los resultados tras utilizar distintas soluciones de ajuste de la humedad inicial: agua destilada, solución nutritiva y solución nutritiva sin sacarosa.

En la tabla 3.2 se muestran de forma esquemática los experimentos llevados a cabo junto con el apartado del capítulo en el que se expondrán sus resultados.

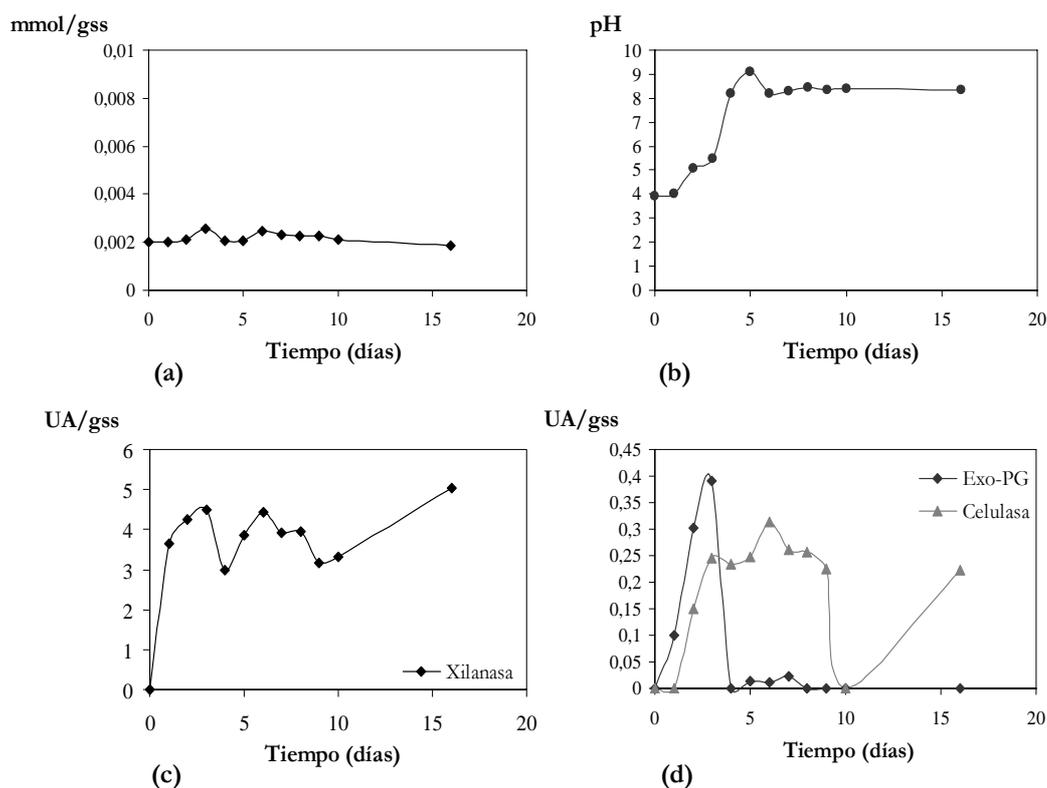
Nº Experimento	Hongo	Sustrato	Solución ajuste humedad
3.4.1	<i>Aspergillus awamori</i>	Medio sintético	
3.4.2	<i>Aspergillus awamori</i>	Orujo de uva	Agua destilada
3.4.3.1	<i>Aspergillus awamori</i>	Orujo de uva lavado	Agua destilada
3.4.3.2	<i>Aspergillus awamori</i>	Orujo de uva lavado	Solución nutritiva
3.4.3.3	<i>Aspergillus awamori</i>	Orujo de uva lavado	Solución nutritiva sin sacarosa
3.4.4	<i>Aspergillus awamori</i>	Cáscaras de naranja	Solución nutritiva sin sacarosa ni pectina
3.4.5	<i>Aspergillus awamori</i>	Mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja lavados	Solución nutritiva sin sacarosa ni pectina

**Tabla 3.2:** Resumen de los experimentos realizados en el presente capítulo.

### 3.4.1. FES en el medio sintético

Como se comentó en el apartado 3.3.1.1, el medio de cultivo sintético se utilizó para tener una idea aproximada del orden de magnitud en el que se iban a producir las enzimas en estudio utilizando el hongo *Aspergillus awamori*. Con este medio se esperaba la síntesis de las enzimas xilanas y exo-PG, ya que contenía xilano y pectina (inductores de ambas enzimas) como únicas fuentes de carbono.

En la figura 3.15 se muestran los resultados obtenidos tras la fermentación sobre dicho medio, evaluándose la concentración de azúcares reductores, el pH y la actividad enzimática en los distintos extractos.



**Figura 3.15:** Resultados obtenidos tras la fermentación de *A. awamori* sobre el medio sintético: evolución de la concentración de azúcares reductores con el tiempo (a), pH (b), actividad xilanasa (c) y actividades exo-PG y celulasa (d).

En la figura 3.15 (a) se observa como la concentración de los azúcares reductores se mantiene muy baja y prácticamente constante desde el principio de la fermentación (entre 0,002 y 0,003 mmol/gss). Esto se debe a que el medio sintético no presenta azúcares libres; únicamente contiene xilano y pectina que, para poder ser metabolizados por el hongo, deben de ser previamente degradados por las enzimas hidrolíticas secretadas por este.

Como se muestra en la figura 3.15 (b), el pH aumenta en los cinco primeros días de fermentación desde 3,9 hasta 9,1. A partir de este momento, el pH se mantiene prácticamente constante hasta el final del proceso. Como consecuencia del bajo

contenido en azúcares del sustrato, el aumento del pH puede explicarse debido a que los microorganismos utilizan como fuente de carbono los ácidos orgánicos presentes en el medio.<sup>259</sup>

Las actividades enzimáticas obtenidas se representan en las gráficas 3.15 (c) y 3.15 (d), observándose los mayores niveles para la xilanasa. La producción de esta enzima es alta desde el principio de la fermentación, aumentando hasta el tercer día donde alcanza 4,48 UA/gss. A partir de este momento se observa un mantenimiento de la actividad en el tiempo de fermentación estudiado.

Las enzimas exo-PG y celulasa se sintetizan en menor proporción. La tendencia seguida por la exo-PG es la misma que se describió para la xilanasa, aumentando su actividad los tres primeros días de fermentación hasta alcanzar un valor de 0,39 UA/gss pero, al contrario de la xilanasa, a partir de este momento no se detectó actividad. Finalmente, las actividades medidas para la enzima celulasa se mantienen prácticamente constantes entre el tercer y el noveno día, obteniéndose un máximo de 0,31 UA/gss tras seis días de fermentación.

Tras el desarrollo de este experimento se comprobó que *Aspergillus awamori* produce xilanasa y exo-PG al crecer sobre medio sintético. Si bien es cierto que dicho medio presenta inductores de la síntesis de ambas enzimas, las actividades enzimáticas obtenidas no son altas.

A continuación, se realizarán una serie de experimentos para confirmar la síntesis de las enzimas en estudio a partir de orujo de uva. Debido a la compleja composición de este sólido, que además de presentar fibras como xilano, celulosa y pectina contiene

---

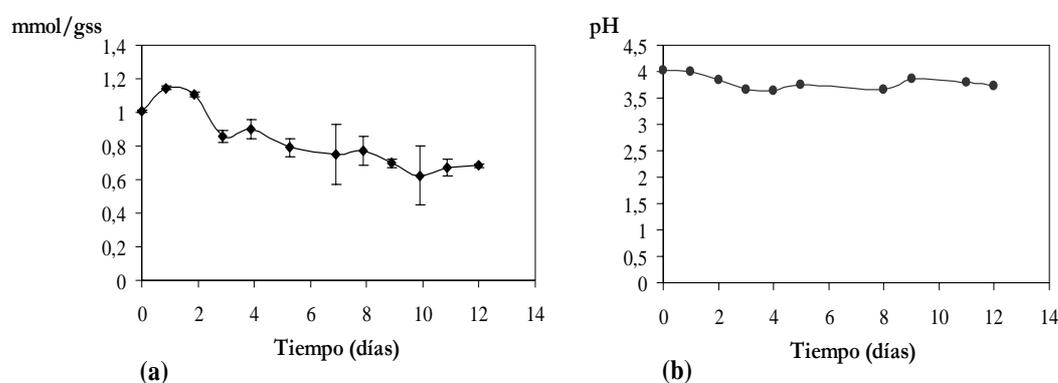
<sup>259</sup> Poiana, M.; Romeo, F. (2006). Changes in chemical and microbiological parameters of some varieties of Sicily olives during natural fermentation. *Grasas y aceites*, **57**, 4, 402-408.

lípidos, proteínas y sales minerales, cabe esperar la producción de las enzimas en estudio.

### 3.4.2. FES sobre orujo de uva

En este apartado se van a mostrar los resultados obtenidos tras la fermentación en estado sólido del hongo *Aspergillus awamori* sobre orujo de uva.

En la figura 3.16 (a) se presenta la evolución seguida por la concentración de azúcares reductores con el tiempo de fermentación.



**Figura 3.16:** Evolución de la concentración de los azúcares reductores (a) y el pH (b) en la fermentación de *A. awamori* sobre orujo de uva.

Partiendo de un valor inicial de  $1,009 \pm 0,005$  mmol/gss, los azúcares reductores disminuyen lentamente hasta alcanzar  $0,683 \pm 0,012$  mmol/gss tras 12 días de proceso. Por tanto, durante la fermentación la concentración de azúcares reductores es muy alta (500 veces superior a la analizada en el medio sintético) y sólo se reduce en un 32,3%.

La explicación a la elevada concentración de azúcares analizada con este sustrato podría deberse a que se recogió de la prensa horizontal, una de las primeras etapas

del procesado de la uva en la bodega, donde el orujo aun contiene una buena proporción de mosto. Esta elevada concentración de azúcares en el orujo hace innecesaria la producción por el microorganismo de las enzimas hidrolíticas de interés, lo que explicaría las bajas actividades registradas (gráficas no presentadas) durante la fermentación. Otra posibilidad sería que, si bien hay algo de síntesis de las enzimas objeto de estudio, la concentración de azúcares reductores producida por la actividad de estas fuera tan baja que, comparada con las del extracto, no se pudiera medir.

Con el fin de comprobar si las enzimas se producían a tiempos mayores se realizó una fermentación durante 24 días. Sin embargo, tampoco se consumió gran parte de los azúcares ni se detectó actividad enzimática.

En la figura 3.16 (b) se muestra la variación del pH con el tiempo, observándose que disminuye levemente a medida que aumenta el tiempo de fermentación. Este hecho puede deberse a la acidificación del medio de cultivo promovido por el crecimiento micelial durante la fermentación, lo que por una parte puede inhibir el crecimiento, y por otra, la síntesis de metabolitos.

Tras la FES sobre este sustrato se observó, pues, un buen crecimiento del hongo, aunque no se detectó actividad de las enzimas en estudio.

De este apartado se concluye que no es posible entonces utilizar el orujo de uva sin ningún tratamiento previo como sustrato de fermentación para la producción de las enzimas en estudio, puesto que presenta un alto contenido en azúcares reductores que inhibe su síntesis. Además, la composición de este residuo cambia en función de la estación, el tipo de uva, las condiciones ambientales, la etapa dentro del procesado de la uva de donde se obtenga, etc., por lo que no es posible garantizar

productividades enzimáticas reproducibles. Por este motivo, en el siguiente apartado se muestra como una posible alternativa la utilización de orujo de uva lavado como sustrato de fermentación.

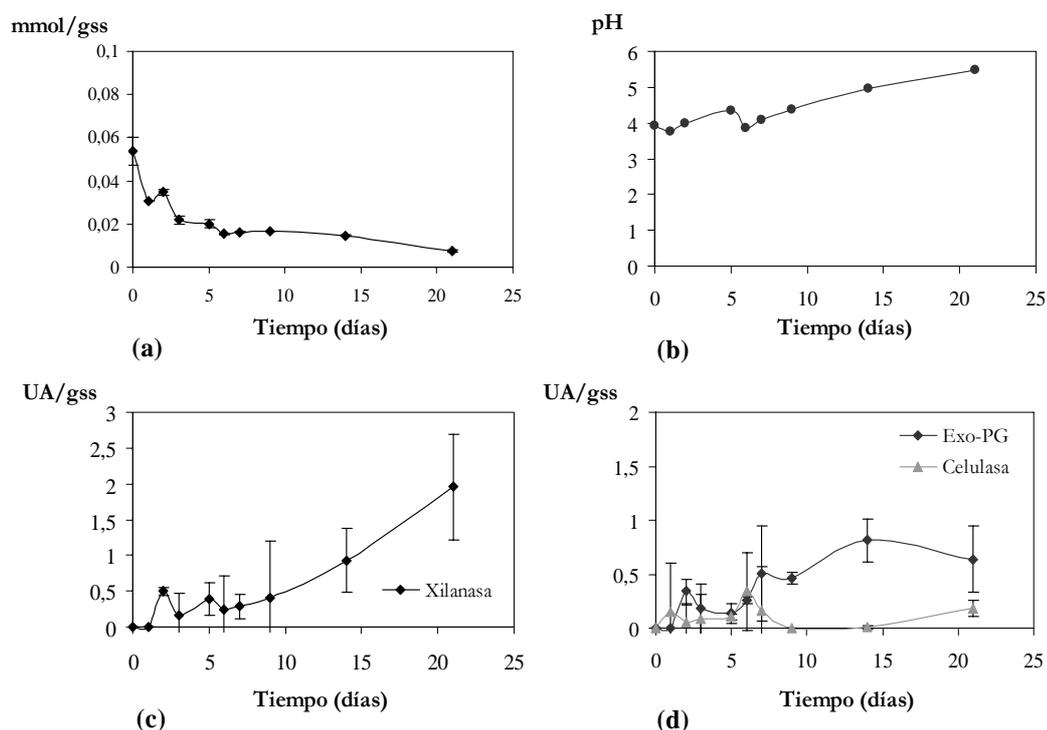
### **3.4.3. FES sobre orujo de uva lavado**

En el apartado anterior se determinó que mediante la FES de orujo de uva utilizando el hongo *Aspergillus awamori* no se detecta actividad de las enzimas en estudio, ya que presenta una alta concentración de azúcares reductores. Por este motivo se planteó su lavado como una posible solución. El protocolo de lavado se detalló en el apartado 3.3.1.3.

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras el empleo del orujo de uva lavado como sustrato de fermentación, ajustando su humedad inicial con tres soluciones diferentes: agua destilada, una solución nutritiva con sacarosa y la misma solución nutritiva sin sacarosa (ver tabla 3.2).

#### *3.4.3.1. Ajuste de la humedad inicial del sólido con agua destilada*

En la figura 3.17 se exponen los resultados obtenidos tras el empleo del orujo de uva lavado como sustrato de fermentación, cuya humedad inicial se ajustó con agua destilada.



**Figura 3.17:** Resultados obtenidos tras la fermentación de *A. awamori* sobre orujo de uva lavado ajustando la humedad inicial con agua destilada: evolución de la concentración de azúcares reductores (a), pH (b), actividad xilanasa (c) y actividades exo-PG y celulasa (d).

En la gráfica 3.17 (a) se muestra la evolución seguida por la concentración de los azúcares reductores, que disminuye a medida que transcurre el tiempo de fermentación. Estos resultados son los que cabría esperar, ya que el hongo va consumiendo los azúcares necesarios para llevar a cabo su metabolismo. En este caso se parte de una concentración inicial de azúcares reductores de  $0,054 \pm 0,006$  mmol/gss, a diferencia con el orujo no lavado que presentaba un valor inicial de  $1,009 \pm 0,005$  mmol/gss. Por lo tanto, con los lavados se consiguió reducir la concentración inicial de azúcares reductores en un 95%.

En la gráfica 3.17 (b) se expone la evolución seguida por el pH, señalándose que su valor inicial es prácticamente el mismo tanto para el orujo lavado como para el no

lavado, con un valor próximo 4. Por el contrario, la variación del pH con el tiempo es distinta, ya que cuando se utilizó orujo no lavado el pH disminuía ligeramente, mientras que ahora aumenta levemente. Esta tendencia puede deberse a que, en este caso y como consecuencia del bajo contenido en azúcares del sustrato, los microorganismos utilizaron como fuente de carbono los ácidos orgánicos presentes en el medio.<sup>259</sup>

Las gráficas 3.17 (c) y 3.17 (d) muestran la evolución de la actividad xilanas, exo-PG y celulasa con el tiempo. Se observa como su evolución es como cabría esperar, contraria a la de los azúcares reductores. El hongo utiliza en primer lugar los azúcares libres del medio como fuente de carbono, sin necesidad de producir enzimas hidrolíticas. Una vez estos están prácticamente agotados, la producción enzimática empieza a aumentar.

Sin embargo, en este caso se observó un crecimiento del hongo bastante pobre comparado con el del orujo sin lavar lo que repercute en unas producciones enzimáticas muy bajas y tardías. Este resultado podría explicarse considerando que en los lavados se pueden perder sustancias solubles en agua (sales minerales, vitaminas, azúcares, etc.) que son imprescindibles para el crecimiento del hongo. Además, la mayor parte de la pectina, cuya concentración es ya bastante baja en el orujo sin lavar,<sup>120</sup> se solubilizaría con los lavados al pertenecer al grupo de las fibras solubles en agua.<sup>260</sup> Por tratarse de un inductor de la producción de pectinasas, al disminuir su concentración con los lavados, podría reducirse la capacidad del hongo de producir dichas enzimas.

En la gráfica 3.17 (c) se muestra la evolución seguida por la actividad de la enzima xilanas, la cual aumenta su producción a medida que transcurre el tiempo de

---

<sup>260</sup> Theuwissen, E.; Mensink, R. (2008). Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiology & Behavior*, **94**, 285-292.

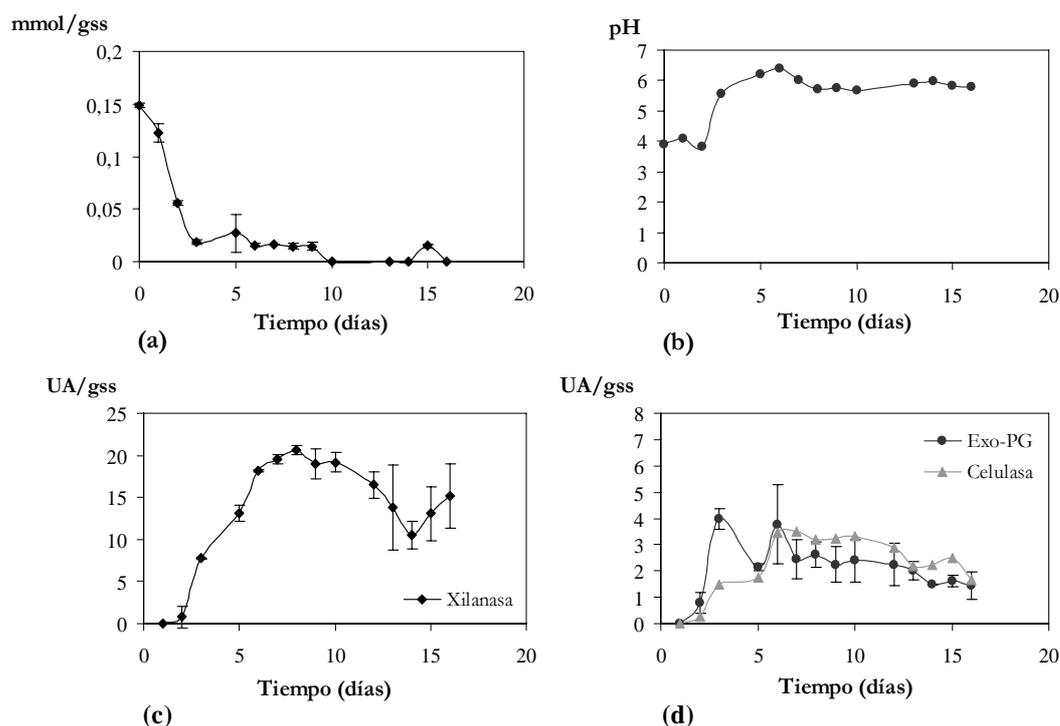
fermentación, alcanzando el valor máximo de  $1,96 \pm 0,74$  UA/gss tras 21 días de incubación. En la gráfica 3.17 (d) se exponen los resultados obtenidos para la enzima exo-PG, cuya producción, al igual que la xilanasa, aumenta con el tiempo de fermentación hasta alcanzar el máximo de  $0,82 \pm 0,20$  UA/gss tras 14 días de cultivo. A partir de este máximo se produce un ligero descenso hasta el final de la fermentación. Finalmente, la celulasa se obtiene en menor medida que las otras dos enzimas, analizándose un valor máximo  $0,34 \pm 0,30$  UA/gss después de 6 días de fermentación.

En definitiva, y a diferencia del orujo no lavado, con el sustrato lavado se obtiene alguna actividad de las enzimas en estudio. A pesar de ello, los valores analizados son bajos debido, como se comentó anteriormente, a la solubilización de sustancias necesarias para el crecimiento del hongo y, en consecuencia, para la producción de enzimas. Una de estas sustancias podría ser la pectina, por lo que se planteó como posible alternativa el ajuste de la humedad inicial del sólido con una solución nutritiva que presentara, entre otros componentes, este polisacárido.

#### *3.4.3.2. Ajuste de la humedad inicial del sólido con una solución nutritiva*

En el apartado anterior se propuso el ajuste de la humedad inicial del sólido con una solución nutritiva, en lugar de con agua destilada, como una posible alternativa para mejorar la producción enzimática a partir del orujo de uva lavado. Esta solución contenía fuente de nitrógeno, fuente de carbono, sales de iones metálicos y pectina (ver composición en 3.3.2.2). Como fuente de carbono se utilizó sacarosa, en una concentración de 11,5 g/L, que actúa como inductor del crecimiento del hongo.

Los resultados obtenidos se exponen en la figura 3.18.



**Figura 3.18:** Resultados obtenidos tras la fermentación de *A. awamori* sobre orujo de uva lavado ajustando la humedad inicial con una solución nutritiva: evolución de la concentración de los azúcares reductores (a), pH (b), actividad xilanasa (c) y actividades exo-PG y celulasa (d).

En la gráfica 3.18 (a) se expone la evolución seguida por la concentración de azúcares reductores con el tiempo de fermentación, observando su disminución como consecuencia del metabolismo del hongo. De esta forma, partiendo de una concentración inicial de  $0,149 \pm 0,002$  mmol/gss, se alcanzan  $0,019 \pm 0,002$  mmol/gss tras tres días de fermentación. Después de 10 días de cultivo los azúcares reductores están prácticamente agotados.

En este caso, la concentración inicial de azúcares reductores es 2,8 veces superior a la determinada cuando se ajustó la humedad con agua destilada, como consecuencia de la presencia de la sacarosa en la solución nutritiva. Sin embargo, debido a que se trata

de un azúcar fácilmente asimilable por el hongo, los azúcares reductores se agotan tras cuatro días de fermentación.

En la gráfica 3.18 (b) se muestra la evolución seguida por el pH, el cual aumenta durante los primeros días de fermentación desde 3,9 hasta 6,39, valor determinado el sexto día. Tras este máximo se produce una ligera caída, manteniéndose prácticamente constante hasta el final de la fermentación.

Finalmente, en las gráficas 3.18 (c) y 3.18 (d) se exponen los valores de actividad obtenidos para las enzimas xilanasas, exo-PG y celulasa. La síntesis de la xilanasas (gráfica 3.18 (c)) es muy superior a la de las otras dos enzimas, produciéndose un aumento de la actividad hasta el octavo día de fermentación, en el que se miden  $20,59 \pm 0,52$  UA/gss. A partir de este momento dicha actividad cae hasta  $10,54 \pm 1,64$  UA/gss. La máxima actividad xilanasas alcanzada en este caso es mucho mayor a la determinada con agua destilada, donde se midieron  $1,96 \pm 0,74$  UA/gss tras veintiún días de fermentación.

En cuanto a la enzima exo-PG, cuya evolución se representa en la gráfica 3.18 (d), se alcanza el máximo de  $3,96 \pm 0,39$  UA/gss tras tres días de fermentación. Al igual que ocurriría con la enzima xilanasas, los valores obtenidos son mucho mayores a los analizados cuando se ajustó la humedad inicial con agua destilada, en cuyo caso se alcanzó el máximo de  $0,82 \pm 0,2$  UA/gss tras catorce días de fermentación.

Finalmente, en la gráfica 3.18 (d) se muestran los valores medidos para la celulasa, que son los más bajos de las tres enzimas estudiadas. El máximo ( $3,50 \pm 0,25$  UA/gss) se alcanza tras siete días de fermentación. Para esta enzima, la producción es mayor entre el 6º y el 10º día de cultivo. Como sucedía con las enzimas xilanasas y exo-PG, la máxima actividad celulasa es superior a la alcanzada cuando se ajustó la

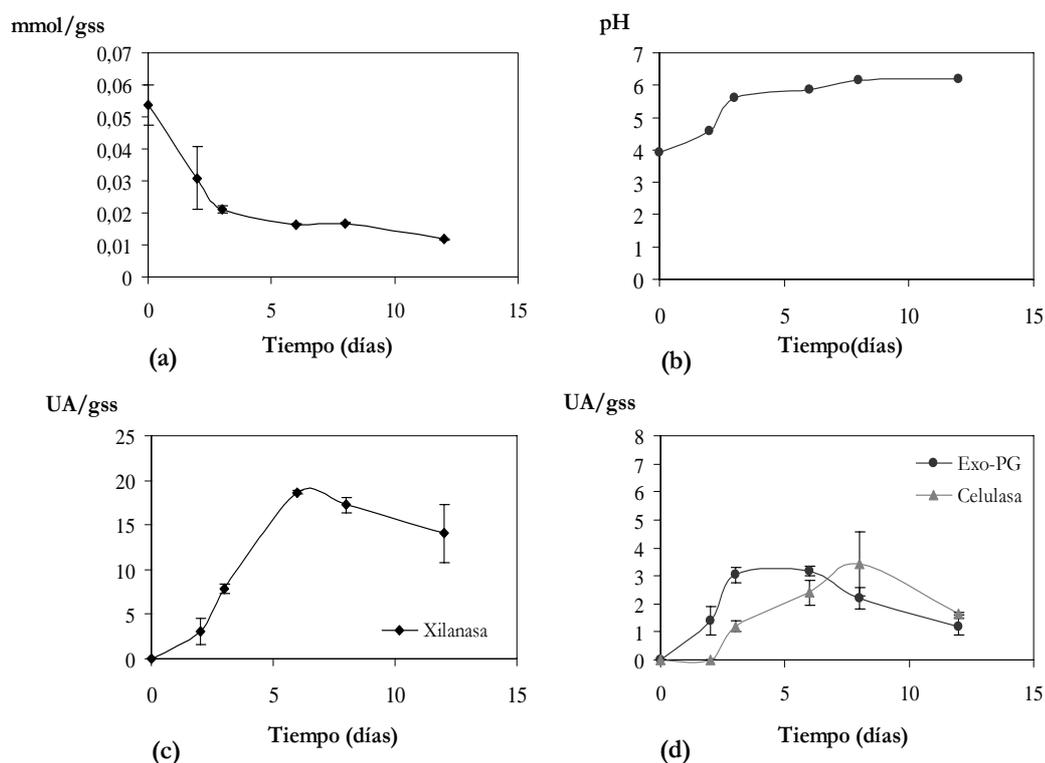
humedad inicial con agua destilada, donde se midieron  $0,34 \pm 0,36$  UA/gss (al cabo de seis días de fermentación).

Si se comparan las gráficas obtenidas para los azúcares reductores y las actividades enzimáticas se observa de nuevo que la producción de las enzimas comienza cuando los azúcares reductores están prácticamente agotados en el medio.

Se puede concluir que mediante el ajuste de la humedad inicial del orujo lavado con una solución nutritiva, que contiene fuente de carbono, nitrógeno, sales minerales y pectina, se consigue aumentar en gran medida la producción de las enzimas xilanasas, exo-PG y celulasa.

#### *3.4.3.3. Ajuste de la humedad inicial del sólido con una solución nutritiva sin sacarosa*

En el experimento descrito en el apartado anterior se consiguió mejorar la producción de las enzimas objeto de estudio a partir de orujo de uva lavado mediante el ajuste de su humedad inicial con una solución nutritiva. Debido a que la sacarosa presente en dicha solución no es propiamente un inductor de la producción de las enzimas objeto de estudio sino un potenciador del crecimiento fúngico que, incluso podría perjudicar la producción enzimática, se llevaron a cabo una serie de experimentos con la misma solución nutritiva pero sin la presencia de dicho azúcar. Las gráficas que recogen sus resultados se exponen en la figura 3.19.



**Figura 3.19: Resultados obtenidos tras la fermentación de *A. awamori* sobre orujo de uva lavado ajustando la humedad inicial con una solución nutritiva sin sacarosa: evolución de la concentración de los azúcares reductores (a), pH (b), actividad xilanasa (c) y actividades exo-PG y celulasa (d).**

En la gráfica 3.19 (a) se muestra la evolución seguida por la concentración de azúcares reductores que, como cabría esperar, disminuyen con el transcurso de la fermentación. De esta forma, partiendo de una concentración inicial de  $0,054 \pm 0,006$  mmol/gss y tras tres días de cultivo están prácticamente agotados. Debido a que la solución nutritiva no contiene sacarosa, la concentración inicial de azúcares reductores determinada en este caso es inferior a la analizada cuando estaba presente este azúcar ( $0,149 \pm 0,002$  mmol/gss).

En relación al pH, gráfica 3.19 (b), su evolución con el tiempo es muy similar a la obtenida con sacarosa.

En la gráfica 3.19 (c) se exponen los resultados analizados para la enzima xilanas, observándose como aumenta su actividad hasta el sexto día de fermentación, cuando alcanza un máximo de  $18,67 \pm 0,16$  UA/gss. A partir de este momento la actividad comienza a disminuir ligeramente. Estos resultados son similares a los obtenidos con sacarosa, aunque con valores máximos ligeramente inferiores.

La evolución seguida por la exo-PG se representa en la figura 3.19 (d), observándose una actividad inferior a la determinada para la enzima xilanas. Tras seis días de fermentación, la actividad exo-PG alcanza un máximo  $3,18 \pm 0,17$  UA/gss, valor que es ligeramente inferior al obtenido cuando la solución contenía sacarosa ( $3,96 \pm 0,39$  UA/gss).

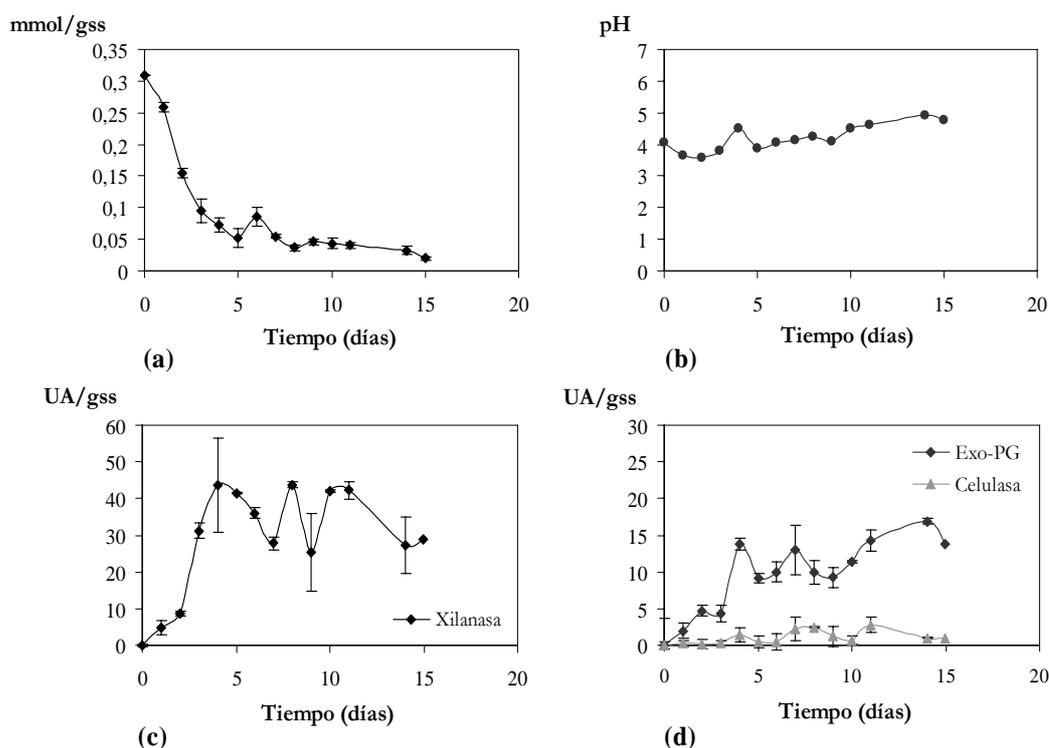
Finalmente, en la gráfica 3.19 (d) se exponen los resultados obtenidos para la enzima celulasa, los cuales son prácticamente iguales a los obtenidos sin sacarosa. Cuando no se utiliza dicho disacárido, tras ocho días de fermentación se alcanza un máximo de  $3,44 \pm 1,5$  UA/gss, mientras que cuando la solución contenía sacarosa tenía un valor de  $3,50 \pm 0,25$  UA/gss, medido tras siete días de cultivo.

A la vista de los resultados analizados se puede concluir que no se distinguen diferencias muy significativas en los máximos de actividad enzimática cuando se elimina la sacarosa de la solución nutritiva. Por este motivo, para las fermentaciones posteriores no se añadió dicho azúcar a la solución nutritiva empleada para ajustar la humedad inicial de los sustratos sólidos.

#### **3.4.4. FES sobre cáscaras de naranja lavadas**

Como se describió en el apartado 3.4.3.1, tras la fermentación de *A. awamori* sobre orujo de uva lavado se obtuvieron actividades enzimáticas muy bajas. Sin embargo, estos resultados mejoraron considerablemente tras ajustar la humedad inicial del sólido con una solución nutritiva, que contenía pectina entre otras sustancias. Las cáscaras de naranja, al presentar un alto contenido en pectina, podrían sustituir a esta pectina comercial. Sin embargo, es necesario evaluar previamente este sólido como sustrato de fermentación para la producción de las enzimas objeto de estudio. Para el desarrollo de estos experimentos se lavaron las cáscaras de naranja según el protocolo descrito en 3.3.1.4 y se ajustó su humedad inicial con la solución nutritiva sin sacarosa ni pectina.

Las gráficas que recogen estos experimentos se exponen a continuación.



**Figura 3.20: Resultados obtenidos tras la fermentación de *A. awamori* sobre cáscaras de naranja lavadas: evolución de la concentración de azúcares reductores (a), pH (b), actividad xilanasa (c) y actividades exo-PG y celulasa (d).**

En la gráfica 3.20 (a) se muestra la evolución seguida por la concentración de azúcares reductores que, partiendo de un valor inicial de  $0,308 \pm 0,000$  mmol/gss, se reducen en un 83% tras cinco días de fermentación. La concentración inicial es casi seis veces superior a la determinada cuando se utilizó orujo de uva lavado como sustrato de fermentación. A pesar de ello, la evolución con el tiempo es muy similar en ambos casos.

En la gráfica 3.20 (b) se expone la evolución seguida por el pH, el cual parte de un valor inicial de 4,07 y aumenta levemente hasta alcanzar el máximo de 4,92 tras 14 días de fermentación. Este incremento del pH puede deberse al consumo de ácidos

como el ascórbico y el cítrico presentes en las cáscaras de naranja. En este caso, la evolución del pH es muy similar a la obtenida con el orujo de uva lavado.

Los resultados medidos para la enzima xilanasa se representan en la gráfica 3.20 (c), observando un aumento de la actividad desde el comienzo de la fermentación hasta el cuarto día, en el que se miden  $43,56 \pm 2,03$  UA/gss. A partir de este momento la producción va oscilando entre  $25,48 \pm 0,71$  y  $43,74 \pm 1,78$  UA/gss hasta el final de la fermentación. Así pues, al utilizar cáscaras de naranja como sustrato de fermentación se determina un máximo de actividad xilanasa 22,3 veces superior al obtenido con orujo de uva lavado ajustando la humedad inicial con agua destilada y 2,12 veces superior al analizado con la solución nutritiva (con sacarosa).

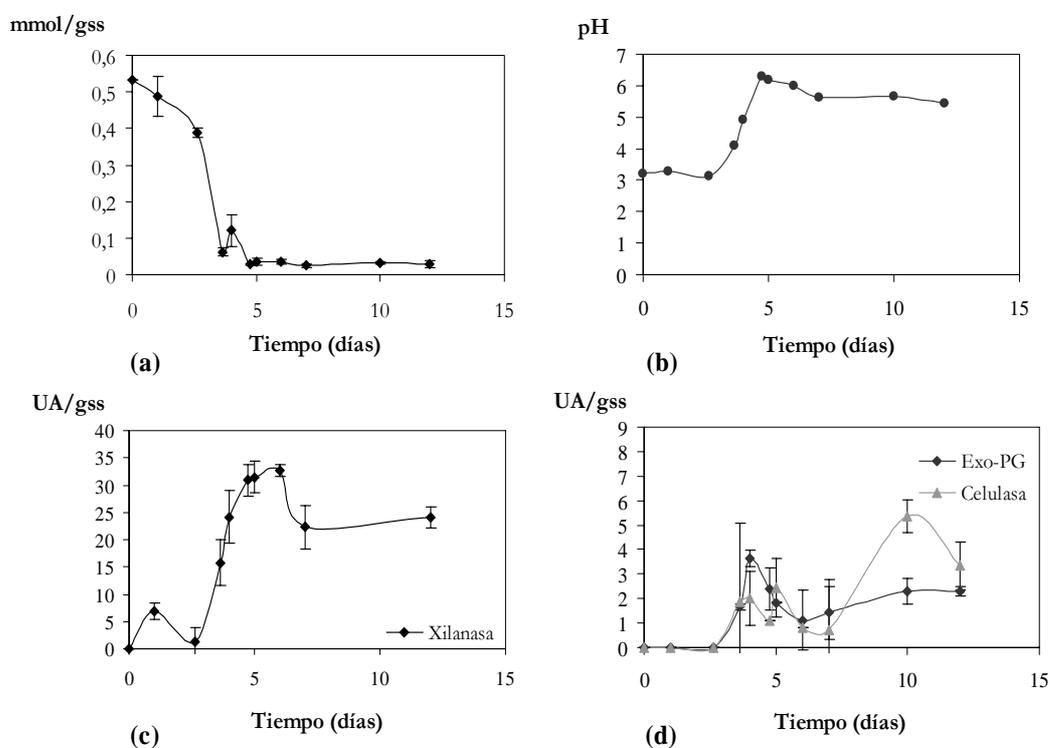
Los resultados más sorprendentes se obtienen para la enzima exo-PG, ya que son mucho mayores que los analizados para orujo de uva. Su evolución con el tiempo se representa en la gráfica 3.20 (d), aumentando desde el comienzo de la fermentación hasta alcanzar un máximo de  $16,90 \pm 1,40$  UA/gss tras 14 días de cultivo. En la misma gráfica se exponen las actividades de la celulasa, que como ocurría en los experimentos anteriores, son más bajas que las medidas para las otras dos enzimas.

El perfil de producción de la celulasa oscila durante toda la fermentación. Tras 11 días de cultivo alcanza el máximo de  $2,79 \pm 0,54$  UA/gss, que es 8,2 veces superior al determinado con orujo de uva lavado.

De este experimento se puede concluir que las cáscaras de naranja son un buen sustrato de fermentación para la obtención de las enzimas objeto de estudio y que, previsiblemente supondrá un adecuado complemento nutritivo para el orujo de uva con el objeto de aumentar sus productividades.

### 3.4.5. FES sobre una mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja lavados utilizando *Aspergillus awamori*

Una vez demostrado que la pectina presente en las cáscaras de naranja induce la síntesis de exo-PG y que las otras dos enzimas también se obtienen en gran medida a partir de este sustrato, se decidió utilizar este residuo para suplementar el orujo de uva lavado en una proporción 1:1 (p/p). Para el desarrollo de estos experimentos se ajustó la humedad inicial del sólido con la solución nutritiva sin sacarosa ni pectina. En la siguiente figura se recogen los resultados obtenidos.



**Figura 3.21: Resultados obtenidos tras la fermentación de *A. awamori* sobre una mezcla 1:1 (p/p) de orujo de uva y cáscaras de naranja ambos lavados: evolución de la concentración de los azúcares reductores (a), pH (b), actividad xilanasa (c), actividades exo-PG y celulasa (d).**

En la gráfica 3.21 (a) se muestra la evolución seguida por la concentración de los azúcares reductores, que es muy similar a la obtenida cuando se utilizó como sustrato de fermentación el orujo de uva lavado y las cáscaras de naranja por separado.

En relación al pH, los resultados obtenidos se representan en la gráfica 3.21 (b), donde se observa cómo aumenta con el transcurso de la fermentación al igual que ocurría con los medios de cultivo anteriormente descritos. En este caso, partiendo de un pH inicial de 3,22, alcanza un valor de 6,31 tras cinco días de cultivo, momento a partir del cual se mantiene constante hasta el final de la fermentación.

En la gráfica 3.21 (c) se exponen los resultados analizados para la enzima xilanasa. Con el transcurso de la fermentación la actividad de la enzima aumenta hasta alcanzar el máximo de  $32,69 \pm 3,94$  UA/gss tras 6 días de cultivo. A partir de este momento se produce una ligera disminución, midiendo una actividad de  $24,00 \pm 0,11$  UA/gss tras 12 días de fermentación. El valor máximo alcanzado para esta enzima, además de ser 16,7 veces superior al determinado con el orujo de uva lavado, se alcanza en un tiempo de fermentación menor, lo que supone una indudable ventaja productiva.

En la gráfica 3.21 (d) se observa como la actividad exo-PG aumenta durante los primeros días de fermentación, alcanzando un valor de  $3,77 \pm 0,87$  UA/gss transcurridos cuatro días de cultivo. Tras este máximo, la actividad disminuye ligeramente midiendo el sexto día el mínimo de  $1,43 \pm 0,21$  UA/gss. Al igual que ocurría en las fermentaciones anteriores, los resultados analizados para la exo-PG son inferiores a los determinados para la xilanasa, sin embargo, el máximo se obtiene en un menor tiempo de cultivo. A la vista de los resultados mostrados se observa que utilizando la mezcla compuesta por orujo de uva lavado y cáscaras de naranja se obtiene una máxima actividad exo-PG 4,6 veces superior a la alcanzada cuando se

utilizó el orujo de uva lavado como sustrato de fermentación, aunque menor que la registrada sólo con el residuo de naranja.

La evolución seguida por la enzima celulasa se expone en la gráfica 3.21 (d), determinando valores de actividad del mismo orden de magnitud que los de la exo-PG. El máximo de  $5,35 \pm 0,00$  UA/gss se alcanza tras 10 días de fermentación, siendo 15,7 veces superior al determinado con orujo de uva lavado.

A modo de resumen, la adición de cáscaras de naranja al orujo de uva lavado mejora la producción de las enzimas xilanasa, exo-PG y celulasa. Con este complemento, las actividades obtenidas son del mismo orden, o incluso superiores en algunos casos, a las producidas a partir de otros residuos agroindustriales. Así, por ejemplo, mediante la fermentación de *Penicillium decumbens* sobre una mezcla constituida por un 90% de paja de maíz y un 10% de salvado de trigo, ajustando la humedad inicial con 25 mL de una solución mineral, se obtuvieron actividades xilanasa y celulasa de 13,59 y 9,05 UA/gss respectivamente, tras 4 días de cultivo a 28°C. La solución, cuyo pH se ajustó a 5, estaba compuesta de 0,5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,16 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 0,02 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .<sup>92,238</sup>

Resultados similares se obtuvieron tras la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre 2,5 g de cáscaras de naranja secas (que fueron extraídas con agua desionizada para eliminar los compuestos solubles en agua), que se humedecieron al 70,5% con medio líquido mineral Toyama para la obtención de enzimas hidrolíticas.<sup>17</sup> De esta forma, se alcanzaron las actividades máximas de  $5,2 \pm 0,2$  y  $33,0 \pm 1,0$  UA/gss para la xilanasa y la poligalacturonasa respectivamente.

Actividades del mismo orden de magnitud se obtuvieron tras la fermentación de *Fomes sclerodermeus* sobre 4 gramos de salvado de soja, cuya humedad inicial se ajustó

con agua destilada.<sup>253</sup> En este caso, se midió una actividad máxima xilanasa de 16,5 UA/gss tras 12 días de fermentación. Para la enzima poligalacturonasa se analizó un valor máximo de 28,42 UA/gss transcurridos 15 días de cultivo.

La fermentación del hongo *Aspergillus foetidus* NCIM 514 sobre cabezas de girasol sin semillas también proporcionó resultados similares. De esta forma, tras 4 días de fermentación a 30°C, se produjeron 5,1 UA/gss de enzima pectinasa. En este caso, se ajustó la humedad inicial del sólido con una solución mineral.<sup>261</sup>

Otro ejemplo a señalar es la fermentación de *Bacillus subtilis* sobre residuos de plátano, ajustando la humedad inicial al 70% con una solución mineral, donde se obtuvo una actividad celulasa de 9,6 UA/gss tras 72 horas de cultivo.<sup>262</sup>

A modo de resumen, en la tabla 3.3 se muestran los valores máximos de actividad de las enzimas xilanasa, exo-PG y celulasa obtenidos en los distintos experimentos llevados a cabo en este capítulo.

---

<sup>261</sup> Patil, S.; Dayanand, A. (2006). Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology*, **97**, 16, 2054-2058.

<sup>262</sup> Krishna, C. (1999). Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technology*, **69**, 231–239.

Hongo	Sustrato	Solución ajuste humedad	Valor máximo de actividad enzimática/día de cultivo (UA/gss)		
			Xilanasa	Exo-PG	Celulasa
<i>Aspergillus awamori</i>	Medio sintético		4,48 (3 <sup>er</sup> día)	0,39 (3 <sup>er</sup> día)	0,31 (6 <sup>o</sup> día)
<i>Aspergillus awamori</i>	Orujo de uva	Agua destilada	0,00	0,00	0,00
<i>Aspergillus awamori</i>	Orujo de uva lavado	Agua destilada	1,96 ± 0,74 (21 <sup>er</sup> día)	0,82 ± 0,20 (14 <sup>o</sup> día)	0,34 ± 0,30 (6 <sup>o</sup> día)
<i>Aspergillus awamori</i>	Orujo de uva lavado	Solución nutritiva	20,59 ± 0,52 (8 <sup>o</sup> día)	3,96 ± 0,39 (3 <sup>er</sup> día)	3,50 ± 0,25 (7 <sup>o</sup> día)
<i>Aspergillus awamori</i>	Orujo de uva lavado	Solución nutritiva sin sacarosa	18,67 ± 0,16 (6 <sup>o</sup> día)	3,18 ± 0,17 (6 <sup>o</sup> día)	3,44 ± 1,5 (8 <sup>o</sup> día)
<i>Aspergillus awamori</i>	Cáscaras de naranja	Solución nutritiva sin sacarosa ni pectina	43,74 ± 1,78 (8 <sup>o</sup> día)	16,9 ± 1,4 (14 <sup>o</sup> día)	2,79 ± 0,54 (11 <sup>er</sup> día)
<i>Aspergillus awamori</i>	Mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja (1:1)	Solución nutritiva sin sacarosa ni pectina	32,69 ± 3,94 (6 <sup>o</sup> día)	3,77 ± 0,87 (4 <sup>o</sup> día)	5,35 ± 0,00 (10 <sup>o</sup> día)

**Tabla 3.3:** Valores máximos de actividad enzimática alcanzados en los distintos experimentos desarrollados en este capítulo.



### 3.5. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en el presente capítulo se puede concluir lo siguiente:

- Es necesario lavar el orujo de uva para disponer de un sustrato de fermentación a partir del cual, independientemente de su origen, se obtengan actividades enzimáticas reproducibles. Este proceso permite eliminar el exceso de azúcares reductores para estimular la producción de enzimas hidrolíticas.
  
- Mediante la suplementación del orujo de uva lavado con una solución nutritiva se mejora la producción de las enzimas xilanasas, exo-PG y celulasa.
  
- Atendiendo a los resultados obtenidos con las fermentaciones de orujo de uva y cáscaras de naranja, se puede predecir la producción de las enzimas en estudio exclusivamente con la medida de los azúcares reductores y el pH. Así, una baja concentración de azúcares reductores (inferior a 0,061 mmol/gss) y un pH medio entre 4,11 - 6,31 en los extractos son indicativos de una alta actividad de las enzimas objeto de estudio.
  
- Como conclusión general, la adición al orujo de uva lavado de cáscaras de naranja, ajustando la humedad inicial con la solución nutritiva, mejora en gran medida las actividades enzimáticas obtenidas.





# 4

## ESTUDIO DE DIFERENTES CONFIGURACIONES DE REACTOR PARA EL DESARROLLO DE LAS FERMENTACIONES



## 4.1. INTRODUCCIÓN

Tal y como se ha visto en los capítulos anteriores, en las primeras etapas de la investigación relacionada con fermentaciones (ya sea en cultivo sumergido o en estado sólido) es conveniente trabajar a una escala pequeña, utilizando para ello dispositivos sencillos de laboratorio como por ejemplo placas petri, tarros, erlenmeyers de boca ancha, botellas Roux, etc.<sup>263,264,265</sup> Las principales ventajas que presentan estos sistemas son su sencillez y la posibilidad de trabajar con un gran número de ellos. Además, si no es necesario utilizar aireación forzada ni agitación, como es el caso de algunas fermentaciones en estado sólido, únicamente se precisa regular la temperatura de incubación. Obviamente, para un posterior escalado a nivel industrial, no es suficiente con los datos proporcionados por los estudios previos llevados a cabo a escala de laboratorio, siendo necesario realizar una investigación más profunda en reactores de mayor tamaño.

A pesar de que en la bibliografía se han descrito en los últimos años infinidad de dispositivos para procesos de FES a escala de laboratorio,<sup>168,266</sup> hay muy poca información disponible en relación al diseño y evaluación de reactores a mayor escala.<sup>267</sup> A continuación, se describirán brevemente los principales.

---

<sup>263</sup> Durand, A.; Renaud, R.; Maratray, J.; Almanza, S. (1995). The INRA-Dijon reactors: designs and applications. *Advances in Solid State Fermentation, Proceedings of the 2nd international symposium on solid state fermentation FMS-95*. Montpellier, France, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 71–92.

<sup>264</sup> Pandey, A.; Soccol, C.; Rodríguez-Leon, J.; Nigam, P. (2001). Aspects of design of fermenter in solid state fermentation. *Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications*, Asiatech Publishers Inc., New Delhi, 73–77.

<sup>265</sup> Durand, A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 2, 113-125.

<sup>266</sup> Lonsane, B.; Ghildyal, N.; Budiartman, S.; Ramakrishna, S. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **7**, 258-265.

<sup>267</sup> Ahmed, S.; Lonsane, B.; Ghildyal, N.; Ramakrishna, S. (1987). Design of solid state fermentor for production of fungal metabolites on large scale. *Biotechnology Techniques*, **1**, 97-102.

#### 4.1.1. Clasificación de reactores de FES

Atendiendo al modo de disposición del medio sólido y al tipo de aireación y agitación aplicados, Mitchell y col. (2006) clasificaron los biorreactores de FES en 4 grupos diferentes:<sup>268</sup>

- *Grupo I: Biorreactores de bandeja:* son dispositivos donde el lecho permanece estático o mezclado con poca frecuencia (1 ó 2 veces al día), consistentes en una cámara en la que se disponen una serie de bandejas individuales, unas apiladas sobre las otras. Entre ellas se deja un espacio de forma que al bombear aire, este circula a lo largo de las bandejas, que normalmente están perforadas para facilitar el flujo del mismo.
- *Grupo II: Biorreactores de lecho fijo:* al igual que los biorreactores de bandeja, el lecho permanece estático o mezclado con poca frecuencia y consisten en una columna de sección cilíndrica o rectangular orientada verticalmente, con una base perforada en la parte inferior para el soporte del sólido que permite el paso del aire introducido en el sistema.
- *Grupo III: Biorreactores de tambor:* en esta configuración el lecho está continuamente en agitación o en agitación intermitente con una frecuencia de minutos u horas. En este caso, el aire circula a través del lecho sin utilizar aireación forzada. Se pueden emplear dos tipos de agitación dando lugar a dos biorreactores diferentes: de tambor agitado y de tambor rotatorio.

---

<sup>268</sup> Mitchell, D.; Krieger, N.; Berovic, M. (2006). Solid-state fermentation bioreactor. *Fundamentals of design and operation*. Springer-Verlag (Ed.), New York.

- *Grupo IV: Biorreactores con aireación forzada:* en ellos el lecho es agitado y aireado utilizando aireación forzada. Este tipo de biorreactor puede operar de dos maneras diferentes: con agitación continua o intermitente (con una frecuencia de mezcla de minutos u horas). A este grupo pertenecen los biorreactores de lecho gas-sólido fluidizado, biorreactores de tambor balanceado, etc.

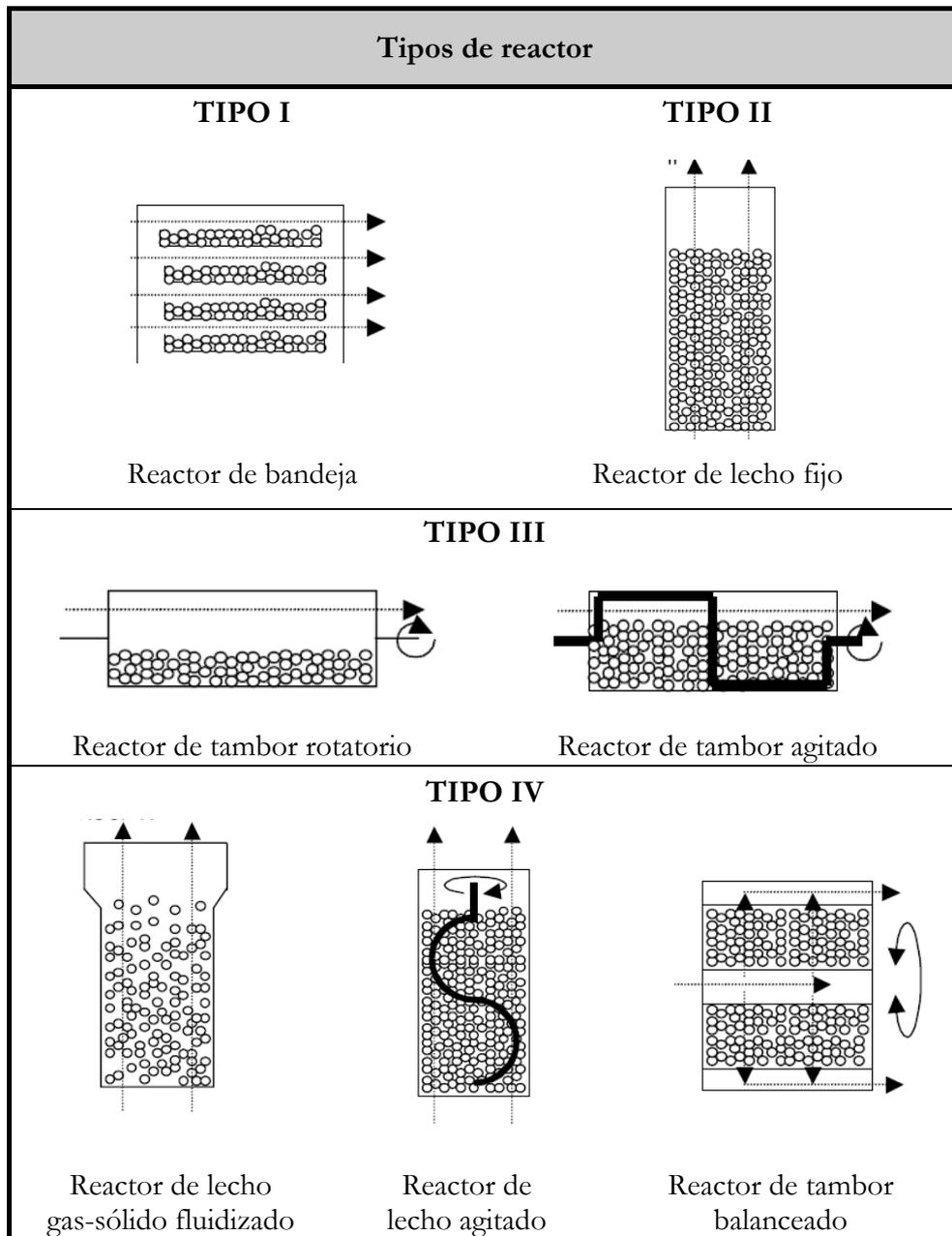


Figura 4.1: Diseños básicos de biorreactores de FES.<sup>268</sup>

Atendiendo a la cantidad de sólido a utilizar, los biorreactores de FES pueden dividirse a su vez en dos categorías:<sup>265</sup>

- A escala de laboratorio: utilizando cantidades de medio sólido de algunos gramos a varios kilogramos.
- A escala de planta piloto o industrial: donde se emplean desde varios kilogramos a toneladas.

Además, desde el punto del régimen de operación, los reactores de FES pueden trabajar en modo discontinuo, continuo o discontinuo-alimentado, siendo los más comunes los discontinuos.<sup>123,269</sup>

En virtud de la clasificación realizada por Mitchell y col.<sup>268</sup> podemos diferenciar a grandes rasgos dos tipos genéricos de biorreactores: los que operan en condiciones estáticas y los que presentan sistemas de agitación.

#### 4.1.1.1. Reactores sin agitación

En general, los reactores que no disponen de un sistema de agitación se utilizan cuando se hace preciso que el sustrato sólido permanezca en estático durante la fase de crecimiento del microorganismo, o cuando se necesita que las partículas de sólido permanezcan unidas para que se produzca el crecimiento del micelio, como ocurre en la producción de alimentos fermentados como el tempeh.<sup>270,271</sup>

---

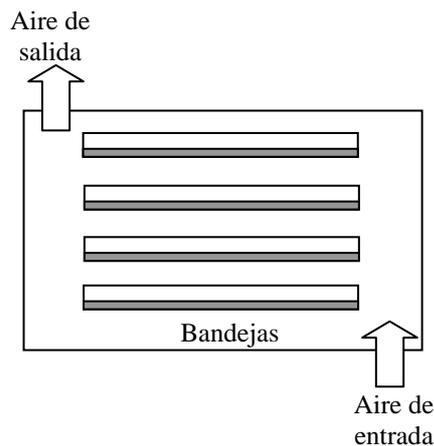
<sup>269</sup> Raghavarao, K.; Ranganathan, T.; Karanth, N. (2003). Some engineering aspects of solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 2-3, 127-135.

<sup>270</sup> Mitchell, D.; Von Meien, O. (1999). Mathematical modelling as a Tool to investigate the design and operation of the Zymotis packed bed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**, 2, 127-135.

<sup>271</sup> Silman, R. (1980). Enzyme formation during solid-substrate fermentation in rotating vessels. *Biotechnology and Bioengineering*, **22**, 411-420.

A este grupo de reactores pertenecen:

- Reactores de bandeja: son los más sencillos dentro de los distintos tipos de reactor sin agitación disponibles. Están constituidos por una serie de platos, que pueden ser de madera, metal o plástico, donde el sólido inoculado se dispone en finas capas.<sup>272</sup>



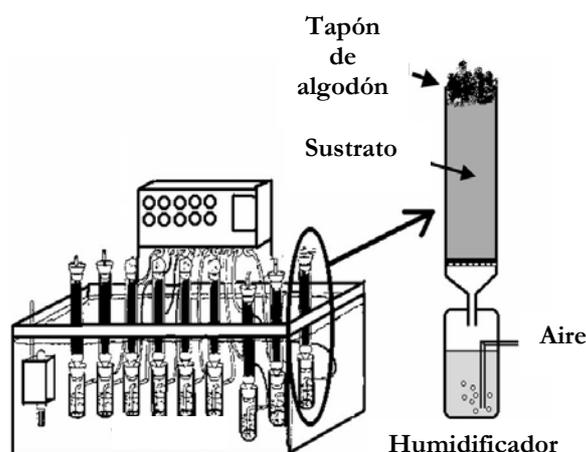
**Figura 4.2: Esquema de un reactor de bandejas.**

- Reactores de lecho fijo: son los biorreactores sin agitación más utilizados debido a que la aireación forzada permite controlar más fácilmente las condiciones ambientales del lecho mediante la manipulación de la temperatura y del caudal del aire de entrada.<sup>273</sup> Como ejemplo de este tipo de biorreactores se puede citar el desarrollado y patentado por ORSTOM (Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer), que consiste en pequeñas columnas aireadas con aire saturado en agua. El esquema de este sistema se representa en la figura 4.3.

---

<sup>272</sup> Sangsurasak, P.; Mitchell, D. (1995). Incorporation of death kinetics into a 2-D dynamic heat transfer model for solid state fermentation. *Journal of Technology and Biotechnology*, **64**, 253-260.

<sup>273</sup> Bhargav, S.; Panda, B.; Ali, M.; Javed, S. (2008). Solid-state fermentation: An overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, **22**, 1, 49-70.



**Figura 4.3: Reactor de columna a escala de laboratorio patentado por ORSTOM.<sup>273</sup>**

Este sistema ha sido utilizado por otros investigadores ya que ofrece la posibilidad de airear el medio de fermentación y medir el O<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> a la salida de las columnas con ayuda de un analizador de gases. Debido a la pequeña cantidad de sólido que se utiliza en este reactor (sólo unos gramos) y a la geometría de la columna, la eliminación de calor es suficiente para mantener la temperatura durante la fermentación.<sup>273,274</sup> El principal inconveniente que presenta es que no permite la toma de muestra durante del proceso, siendo necesario sacrificar toda la columna para cada análisis. Sin embargo, debido a las ventajas que ofrece en cuanto a facilidad de aireación, bajo coste y facilidad de uso, puede ser muy útil en las primeras etapas de una investigación.

Hay configuraciones de reactor de lecho fijo que permiten la toma de muestra durante la fermentación, como es el caso de la utilizada por Gowthaman y col.,

<sup>274</sup> Medeiros, A.; Pandey, A.; Christen, P.; Fontoura, P.; de Freitas, R.; Soccol, C. (2001). Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed column bioreactor. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **17**, 767–771.

que presenta orificios a lo largo de toda la columna.<sup>275</sup> A diferencia del reactor anteriormente descrito, la columna está fabricada con acero inoxidable.

Un diseño similar al descrito por ORSTOM pero con algunas modificaciones fue empleado por Lu y col.<sup>276</sup> El sistema consiste en una única columna que cuenta con la presencia de sondas que permiten la medida de la temperatura durante la fermentación. Otra diferencia respecto al diseño de ORSTOM consiste en la introducción del aire por la parte superior de la columna, que evita el desplazamiento del lecho hacia arriba y, por tanto, el posible bloqueo del sistema a tiempos de fermentación elevados. El sistema cuenta, además, con una trampa para eliminar las esporas del aire de salida. Para el mantenimiento de la temperatura, el reactor se coloca en una habitación termostatazada. Con este mismo propósito, otras configuraciones de reactor descritas en la bibliografía disponen de columnas rodeadas por una doble camisa a través de la cual circula agua procedente de un baño cuya temperatura está fijada.<sup>277,278</sup>

El lecho fijo es una configuración muy útil en biorreactores ya que ofrece información muy interesante para el escalado del proceso mediante el estudio de parámetros como la temperatura del aire de entrada y su caudal.

---

<sup>275</sup> Gowthaman, M.; Raghava, K.; Ghildyal, N.; Karanth, N. (1993). Gas concentration and temperature gradients in a packed bed solid-state fermentor. *Biotechnology Advances*, **11**, 611-620.

<sup>276</sup> Lu, M.; Brooks, J.; Maddox, I. (1997). Citric acid production by solid-state fermentation in a packed-bed reactor using *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, **21**, 392-397.

<sup>277</sup> Milagres, A.; Santos, E.; Piovan, T.; Roberto, I. (2004). Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. *Process Biochemistry*, **39**, 11, 1387-1391.

<sup>278</sup> Rodriguez, S.; Rivela, I; Muñoz, N. (2000). Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poli R-478 in packed bed bioreactor by *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess Engineering*, **23**, 287-293.

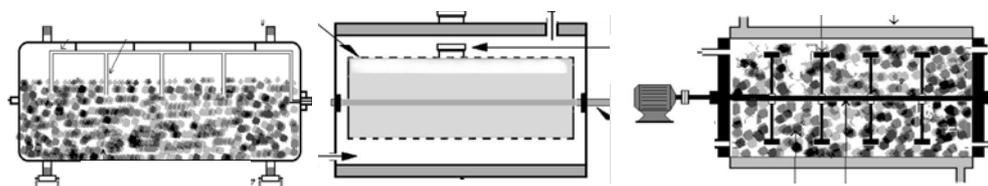
#### 4.1.1.2. Reactores con agitación

Los reactores descritos hasta ahora operan en condiciones estáticas. Sin embargo, para el desarrollo de procesos de FES es de gran interés introducir la agitación, dadas las numerosas ventajas que proporciona este parámetro:<sup>290</sup>

- Aumenta la homogeneidad del medio de fermentación.
- Incrementa la transferencia de materia.
- Distribuye uniformemente las sustancias añadidas durante el cultivo.
- Mejora del intercambio gaseoso, la evaporación y la transmisión de calor.

En contrapartida, la agitación plantea una serie de inconvenientes tales como ocasionar daños al micelio, reducir la porosidad de los sustratos o provocar la desnaturalización de las enzimas producidas.<sup>24</sup> Además, algunos sustratos tienden a apelmazarse de tal forma que las partes internas no se ven afectadas por la agitación, limitándose así la efectividad del proceso.<sup>25</sup> Este problema se puede solventar utilizando agitación intermitente o consiguiendo una homogeneización del medio más efectiva.<sup>265,273</sup>

En la figura 4.4 se muestran los esquemas de tres reactores que disponen de sistema de agitación: tambor rotatorio, tambor perforado y tambor horizontal agitado con palas.



**Figura 4.4:** Reactores a escala de laboratorio con agitación: tambor rotatorio (a), tambor perforado (b) y agitado con palas (c).

En los reactores de tambor rotatorio, como por ejemplo los de cilindro horizontal, la mezcla se produce mediante el movimiento del sólido debido al giro del tambor, ayudado por la presencia de deflectores en la pared interna del mismo (perforada o no). Este modelo de reactor ha sido empleado por Marsh y col., cuyo diseño consiste en un tambor de acero inoxidable de 200 L que presenta 4 *baffles* de 17 cm que se encuentran fijos en las paredes del reactor.<sup>279</sup> El aire saturado en agua se introduce por la parte central de un extremo del reactor y sale por el opuesto. Tras la inoculación del sustrato sólido, el tambor se agita durante 30 min a 5 rpm, sin embargo, para la germinación de las esporas se deja en estático. Durante el resto de la fermentación el tambor rota continuamente a 0,5 rpm.

En la bibliografía se recogen diseños de reactor similares, que a diferencia del ejemplo anterior presentan un tambor perforado.<sup>187</sup> A través de los orificios del tambor se introduce el aire en el sistema de forma más homogénea. Este es el caso del reactor empleado por Kalogeris y col., que consiste en un tambor perforado de acero inoxidable de 10 litros de capacidad, que está rodeado por una doble camisa que permite el control de la temperatura.<sup>280</sup> Además, cuenta con un dispositivo que permite la conservación de la humedad del medio a través de la recirculación del agua evaporada y de orificios para su carga y descarga.

En ocasiones, debido a la naturaleza pegajosa de algunos sustratos se produce su adhesión a las paredes del tambor. Para evitarlo, en la bibliografía se describen reactores de tambor rotatorio que disponen de un rascador, que por contacto con la pared provoca la mezcla radial del medio de fermentación.<sup>281</sup> Esta configuración ha

---

<sup>279</sup> Marsh, A.; Mitchell, D.; Stuart, D.; Howes, T. (1998). O<sub>2</sub> uptake during solid-state fermentation in a rotating drum bioreactor. *Biotechnology Letters*, **20**, 607–611.

<sup>280</sup> Kalogeris, E.; Fountoukides, G.; Kekos, D.; Macris, B. (1999). Design of a solid-state bioreactor for thermophilic microorganisms. *Bioresource Technology*, **67**, 313–315.

<sup>281</sup> Nagel, F.; Tramper, J.; Bakker, M.; Rinzema, A. (2001). Model for on-line moisture-content control during solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **72**, 231–243.

sido empleada por Nagel y col, en la cual el rascador presenta orificios a través de los cuales se distribuye el aire uniformemente en el fermentador.

La agitación en los reactores de tambor rotatorio es menos eficaz que en el tambor agitado con palas.<sup>265,282</sup> Este último diseño normalmente consiste en un cilindro de vidrio en cuyo interior se sitúa un eje al que se unen varias palas que, al girar, provocan la mezcla del medio de fermentación. En esta configuración el aire se introduce a través del eje central siendo distribuido uniformemente en el lecho.

Como conclusión general, el criterio más útil para elegir entre distintas configuraciones de reactor FES (con o sin agitación) y diferentes condiciones de operación es la economía del proceso.<sup>268</sup> Cuando no se dispone de información suficiente a este respecto o esta es difícil de evaluar, la selección del reactor más apropiado puede realizarse en base a su productividad, que podría estar referida a la producción de microorganismo o a la de un determinado metabolito. Además, un reactor tiene que ser diseñado para facilitar la preparación del sustrato, su esterilización y la del sustrato fermentado después de la recuperación del producto, la inoculación, la carga y descarga del reactor y la recuperación del producto.<sup>123</sup>

#### 4.1.2. Influencia de la aireación en los reactores de FES

La aireación es un parámetro de crucial importancia de cara al rendimiento de un proceso de FES. En el Capítulo 2 se describieron las principales funciones de la aireación en la fermentación en estado sólido, entre las que cabe destacar la oxigenación del medio, la eliminación de CO<sub>2</sub>, la disipación del calor (regulando la

---

<sup>282</sup> Mitchell, D.; Lonsane, B.; Durand, A.; Renaud, R.; Almanza, S.; Maratray, J.; Desgranges, C.; Crooke, P.; Hong, K.; Tanner, D.; Malaney, G. (1992). General principles of reactor design and operation for solid substrate cultivation. *Solid Substrate Cultivation*, Rolz (Eds.), Elsevier Applied Science, Amsterdam, 115–139.

temperatura del medio), la distribución del vapor de agua (regulando la humedad) y la distribución de los compuestos volátiles producidos durante el metabolismo.<sup>2</sup>

La aireación ha mostrado ser beneficiosa en fermentaciones llevadas a cabo en distintos tipos de reactores. Así, por ejemplo, Kalogeris y col. determinaron mayores actividades de sus enzimas de interés (hemicelulasas y celulasas) y un mejor desarrollo del hongo al emplear altos caudales de aireación en un reactor de tambor rotatorio.<sup>283</sup> De la misma forma, Lambraki y col. registraron como sólo a altos caudales de aire el hongo *Aspergillus carbonarius* es capaz de degradar los taninos presentes en vainas de algarrobo mediante FES en un reactor de lecho fijo.<sup>284</sup>

Atendiendo a estas consideraciones, el caudal de aire óptimo a utilizar en un reactor de FES (tanto a escala de laboratorio como a una escala mayor) dependerá de la naturaleza del microorganismo que se vaya a utilizar, del oxígeno necesario para la síntesis de producto, de la cantidad de calor generado que haya que retirar del reactor, del grado de eliminación de dióxido de carbono y otros metabolitos volátiles que sea requerido, de la altura del lecho, del aire disponible en el espacio interpartícula, etc.<sup>266</sup> En este capítulo se muestra el estudio de la influencia de la aireación en los reactores diseñados.

---

<sup>283</sup> Kalogeris, E.; Iniotaki, F.; Topakas, E.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris, B. (2003). Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Bioresource Technology*, **86**, 3, 207-213.

<sup>284</sup> Lambraki, M.; Marakis, S.; Roussos, S. (1994). Effect of temperature and aeratio flow on carob tannin degradation by *Aspergillus carbonarius* in solid state fermentation system. *Micología neotropical aplicada*, **7**, 23-34.

### 4.1.3. Escalado de los reactores de FES

Los ejemplos descritos hasta ahora corresponden a reactores a escala de laboratorio, los cuales proporcionan información muy útil para la posterior construcción de reactores de mayor capacidad.

Existen numerosos datos bibliográficos que indican que las ventajas de la fermentación en estado sólido sobre la sumergida, ya descritas en capítulos anteriores, son aún más significativas cuando se pasa de escala de laboratorio a escala de planta piloto: entre ellas, menores costes de proceso, mayores productividades volumétricas, menores posibilidades de contaminación del medio, etc. Sin embargo, cuando se trata de procesos a una escala aún mayor (prototipo o industrial), la FES puede empezar a presentar importantes problemas ingenieriles, debidos fundamentalmente al efecto de parámetros tan influyentes como la temperatura, el pH, el oxígeno, los gradientes de concentración de sustrato, la humedad, etc.<sup>5</sup> El principal de estos problemas es el relacionado con la disipación de calor. Como es sabido, durante la fermentación en estado sólido se genera una gran cantidad de calor como consecuencia de la actividad metabólica de los microorganismos. Debido a que la mayoría de los sólidos utilizados como sustratos de fermentación presentan una baja transferencia de calor y, dado su bajo contenido en humedad, resulta muy complicada la eliminación del calor por conducción a través de las paredes del reactor.<sup>281,285,286</sup> Se ha demostrado que la eliminación del calor por evaporación es un método de enfriamiento más eficaz que la convección y la conducción.<sup>287,288</sup> Sin

---

<sup>285</sup> Hasan, S.; Costa, J.; Sanzo, A. (1998). Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Techniques*, **12**, 10, 787-791.

<sup>286</sup> Saucedo-Castaneda, G.; Gutierrez-Rojas, M.; Bacquet, G.; Raimbault, M.; Viniestra-Gonzalez, G. (1990). Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **35**, 802–808.

<sup>287</sup> Roussos, S.; Raimbault, M.; Prebois, J.; Lonsane, B. (1993). Zymotis, a large scale solid state fermenter. Design and evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **42**, 37–51.

embargo, la evaporación provoca grandes pérdidas de humedad causando el secado del sustrato sólido,<sup>289,290</sup> siendo necesaria su combinación con la adición de agua al sistema.<sup>281,291</sup> En este último caso habría que utilizar un equipo que presente un sistema de agitación para conseguir una distribución homogénea del agua en el medio de fermentación.<sup>290,291</sup>

Otro inconveniente que pueden presentar los reactores de FES a gran escala es la compactación del medio durante la fermentación debida a su peso, creándose caminos preferenciales de aire que afectan a la transferencia de calor y materia en el interior del lecho.<sup>265</sup>

Se verán a continuación algunas características específicas del escalado de los dos tipos principales de reactores de FES descritos.

#### 4.1.3.1. Escalado de reactores sin agitación

Los reactores de FES sin agitación cuyo escalamiento es más sencillo son los de bandejas, ya que este se puede conseguir simplemente aumentando el número de ellas. Sin embargo, este reactor presenta otros inconvenientes relacionados con la dificultad de mantener el sistema en condiciones asépticas y el gran espacio requerido para colocar una gran cantidad de bandejas.

---

<sup>288</sup> Laukevics, J.; Apsite, A.; Viesturs, U.; Tengerdy, R. (1984). Solid-substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 1465–1474.

<sup>289</sup> Narahara, H.; Koyama, Y.; Yoshida, T.; Atthasampunna, P. (1984). Control of water content in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation Technology*, **62**, 453–459.

<sup>290</sup> Nagel, F.; Tramper, J.; Bakker, M.; Rinzema, A. (2000). Temperature Control in a continuously mixed bioreactor for solid-state Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **72**, 2, 219-230.

<sup>291</sup> Lonsane, B.; Saucedo-Castaneda, G.; Raimbault, M.; Roussos, S.; Viniestra-Gonzalez, G.; Ghildyal, N. (1992). Scale-up strategies for solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **27**, 259–273.

En cuanto al escalado de los reactores de lecho fijo, el principal inconveniente se produce al generarse un gradiente axial de temperaturas en el lecho, llegándose a alcanzar en algunas ocasiones aumentos de 20°C respecto del aire de entrada en la parte más alta del lecho.<sup>1,292,293</sup> Este gradiente se puede reducir mediante la utilización de columnas muy altas y muy delgadas, enfriándose el sistema a través de la pared del reactor. Sin embargo, esto no es una cuestión sencilla a escala industrial, ya que sería necesaria la construcción de columnas de gran altura que permitieran albergar una cantidad de sólido rentable.<sup>286</sup>

Un ejemplo de reactor sin agitación a escala de planta piloto es el diseñado por el equipo de ORSTOM conocido como Zymotis, cuyo diseño mejora la eliminación de calor en el medio de fermentación.<sup>270</sup> El sistema está constituido por una serie de platos colocados en disposición vertical, a través de los cuales circula agua fría, y en los que entra aire termostatzado por la parte inferior.<sup>32,265,287</sup> Entre los platos, se dispone el sustrato sólido inoculado. El principal inconveniente que presenta este sistema es que resulta complicado trabajar en condiciones asépticas aunque, como ya se comentó, este factor no es tan decisivo en el caso de reactores de FES. Además, a menudo se produce la reducción del volumen del medio como consecuencia del crecimiento miceliar, que puede provocar la disminución del contacto entre los platos verticales durante la fermentación. Esta situación podría provocar una disminución de la transferencia de calor y la creación de caminos preferenciales para el paso del aire.

---

<sup>292</sup> Ashley, V.; Mitchell, D.; Howes, T. (1999). Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, **3**, 2, 141-150.

<sup>293</sup> Ghildyal, N.; Gowthaman, M.; Raghava, K.; Karanth, N. (1994). Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed bed solid-state fermentors: effect of temperature gradients. *Enzyme and Microbial Technology*, **16**, 253-257.

#### 4.1.3.2. Escalado de reactores con agitación

Normalmente, el escalado de los sistemas con agitación en los reactores de FES, aunque compleja, no es una cuestión insalvable, debido a que generalmente se precisan velocidades de agitación muy bajas.<sup>266,291</sup>

Los principales factores a considerar a la hora de escalar un reactor con sistema de agitación son la cantidad de sustrato por unidad de volumen de reactor y la disposición de deflectores o *baffles* que eviten el apelmazamiento del sólido. Además, hay que tener en cuenta que en algunas ocasiones se produce la aglomeración del micelio y las partículas de sustrato, presentando gran dificultad la separación de los agregados. Como consecuencia, se reduce la transferencia de calor, materia y oxígeno en el medio de fermentación.<sup>265,294</sup>

Los reactores con agitación más comunes son los de tambor rotatorio, aunque principalmente han sido utilizados a escalas de laboratorio y pre-piloto. A este grupo pertenece uno de los reactores de mayor tamaño citado en la bibliografía descrito por Fung y Mitchell.<sup>265,295</sup> Consiste en un tambor rotatorio de acero inoxidable de 200 L, utilizado para realizar estudios cinéticos de la fermentación de *Rhizopus* sobre salvado de trigo.

En relación a los reactores que trabajan con agitación intermitente, hay que tener en cuenta que en el periodo estático se comportan como los reactores de bandejas, siendo entonces un factor limitante la altura del lecho sólido a utilizar.<sup>265</sup>

---

<sup>294</sup> Stuart, D.; Mitchell, D.; Johns, M.; Lister, J. (1998). Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors: operating variables affect performance through their effects on transport phenomena. *Biotechnology and Bioengineering*, **63**, 383–391.

<sup>295</sup> Fung, C.; Mitchell, D. (1995). Baffles increase performance of solid state fermentation in rotating drums. *Biotechnology Techniques*, **9**, 295–298.

#### 4.1.4. Diferencias de diseño de un reactor de Fermentación en Estado Sólido (FES) y de Fermentación en Cultivo Sumergido (FCS).

Un aspecto fundamental en el diseño de un reactor de FES es el bajo contenido en agua que posee el sólido, presentando gran importancia la fase gaseosa existente entre las partículas. Debido a la baja conductividad de la fase gaseosa y de los sólidos normalmente utilizados como sustratos resulta más complicada la eliminación del calor acumulado como consecuencia de las actividades metabólicas.<sup>265</sup> Estos factores afectan al diseño del reactor y al control del sistema.

Por el contrario, en la fermentación en cultivo sumergido el medio está constituido básicamente por agua, que presenta un mayor coeficiente de transmisión de calor, con lo que los reactores son más sencillos de termostatar. Por el contrario, esta técnica tiene el inconveniente de que la transferencia de oxígeno en disoluciones acuosas es menor que en gases, desventaja frente a la FES que se podría solucionar mediante el diseño de un reactor con la forma y el tamaño apropiados y mejorando el sistema de aireación/agitación.

Otra diferencia clave se refiere al control de ambos sistemas. Debido al importante desarrollo experimentado por la industria de la fermentación en las últimas décadas, en los reactores de cultivo sumergido se han implementado numerosos automatismos controlados por ordenador.<sup>296</sup> Sin embargo, esta evolución no ha sido paralela en reactores de estado sólido, a pesar del alto potencial que presenta esta técnica para la producción de productos de elevado interés comercial. Esto ha sido debido, fundamentalmente, al limitado desarrollo que la técnica de FES ha tenido hasta ahora a escala industrial y al reducido número de diseños de reactor y sistemas

---

<sup>296</sup> Pandey, A. (1991). Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. *Process Biochemistry*, **26**, 355–361.

de control aplicables a la misma.<sup>297</sup> En este sentido, aún no se han resuelto adecuadamente asuntos tan decisivos para el control del proceso como la determinación de la biomasa u otros parámetros influyentes como el pH.

Parámetros igualmente decisivos en el diseño de ambos tipos de reactores (FCS o FES) son el caudal de aire y la velocidad de agitación. Tanto en unos como en otros la aireación debe beneficiar al crecimiento del hongo debido a que mejora la transferencia de oxígeno, así como de sustratos y productos. Por otra parte, la agitación facilita la transferencia de calor y materia y proporciona un mayor grado de homogeneidad al medio de fermentación. Sin embargo, es preciso tener en cuenta también que puede causar cambios morfológicos en el microorganismo, provocando daños en su estructura celular y alterando su crecimiento y las posibilidades de formación de producto.<sup>298</sup>

---

<sup>297</sup> Robinson, T.; McMullan, G.; Marchant, R.; Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, **77**, 247–255.

<sup>298</sup> Oncu, S.; Unluturk, S.; Tari, C.; Gogus, N. (2006). Various factors affecting the pellet morphology, broth reology and pectinase enzyme production in submerged fermentation of *Aspergillus sojae*. 13th World Congress of Food Science & Technology.

## **4.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO**

Los principales objetivos que se pretenden conseguir con el desarrollo de este capítulo son:

- Diseño y construcción de diferentes tipos de reactor a escala de laboratorio (de lecho fijo, de bandejas y de tambor rotatorio) para la producción de enzimas hidrolíticas a partir de la fermentación en estado sólido de orujo de uva y cáscaras de naranja.
- Estudio de la influencia de la aireación y la agitación sobre la producción de las enzimas mencionadas utilizando los reactores de FES construidos.
- Diseño, construcción y puesta a punto de un reactor, a escala de laboratorio, de cultivo sumergido para la producción de enzimas hidrolíticas.
- Comparación de los distintos tipos de reactor de FES y FCS empleados en el presente capítulo en función de los niveles de actividad enzimática obtenidos en cada caso.
- Evaluación de las ventajas e inconvenientes de las distintas configuraciones de reactor utilizadas.



### 4.3. MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se va a presentar la descripción del diseño y puesta a punto de los reactores de FES y de FCS utilizados para la producción de las enzimas xilanasas, exo-PG y celulasa así como la metodología seguida para la preparación del medio de fermentación y su inoculación.

#### 4.3.1. Fermentadores en Estado Sólido

A continuación se describe el medio de fermentación y las tres configuraciones de reactor empleadas para el desarrollo de las fermentaciones en estado sólido. Además, se indicarán las condiciones utilizadas para la extracción de las enzimas y los métodos desarrollados para la medida de su actividad.

##### *4.3.1.1. Preparación del medio de fermentación*

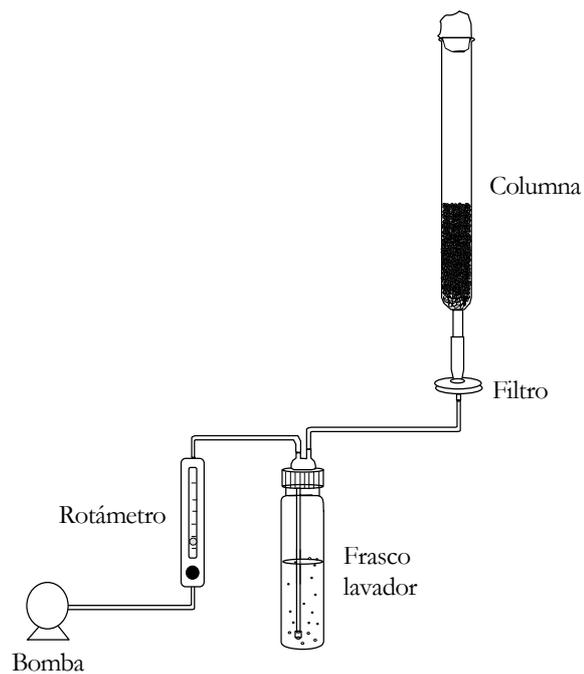
El sustrato natural usado para las fermentaciones en estado sólido fue una mezcla constituida por un 50% de orujo uva y un 50% de cáscaras de naranja (ambos lavados), que se inoculó con el hongo filamentoso *Aspergillus awamori*. La preparación del sólido y del inóculo se describió en los apartados 3.3.1 y 3.3.3 del Capítulo 3. A la vista de los resultados obtenidos en dicho capítulo, se ajustó la humedad inicial del sólido al 70% con una solución nutritiva, ajustada a pH 5, compuesta por 2,4 g/L de urea, 9,8 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5,0 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,001 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0008 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,004 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,001 g/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

#### 4.3.1.2. Reactor de lecho fijo

El reactor de lecho fijo consiste en una columna de vidrio de sección circular de 40 cm de alto y 2,5 cm de diámetro interno. Tras introducir los 10 gramos de sólido a fermentar el lecho alcanza una altura de 13 cm. Para conseguir un mayor grado de homogeneización y garantizar la esterilización dentro del reactor, la preparación del medio de reacción se llevó a cabo fuera del mismo; una botella de 250 mL conteniendo el medio seco se esterilizó en el autoclave y, posteriormente, se le añadió la cantidad de solución nutritiva necesaria para ajustar la humedad inicial del sólido al 70% y una solución de esporas con  $4,5 \cdot 10^7$  células. Se mezcló muy bien el contenido de la botella y se vertió sobre la columna de vidrio, previamente esterilizada. Todo este proceso fue llevado a cabo en una campana de flujo laminar para mantener la asepsia.

El sistema utilizado para el desarrollo de las fermentaciones se complementa, además, con una bomba de aire que proporciona la aireación necesaria para suministrar el  $O_2$  al microorganismo y retirar el  $CO_2$  producido durante su metabolismo. El aire es conducido a través de una tubería de silicona a un rotámetro, que regula el caudal deseado, pasando posteriormente a través de un frasco lavador que consigue su saturación en agua. Para que el aire que entra al sistema lo haga en condiciones asépticas, se hace pasar a través de un filtro de celulosa de  $0,45 \mu m$ , tras el cual se introduce por la parte inferior de la columna. Ahí, atraviesa una membrana de lana de vidrio utilizada para soportar el lecho y difunde por toda la columna para, finalmente, salir por un tapón de algodón situado en la parte superior.

El esquema del reactor de lecho fijo utilizado se muestra en la figura 4.5.

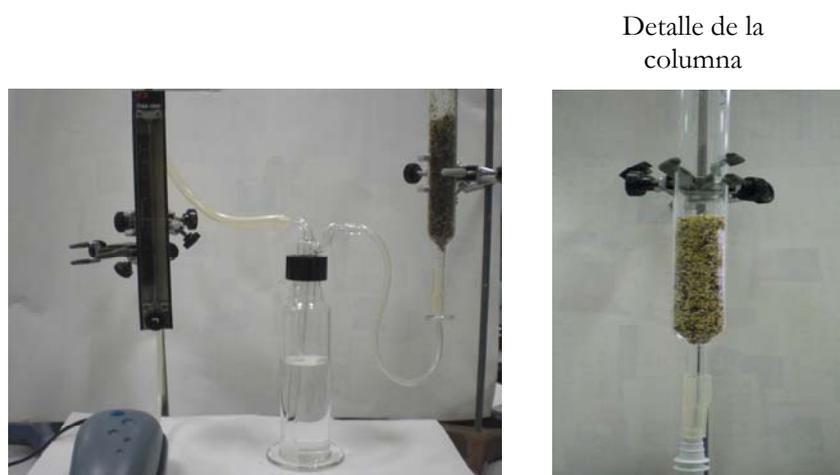


**Figura 4.5: Esquema del reactor de lecho fijo a escala de laboratorio.**

En un experimento previo, no detallado en la memoria, se comprobó que no es posible que el equipo aquí descrito opere con orujo de uva sin mezclar con otro sustrato. Esto se debe a que las partículas de sólido húmedas se compactan en exceso impidiendo el paso del aire. Aún más, cuando se utilizan altos caudales de aireación se produce el fraccionamiento del lecho dentro de la columna. Por este motivo, se realizó una prueba inicial consistente en añadir a la columna una mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja, ajustando su humedad al 70%. Dado que no se observó el desplazamiento del sólido y se detectó aire a la salida de la columna, se estableció como modo de operación más adecuado. Así pues, las cáscaras de naranja no sólo mejoran la calidad nutricional del orujo, como ya se explicó en el Capítulo 3, sino que además aumentan su porosidad facilitando la aireación.

Para el desarrollo de las fermentaciones el reactor se incubó a 30°C durante 5 días.

Para llevar a cabo el estudio de la influencia de la aireación se emplearon caudales de aire de 0, 6, 60, 90, 120, 180 y 300 mL/min, realizándose cada experimento por duplicado para el cálculo de los límites de confianza con un 95% de probabilidad.

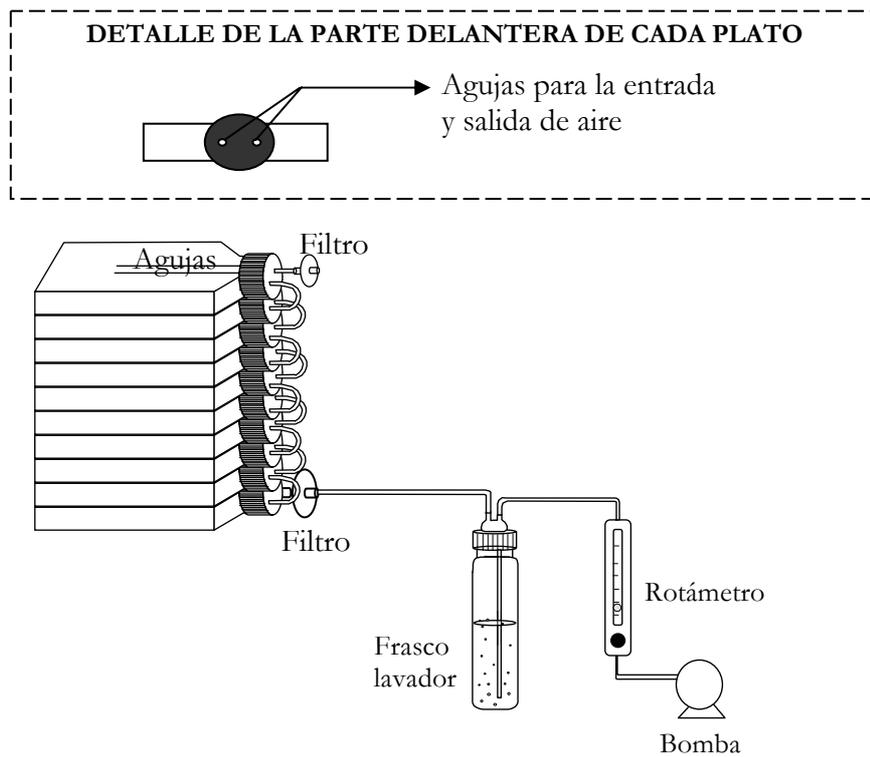


**Figura 4.6:** Fotografía del reactor de lecho fijo.

#### 4.3.1.3. Reactor de bandejas

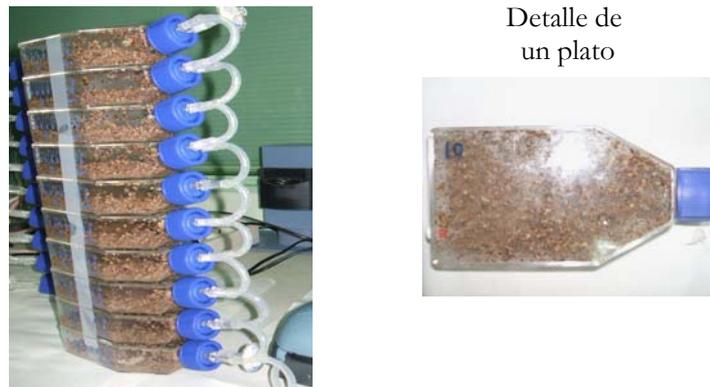
El sistema consiste en 10 botellas Roux estériles (que a partir de ahora, y por sencillez, se denominarán platos), que fueron apiladas e interconectadas para su aireación. Una bomba proporciona al sistema el aire necesario, cuyo caudal se fija con ayuda de un rotámetro. Tras el paso del aire por un frasco lavador se consigue su saturación en agua. Finalmente, entra al reactor por el primer plato, atravesando previamente un filtro de celulosa de  $0,45\ \mu\text{m}$  para su esterilización, saliendo por el décimo plato después de ser conducido por todo el sistema. El aire entra y sale en los distintos platos a través de dos agujas que atraviesan el tapón de cada botella Roux.

La descripción del reactor de bandejas utilizado se representa en el esquema de la figura 4.7.



**Figura 4.7:** Esquema del reactor de bandejas a escala de laboratorio.

Para llevar a cabo las fermentaciones, a cada plato se añaden 10 gramos de sólido a fermentar, la cantidad de solución nutritiva necesaria para ajustar la humedad al 70% y una solución de esporas con  $4,5 \cdot 10^7$  células. Para el desarrollo de las fermentaciones, el reactor se incubó a 30°C durante 5 días.



**Figura 4.8: Fotografía de la columna de platos.**

Con idea de comprobar si la temperatura y la humedad varían de forma significativa a lo largo del reactor, se midieron ambos parámetros en los platos 1 y 10 con ayuda de una sonda (Hygropalm). Para ello, se realizaron dos pequeños orificios en ambos platos a través de los cuales se introdujo la sonda para la realización de la medida. Esta sonda daba la medida de la temperatura y la humedad del aire situado sobre el lecho. Tras los numerosos experimentos realizados con este equipo, se concluyó que no se aprecian diferencias significativas en relación a la humedad y la temperatura en los platos anteriormente mencionados.

Los caudales de aire estudiados fueron 9, 120, 200 y 300 mL/min, realizándose cada experimento por duplicado para el cálculo de los límites de confianza con un 95% de probabilidad.

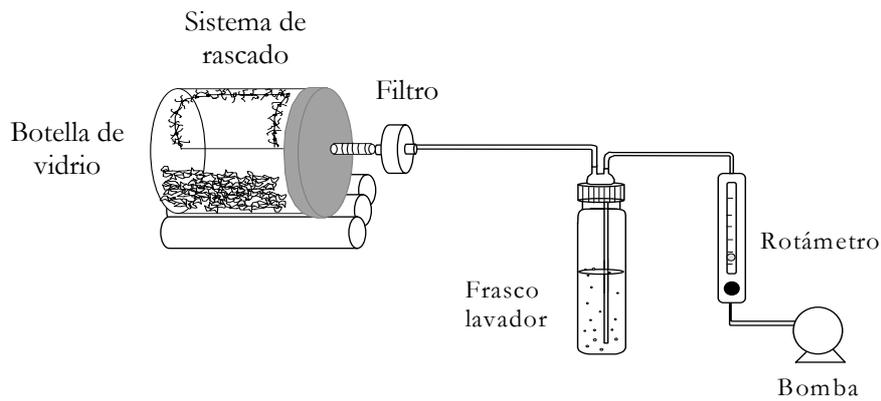
#### *4.3.1.4. Reactor de tambor rotatorio*

El diseño del reactor de tambor rotatorio requirió de numerosos ensayos previos encaminados a superar los inconvenientes operativos surgidos con este tipo de configuración. El diseño planteado inicialmente consistía en una botella de vidrio de

250 mL, a la que se añadía el medio de fermentación junto con el hongo y que se aireaba con ayuda de una bomba de aire. El reactor se colocaba sobre un sistema de rodillos que giraban de forma continua, produciéndose la mezcla del medio de fermentación. Este sistema, si bien simple, no resultó adecuado para garantizar la correcta agitación del medio ya que, tras varios días de incubación, el sólido inoculado se adhería a la pared del reactor. Como posible solución al problema se añadieron partículas de distintas formas y de distintos materiales (vidrio, acero, plástico, etc.) al medio de fermentación para tratar de evitar la adhesión del sustrato al vidrio; sin embargo, no se obtuvieron buenos resultados.

Se planteó así una nueva configuración que permitía que la fermentación transcurriera de manera satisfactoria sin producirse la adhesión del medio de fermentación a las paredes del reactor. El sistema definitivo consiste en una botella de vidrio de 250 mL y 7 cm de diámetro, en el interior de la cual se introduce un dispositivo constituido por un alambre moldeado a modo de rascador que, por contacto con la pared de la botella, retira el sólido adherido. Una bomba proporciona al reactor el aire necesario, cuyo caudal se regula con ayuda de un rotámetro. Tras el paso del aire por un frasco lavador se consigue su saturación en agua. Para su esterilización, se conduce a través de un filtro de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$ , colocado en una jeringuilla que atraviesa el tapón de la botella y se introduce en el reactor. Para aquellos experimentos que requieren agitación, se coloca la botella sobre un sistema de rodillos que giran de forma continua. De esta manera, se produce el movimiento de la botella y, en consecuencia, la mezcla y agitación del medio de fermentación.

El sistema anteriormente descrito se representa en la figura 4.9.



**Figura 4.9: Esquema del reactor de tambor rotatorio a escala de laboratorio.**

Tanto el sólido como la solución nutritiva fueron sometidos a dos ciclos de esterilización (20 min a 120 °C) en el autoclave. El reactor se esterilizó durante 30 min con vapor de agua.

El reactor se incubó a 30°C durante 5 días. Para el desarrollo de las fermentaciones, al reactor se le añaden 10 gramos de sólido, el volumen de solución nutritiva necesario para ajustar la humedad inicial al 70% y una solución de esporas con  $4,5 \cdot 10^7$  células. El lecho así constituido alcanza una altura de 2,5 cm, dejando espacio suficiente sobre su superficie para conseguir una buena agitación del medio de fermentación. En este sentido, hay que tener en cuenta que cuando el reactor de tambor rotatorio trabaja en estático se comporta de igual manera que un reactor de bandejas. Por este motivo, la altura de la capa de sólido a fermentar debe estar limitada para evitar la acumulación de una gran cantidad de calor en el medio de fermentación y para permitir una adecuada transferencia de oxígeno.



**Figura 4.10: Fotografía del reactor de tambor rotatorio.**

Para el estudio de la influencia de la aireación en la producción enzimática se evaluaron los caudales de aire de 0, 9, 120 y 200 mL/min. En cada experimento se estudió además el efecto del tipo de agitación: continua, intermitente (1 agitación de 1 min al día y 2 agitaciones de 10 minutos al día) y nula. Cada experimento se realizó por duplicado para el cálculo de los límites de confianza con un 95% de probabilidad.

#### *4.3.1.5. Extracción y medida de las enzimas*

Una vez que había transcurrido el tiempo de fermentación establecido para cada experimento, el sólido resultante fue extraído con 70 mL de una solución de Tween 80 (0,01%), empleando las condiciones descritas en el apartado 3.3.5 del Capítulo 3. Para el reactor de bandejas, cada plato se extrajo de forma independiente, obteniendo 10 soluciones diferentes.

La suspensión resultante tras la extracción se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C, recogiendo el sobrenadante y conservándose a -20°C hasta su análisis.

En cada uno de los extractos obtenidos se determinó el pH, la concentración de azúcares reductores y la actividad de las enzimas xilanasa, exo-PG y celulasa,

utilizando los métodos descritos en el apartado 3.3.6 del Capítulo 3.

### **4.3.2. Fermentador de cultivo sumergido (FCS)**

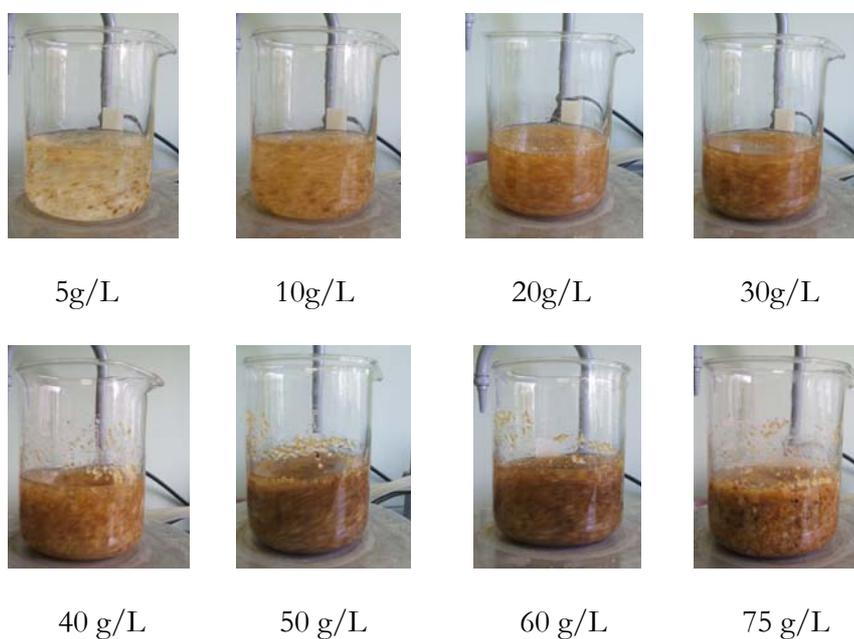
En este apartado se va a describir la puesta a punto del reactor de tanque agitado empleado para el desarrollo de fermentaciones en cultivo sumergido así como el procedimiento desarrollado para la preparación del medio de fermentación, la inoculación del fermentador, la obtención de los extractos y la medida de la actividad enzimática.

#### *4.3.2.1. Preparación del medio de fermentación*

En las fermentaciones desarrolladas en cultivo sumergido se utilizó como medio de fermentación una mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja convenientemente triturados y en una proporción 1:1 (p/p), que fue suspendida en una solución nutritiva (ajustada a pH 5) constituida por 2,4 g/L de urea, 9,8 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5,0 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,001 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0008 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,004 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,001 g/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . La preparación del orujo de uva y las cáscaras de naranja se describió en el apartado 3.3.1 del Capítulo 3.

Un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo una FCS con los nutrientes en suspensión es buscar la proporción sólido-líquido más apropiada, ya que afecta a la transferencia de oxígeno, al crecimiento del hongo y al grado de homogeneización del medio de fermentación. Por este motivo, se realizó un estudio inicial para evaluar el comportamiento en agitación de distintas proporciones sustrato-solución. Este experimento se llevó a cabo en vasos de precipitado de 250 mL, a cada uno de los cuales se añadieron 100 mL de agua destilada y cantidades crecientes de sólido: 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7,5 gramos.

En la figura 4.11 se muestra el aspecto de las suspensiones obtenidas en cada caso.



**Figura 4.11: Suspensiones con distinta proporción sólido-disolución.**

La decisión sobre la proporción más adecuada debe tener en cuenta que si la relación sólido-líquido es alta se podría esperar obtener una mayor concentración de las enzimas objeto de estudio, pero en ese caso la agitación será menos efectiva y este hecho ha de influir en la producción enzimática. Como se pone de manifiesto en la figura 4.11, las suspensiones de 40 a 75 g/L constituyen mezclas muy densas, lo que conllevaría a la disminución del grado de mezcla alcanzado en el reactor. El efecto contrario se produciría con las suspensiones de 5 y 10 g/L, en las que se alcanzaría una gran eficacia de agitación en el reactor pero baja concentración de enzimas obtenidas.

De la mera observación de las suspensiones formadas, se eligió trabajar con la concentración intermedia (20 g/L) para las fermentaciones desarrolladas en cultivo sumergido.

#### *4.3.2.2. Puesta a punto del protocolo de inoculación*

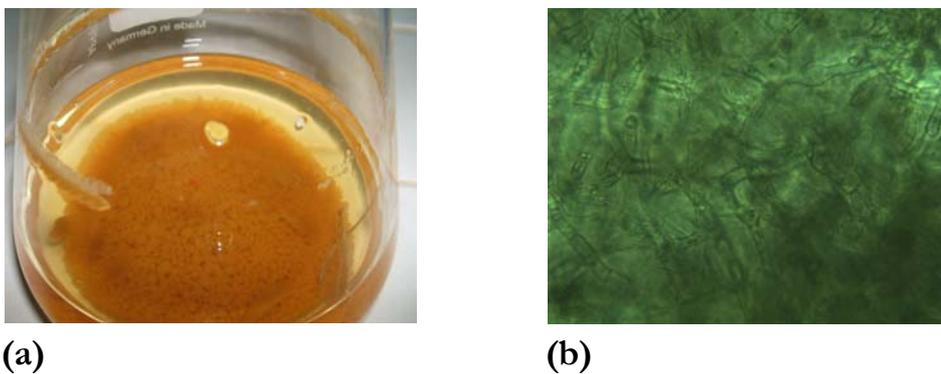
Con objeto de decidir el mejor protocolo de inoculación para el reactor de FCS se probaron dos metodologías distintas. Por un lado, inocular directamente con las esporas sobre la suspensión que contenía la mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja. Por otro, desarrollar previamente un preinóculo crecido sobre un medio de cultivo nutritivo líquido y adicionarlo posteriormente al reactor con la suspensión. Tras realizar unas pruebas iniciales en erlenmeyers de 250 mL (que fueron incubados a 30°C, 150 rpm durante 5 días), se determinó que la inoculación directa con esporas ralentizaba el inicio de la fermentación. Sin embargo, la adición al reactor de un preinóculo desarrollado previamente mostró ser un buen método de inoculación.

La solución nutritiva utilizada para la preinoculación contenía 2,4 g/L de urea, 9,8 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5,0 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,001 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0008 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,004 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,001 g/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1 g/L de peptona, 0,5 g/L de extracto de levadura, 3,5 g/L de xilano, 3,5 g/L de pectina y 50 g/L de glucosa. Esta solución, además de ser rica en nutrientes, presentaba xilano y pectina que actúan como inductores de la producción de xilanasas y pectinasas, respectivamente.

Para el desarrollo del preinóculo, a cada erlenmeyer de 500 mL se añadieron 100 mL de la solución nutritiva y una solución de esporas con  $3 \cdot 10^7$  células. La incubación se llevó a cabo en un agitador orbital durante 5 días a 30°C y 200 rpm. El análisis visual de la turbidez de la solución nutritiva puede aportar información muy útil acerca del

desarrollo del hongo, ya que inicialmente es turbia por la presencia del xilano y la pectina y progresivamente se vuelve transparente como consecuencia de la degradación de ambos polisacáridos por la acción de sus respectivas hidrolasas.

Como se contempla en la figura 4.12 (a), el microorganismo creció en el preinóculo en forma de hifas que, como consecuencia de la agitación, se agruparon formando pequeños pellets de color amarillo.



**Figura 4.12:** Pellets formados tras la agitación del preinóculo de fermentación a 200 rpm (a) e imagen al microscopio óptico (objetivo de 40 aumentos) de uno de los pellets (b).

#### 4.3.2.3. Reactor discontinuo de tanque agitado (RDTA)

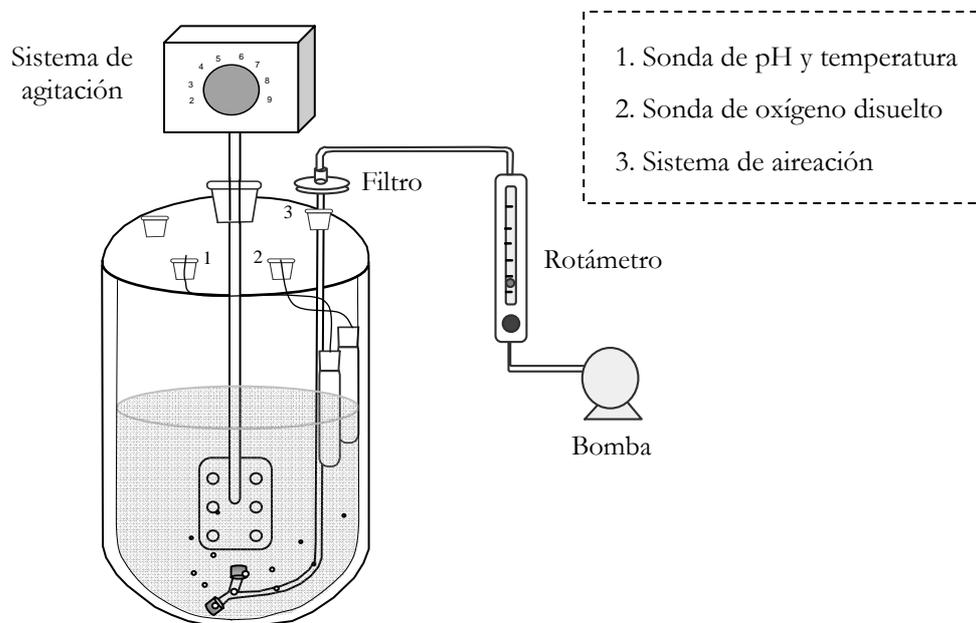
En este apartado se describirá el reactor de tanque agitado para FCS así como las etapas de carga e inoculación el reactor.

- Descripción del sistema.

El sistema utilizado está constituido por un reactor de doble camisa de 5 litros de capacidad, que posee sondas para el control del pH, la temperatura y el oxígeno

disuelto, introducidas en la solución a través de unos orificios situados en la cubierta del reactor. Una bomba suministra el aire necesario, que tras ser esterilizado al atravesar un filtro de celulosa de  $0,45\ \mu\text{m}$ , es dirigido a dos difusores de acero inoxidable situados en la parte inferior del reactor. El equipo está provisto de un sistema de agitación mecánica constituido por una pala plana de acero inoxidable de velocidad regulable. La temperatura del sistema se controla mediante el agua que circula a través de la doble camisa que rodea al reactor procedente de un baño termostático a  $30^\circ\text{C}$ .

En la figura 4.13 se muestra un esquema del reactor discontinuo de tanque agitado utilizado.



**Figura 4.13:** Esquema del reactor discontinuo de tanque agitado para FCS.

La esterilización del reactor se lleva a cabo mediante el paso de vapor de agua por todo el sistema durante 30 minutos. La solución y el sólido que constituyen el medio

de fermentación se sometieron separadamente a dos ciclos de esterilización de 20 min a 120°C en el autoclave.



**Figura 4.14:** Fotografía del reactor discontinuo de tanque agitado.

- Inoculación del reactor

Una vez obtenido el preinóculo con la metodología descrita en el apartado anterior, se separaron los pellets obtenidos mediante filtración a vacío. Este proceso se llevó a cabo en el interior de una campana de flujo laminar para evitar contaminaciones, utilizando un embudo buchner sobre el que se colocó un tejido de filtración nital de 200  $\mu\text{m}$  de poro.



(a)



(b)

**Figura 4.15:** Sistema de filtración utilizado para separar los pellets del preinóculo (a) y detalle de los pellets filtrados sobre el nital (b).

El hongo filtrado se recogió con ayuda de una espátula y se adicionó a una botella conteniendo 2,5 litros de solución nutritiva que, como se comentó en el apartado 4.3.2.1, estaba constituida por 2,4 g/L de urea, 9,8 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5,0 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,001 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0008 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,004 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,001 g/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , cuyo pH se había ajustado a 5. Como se observa, la composición de la solución nutritiva utilizada en el reactor es la misma que la del preinóculo, aunque carece de las fuentes de carbono, extracto de levadura y peptona.

Finalmente, los pellets suspendidos en la solución nutritiva se vertieron al reactor y a continuación se adicionaron los 50 gramos de sólido, cantidad necesaria para disponer de la proporción sólido-disolución optimizada en el apartado 4.3.2.1.

Una vez cargado el reactor se conectaron los sistemas de agitación, aireación y recirculación del agua a 30°C, momento a partir del cual comienza la fermentación.

- Puesta a punto del reactor discontinuo de tanque agitado

Es muy importante buscar las condiciones más apropiadas a utilizar en el reactor, ya que es necesario que durante la fermentación el medio sea homogéneo y la concentración de oxígeno disponible sea alta. Por este motivo, se realizaron unas pruebas iniciales estudiando distintas velocidades de agitación y caudales de aireación.

Como punto de partida, se utilizó un caudal de aire de 0,5 vvm y una velocidad de agitación de 93 rpm. Los valores de actividad enzimática obtenidos en este experimento inicial fueron mayores que los determinados con FES sobre orujo de uva y cáscaras de naranja en placa petri. Sin embargo, como consecuencia del crecimiento del hongo se produjo el aumento de la viscosidad del medio de

fermentación, disminuyendo su homogeneidad y la concentración de oxígeno disuelto. Así pues, se hace necesaria la introducción de mejoras con el objeto de alcanzar las condiciones óptimas.

A este efecto, se aumentó el caudal de aire a 1 vvm y la velocidad de agitación a 120 rpm. Además, para evitar la posible contaminación del medio de cultivo a los altos pH alcanzados durante la fermentación, cada 24 h se ajustó su valor a pH 3 utilizando HCl 1 M. Este pH se considera óptimo ya que no impide el crecimiento del hongo pero es lo suficientemente bajo como para evitar la aparición de posibles contaminaciones. Esta medida es comúnmente utilizada en los trabajos que se recogen en la bibliografía.<sup>299</sup>

Dado que, con el empleo de estas condiciones de operación se observa un buen desarrollo del hongo y se detecta una alta concentración de oxígeno disuelto, se establecieron como las adecuadas a emplear para el estudio de la producción de las enzimas xilanasa, exo-PG y celulasa en el reactor discontinuo de tanque agitado.

#### 4.3.2.4. Obtención y medida de las enzimas

La fermentación en el reactor de tanque agitado transcurrió durante 8 días, tomándose una muestra cada 24 horas con ayuda de una jeringa acoplada a un tubo de silicona estéril de 15 cm. La mezcla obtenida era introducida en un congelador a -20°C para su conservación. Para su análisis, se descongelaba lentamente a 4°C y se centrifugaba 10 min y 4°C a 10000 rpm. En el sobrenadante, se evaluó la concentración de azúcares reductores, el pH y la actividad de las enzimas xilanasa, exo-PG y celulasa, utilizando la metodología descrita en el apartado 3.3.6 del

---

<sup>299</sup> Nampoothiri, K.; Baiju, T.; Sandhya, C.; Sabu, A.; Szakacs, G.; Pandey, A. (2004). Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, **39**, 1583–1590.

Capítulo 3.

#### **4.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Uno de los objetivos de este capítulo es elegir la configuración de reactor más apropiada para la obtención de las máximas actividades de las enzimas a estudiar. Por este motivo, en el presente apartado se van a mostrar los resultados obtenidos con las distintas configuraciones de reactor a escala de laboratorio: bandeja, lecho fijo y tambor rotatorio (para las fermentaciones desarrolladas en estado sólido), y de tanque agitado (para las fermentaciones llevadas a cabo en cultivo sumergido). Para los reactores de FES, además, se analizará el efecto de la aireación sobre la producción enzimática. En el reactor de tambor rotatorio se estudiará también el efecto de la agitación.

Para cada configuración de reactor y cada conjunto de condiciones de operación a probar se midió la concentración de azúcares reductores, el pH y la actividad de las enzimas xilanasas, exo-PG y celulasa determinados en los extractos obtenidos.

Tras los resultados analizados en las FES usando la mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja en placa petri, se pudo relacionar de manera predictiva que una concentración de azúcares reductores baja (inferior a 0,061 mmol/gss) y un pH medio entre 4,11 - 6,31 son indicativos, de manera general, de una alta actividad enzimática en el extracto obtenido. Así mismo, la medida de pH a lo largo de las fermentaciones sirvió como parámetro de control de posibles contaminaciones.

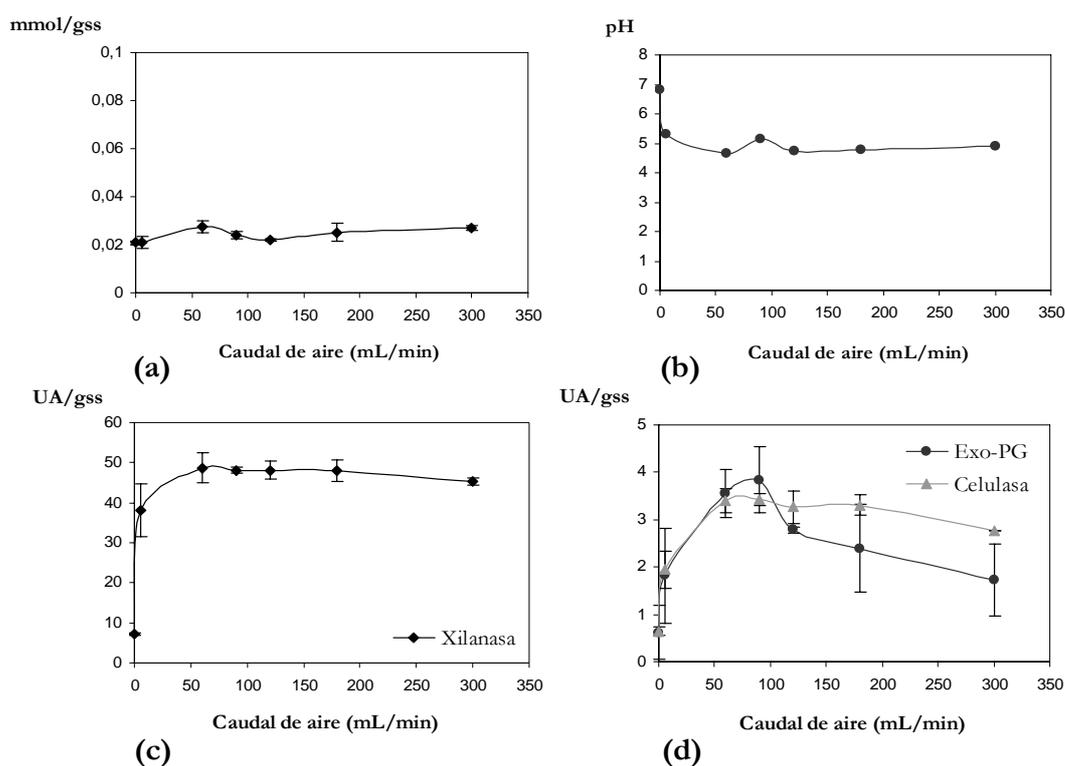
Finalmente, se describirán las ventajas e inconvenientes encontrados en el diseño de los distintos equipos utilizados.

#### **4.4.1. FES en reactor de lecho fijo**

Como se comentó en la introducción, los reactores de lecho fijo son los biorreactores sin agitación más utilizados, ya que permiten controlar de manera más sencilla las condiciones ambientales del lecho mediante la modificación de la temperatura y el caudal del aire de entrada. En este sentido, se estudió el efecto que la aireación suministrada tiene en la producción enzimática.

##### *4.4.1.1. Efecto de la aireación*

En este reactor se estudió la influencia de la aireación (aire estéril saturado en agua) sobre la producción de las enzimas xilanasa, exo-PG y celulasa, estableciendo unos caudales suministrados por la bomba soplante de 0, 6, 60, 90, 120, 180 y 300 mL/min. Los resultados obtenidos con el reactor incubado a 30°C durante cinco días se muestran en la figura 4.16.



**Figura 4.16:** Resultados obtenidos tras la FES en el reactor de lecho fijo utilizando distintos caudales de aire: concentración de azúcares reductores (a), pH (b), actividad xilanasa (c) y actividades exo-PG y celulasa (d).

Como se observa en la figura 4.16 (a), tras la aplicación de distintos caudales de aireación se obtiene una concentración de azúcares reductores muy similar, con valores comprendidos entre  $0,021 \pm 0,001$  y  $0,028 \pm 0,002$  milimoles por gramo de sólido seco (mmol/gss). Los resultados indican que el consumo de azúcares por el hongo es prácticamente el mismo, incluso cuando no se aplica caudal de aire alguno. Así pues, aún en condiciones de no administración de aireación forzada, el microorganismo dispone del oxígeno mínimo para el desarrollo de su metabolismo primario (consumo de sustrato) aunque, como se verá más adelante, esto afecte a la producción enzimática.

En relación al pH, se describe un efecto similar al de los azúcares reductores; no existe apenas dependencia del mismo frente al caudal, manteniéndose prácticamente constante entre 4,66 y 5,31. Sin embargo, en este caso sí es notable el efecto de la ausencia total de aireación sobre el pH, que se sitúa en ese caso muy por encima del resto de valores (en torno a 7).

Los valores de azúcares reductores y pH determinados en los distintos extractos, a excepción del experimento sin aireación forzada, se encuentran dentro del rango en el que cabe esperar la síntesis de las enzimas objeto de estudio.

El efecto del caudal de aire sobre la producción enzimática se representa en las figuras 4.16 (c) y 4.16 (d). En relación a la xilanasa se observa que, a medida que aumenta el caudal de aire, se incrementa la producción de la enzima, alcanzando la actividad máxima de  $48,70 \pm 3,78$  UA/gss a 60 mL/min. A partir de este caudal, la actividad de la enzima se mantiene prácticamente constante o ligeramente decreciente. Estos resultados manifiestan que la aireación presenta un efecto positivo sobre la producción de xilanasa hasta este caudal óptimo, presentando un incremento de actividad del 85,3% sobre el valor determinado sin aireación forzada.

Esta tendencia es análoga a la encontrada al analizar las otras dos enzimas objeto de estudio. Así, al aumentar el caudal de aire de 0 a 90 mL/min, las actividades de la exo-PG y la celulasa incrementan un 83,83% y un 81,23%, respectivamente. Por el contrario, al utilizar caudales superiores a 90 mL/min, las actividades máximas de dichas enzimas ( $3,84 \pm 0,69$  y  $3,42 \pm 0,12$  UA/gss) se reducen hasta  $1,72 \pm 0,76$  y  $2,77 \pm 0,00$  UA/gss con 300 mL/min.

Ambas tendencias que muestran el efecto beneficioso de la aireación sobre la producción de las enzimas podrían explicarse en base a la disminución de la

temperatura del lecho que se produce al aumentar el caudal o, lo que es lo mismo, la disipación del calor generado durante la fermentación; esto tendría como consecuencia directa una mejora de la actividad enzimática por disminución de la tasa de desnaturalización térmica.<sup>300,301,302</sup> Así, Linde y col. ya describieron el efecto positivo de la aireación sobre la actividad poligalacturonasa utilizando un reactor de lecho fijo a escala de laboratorio, muy similar al descrito en este capítulo.<sup>300</sup> Tras 60 h de incubación, la actividad de la enzima aumentó en 153,5 UA/g al incrementar el caudal de 40 a 60 mL/h·g. Sin embargo, este efecto positivo tiene un límite, porque a altos caudales disminuye el porcentaje de humedad del sólido, parámetro que también influye en la producción de las enzimas en estudio.<sup>277</sup> Así, por ejemplo, Botella y col. estudiaron el efecto de la humedad sobre la producción de las enzimas xilanasa y exo-PG sobre orujo de uva utilizando el hongo *Aspergillus awamori* y determinaron que las actividades enzimáticas comenzaban a disminuir cuando la humedad se encontraba por debajo del 65%, posiblemente por la disminución de la difusión de los nutrientes en el interior del lecho.<sup>303</sup> Milagres y col. registraron un efecto similar debido a la pérdida progresiva de humedad.<sup>277</sup> Estos autores evaluaron la influencia del caudal de aire sobre la producción de xilanasa, concluyendo que valores de caudales intermedios conducían a extractos de mayor actividad enzimática (hasta 22 veces superior a las actividades obtenidas en ausencia de aireación).

A modo de conclusión, aunque el crecimiento del hongo se apreció en todos los experimentos, se observó un desarrollo de las hifas ligeramente menor a los caudales

---

<sup>300</sup> Linde, G.; Magagnin, G.; Vieira, J.; Bertolin, T.; Barros, N. (2007). Column bioreactor use for optimization of pectinase production in solid substrate cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*, **38**, 557-562.

<sup>301</sup> Mitchell, D; Meien, O.; Krieger, N. (2003). Recent developments in modeling of solid-state fermentation heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 137-147.

<sup>302</sup> Santos, M.; Rosa, A.; Dal'Boit, S.; Mitchell, D.; Krieger, N. (2004). Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes?. *Bioresource Technology*, **94**, 261-268.

<sup>303</sup> Botella, C.; Diaz, A.; de Ory, I.; Webb, C.; Blandino, A. (2007). Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **42**, 1, 98-101.

de aire más bajos. Así, se detecta prácticamente el mismo consumo de azúcares reductores y un pH muy similar de manera independiente del caudal de aire utilizado, a excepción del experimento a caudal cero, en el que el pH del medio se encuentra próximo a 7, analizándose una actividad enzimática mucho menor. El comportamiento de la producción de enzimas con un caudal de aire mínimo puede explicarse entendiéndose que, aunque el hongo dispone del oxígeno necesario para el desarrollo de su metabolismo, tanto la eliminación del calor generado como la eliminación del dióxido de carbono son menores, afectando a la actividad enzimática.

#### **4.4.2. FES en reactor de bandejas**

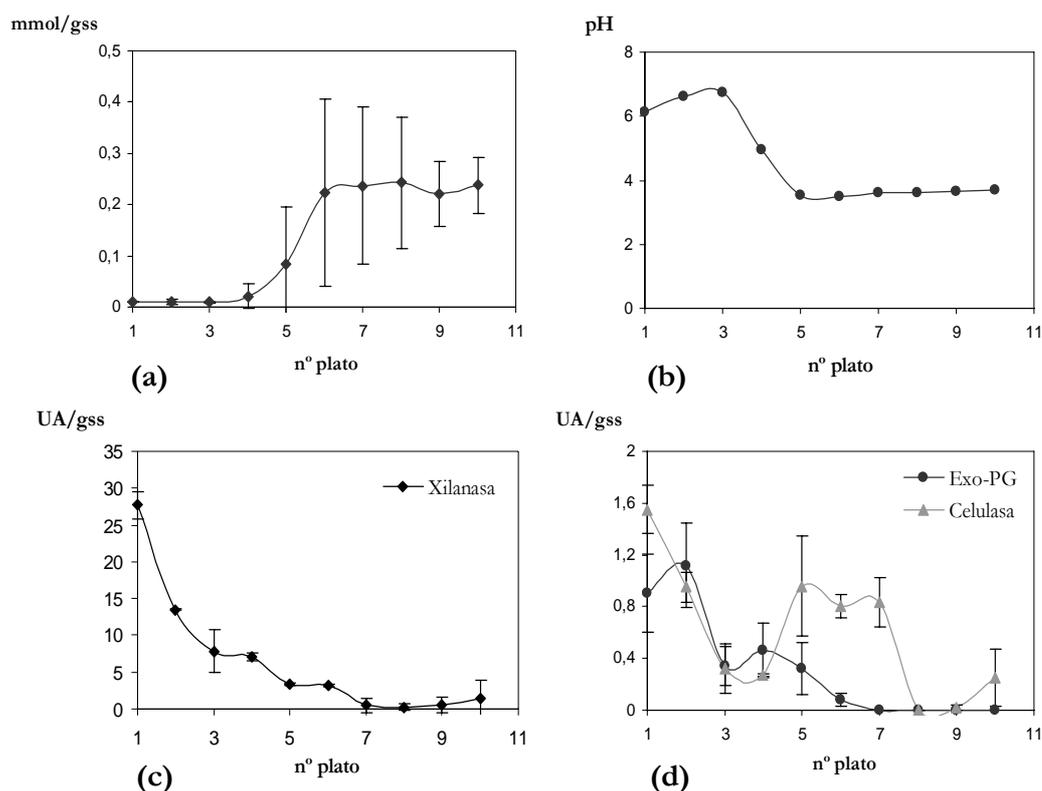
Los reactores de FES de bandejas representan la tecnología más sencilla para el desarrollo de fermentaciones en estado sólido.<sup>268</sup> El utilizado en este trabajo consiste, como ya se comentó ampliamente en Material y métodos, en 10 platos que contienen 10 gramos de sólido inoculado, apilados e interconectados para la aireación saturada en humedad.

##### *4.4.2.1. Efecto de la aireación*

En el reactor de bandejas descrito en este capítulo se evaluó la influencia de la aireación sobre la producción de las enzimas en estudio, estableciéndose los caudales de 9, 120, 200 y 300 mL/min. Teniendo en cuenta el elevado número de platos evaluado en cada experimento y con el objeto de destacar las diferencias observadas entre ellos, se describirán independientemente los resultados obtenidos para cada caudal, comparándolos posteriormente.

- Caudal de 9 mL/min.

Los resultados obtenidos para la aireación de 9 mL/min en relación a la concentración de azúcares reductores, el pH y la actividad enzimática registrados tras 5 días de incubación a 30°C, se representan en la figura 4.17.



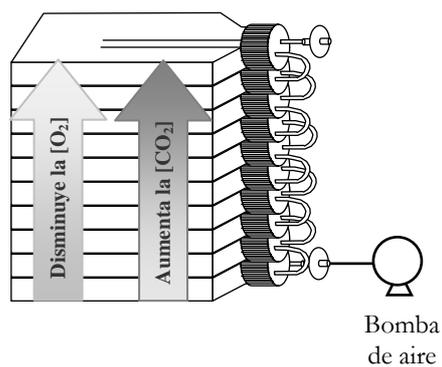
**Figura 4.17:** Resultados obtenidos tras la FES en el reactor de bandejas utilizando un caudal de aireación de 9 mL/min: concentración de azúcares reductores (a), pH (b), actividad xilanasa (c) y actividades exo-PG y celulasa (d).

Como se observa en la gráfica 4.17 (a), la concentración de azúcares reductores es muy baja en los cuatro primeros platos, manteniéndose en valores comprendidos entre  $0,010 \pm 0,004$  y  $0,021 \pm 0,024$  mmol/gss. Sin embargo, a partir del quinto se detecta un aumento de su concentración, alcanzando un valor máximo de  $0,238 \pm 0,055$  mmol/gss en el último plato. Este aumento de los azúcares debe entenderse

como una disminución de la actividad metabólica del hongo a lo largo de la columna debida a que, con el caudal de 9 mL/min, no se consigue una aireación adecuada de la misma. De esta forma, únicamente hasta el cuarto plato el hongo dispone del oxígeno necesario para realizar su metabolismo mediante la degradación de los azúcares reductores del medio.

La evolución del pH se expone en la gráfica 4.17 (b), determinándose un valor comprendido entre 5,58 y 6,8 en los cuatro primeros platos. A partir del quinto, los extractos muestran un pH bastante bajo, manteniéndose prácticamente constante en torno a 3,5, valor que presenta un substrato de orujo de uva y cáscaras de naranja sin actividad fermentativa. Estos datos, junto con los obtenidos para los azúcares reductores, ponen de manifiesto que a partir del quinto plato no se produce un buen desarrollo del hongo.

En la gráfica 4.17 (c) se representa la actividad de la enzima xilanasa analizada en los distintos platos. Se observa como, a medida que aumenta el número del plato, disminuye la actividad de la enzima, partiendo de un valor de  $27,67 \pm 1,90$  UA/gss y haciéndose prácticamente cero a partir del séptimo plato. Este mismo efecto se observa para las enzimas exo-PG y celulasa en 4.17 (d), aunque partiendo de actividades mucho menores. La explicación a esta tendencia es análoga a la que se dio para los azúcares reductores; el caudal de aireación es insuficiente, de forma que no dispone del oxígeno necesario para llevar a cabo su metabolismo en todos los platos, produciéndose la caída de su actividad enzimática. Así, y como se ha representado en la figura 4.18, al ascender en la columna el aire se enriquece en dióxido de carbono y se empobrece en oxígeno, hecho que provoca un menor desarrollo del hongo en los platos superiores.

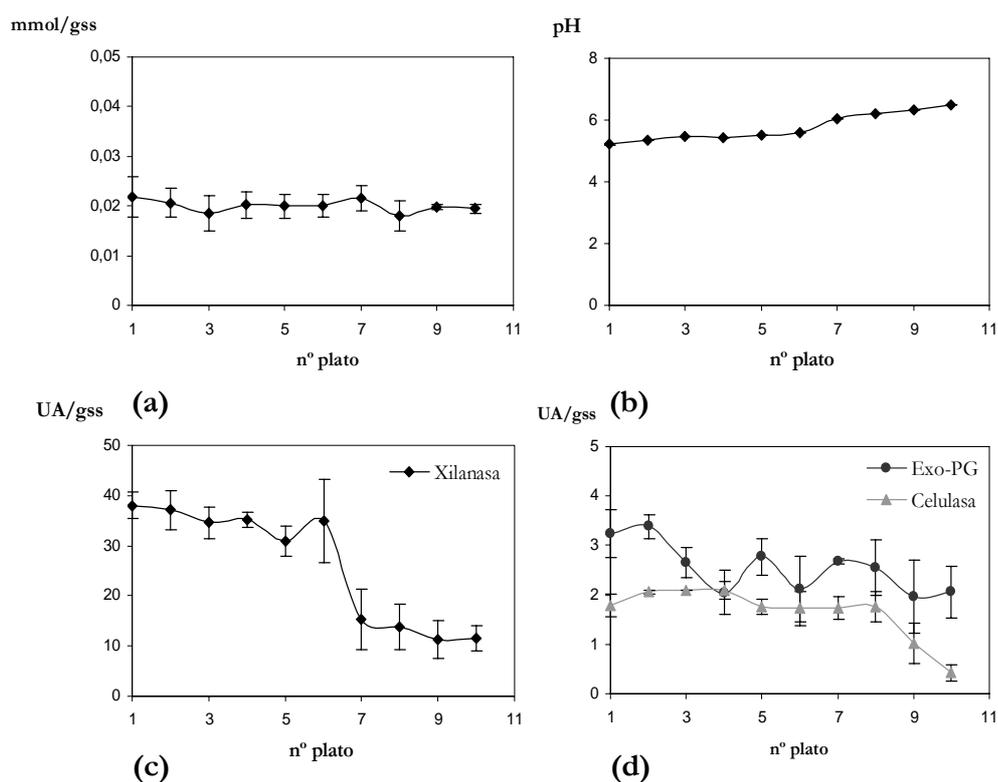


**Figura 4.18: Esquema que representa la evolución del aire al ascender en la columna de platos.**

- Caudal de 120 mL/min

En la figura 4.19 se exponen los resultados obtenidos con un caudal de aire de 120 mL/min (5 días, 30°C).

La evolución de la concentración de los azúcares reductores a lo largo de la columna de platos se representa en la gráfica 4.19 (a), observándose como se mantiene prácticamente constante en un valor de aproximadamente 0,020 mmol/gss.



**Figura 4.19:** Resultados obtenidos tras la FES en el reactor de bandejas utilizando un caudal de aireación de 120 mL/min: concentración de azúcares reductores (a), pH (b), actividad xilanasica (c) y actividades exo-PG y celulasa (d).

La tendencia del pH, en la gráfica 4.19 (b), refleja como a medida que aumenta la altura del plato se produce un ligero aumento del mismo. De esta manera, partiendo de 5,21 en el primer plato, alcanza un valor máximo de 6,49 en el décimo y último. Estos datos indicarían una mejora de la actividad metabólica del hongo con respecto al experimento a menor caudal, aunque el ligero aumento del pH supondría una leve pérdida de la misma conforme avanzamos en la columna, debido a la disminución progresiva de la eficacia de la aireación. Los valores de azúcares reductores y pH determinados en todos los platos se encuentran dentro del rango en el que cabe esperar obtención de actividad enzimática.

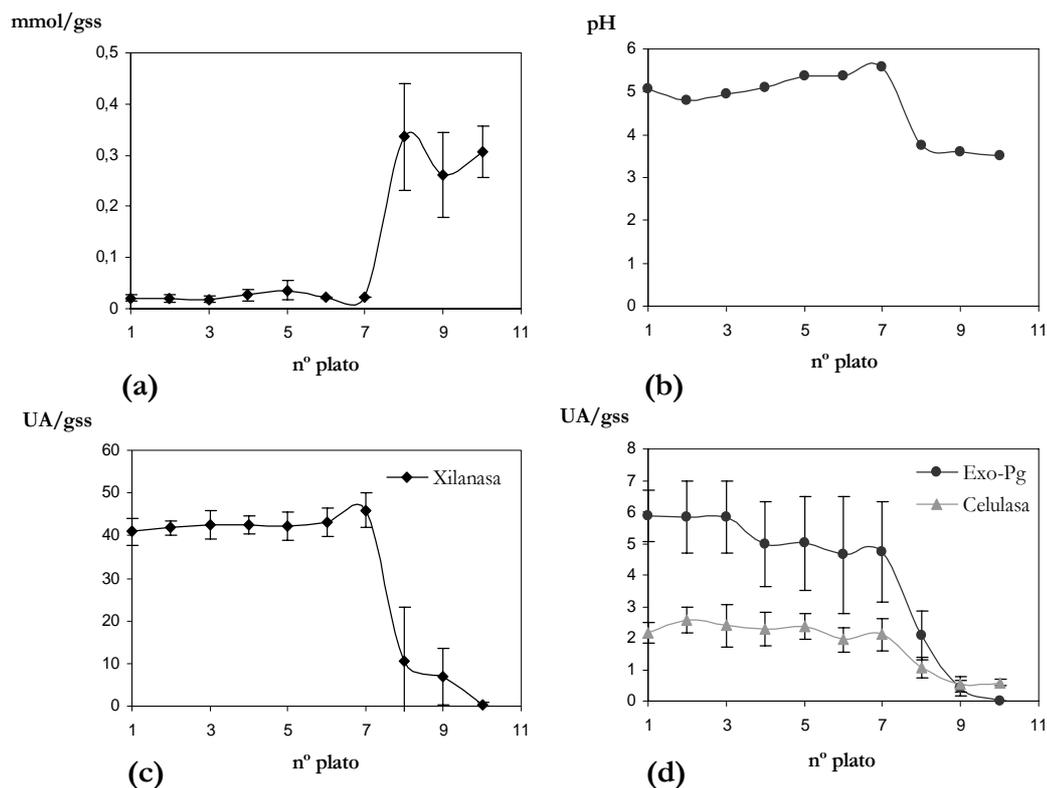
En la gráfica 4.19 (c) se muestra la evolución seguida por la actividad de la enzima xilanasasa que, al igual que se observó para la aireación de 9 mL/min, disminuye al ascender en la columna. Esta tendencia es muy suave al principio, de forma que partiendo de un valor inicial de  $38,04 \pm 2,70$  UA/gss, se reduce en tan sólo un 8,25% en el sexto plato. Sin embargo, entre el sexto y el séptimo se produce una caída brusca, alcanzándose una actividad de  $15,39 \pm 6,07$  UA/gss. Esta discontinuidad puede deberse a problemas operacionales registrados en el equipo; así, se detectó condensación de agua en el interior de la aguja que comunica ambos platos, con la consiguiente disminución de la eficacia de la aireación. A partir del séptimo plato, la disminución es suave y constante.

En cuanto a las enzimas exo-PG y celulasa, cuya evolución se representa en la figura 4.19 (d), la caída de actividad es más suave, no percibiéndose la discontinuidad observada en el caso de la xilanasasa. Así, la actividad de la exo-PG, que inicialmente es de  $3,24 \pm 0,48$  UA/gss, disminuye suavemente alcanzando un valor de  $2,06 \pm 0,52$  UA/gss en el último plato. En la celulasa, la disminución más importante de la actividad se produce en los dos últimos platos, presentando un valor prácticamente constante en el resto. La máxima actividad determinada es de  $2,09 \pm 0,18$  UA/gss, analizada en el cuarto plato del reactor. Los resultados obtenidos indican que, con el caudal de aire empleado, no se obtienen diferencias muy significativas en los distintos platos en relación a la actividad de las enzimas exo-PG y celulasa.

Por tanto, con el caudal de 120 mL/min no se consigue una aireación eficaz de todos los platos de la columna durante los 5 días de fermentación, siendo necesario utilizar uno mayor.

- Caudal de 200 mL/min

En la figura 4.20 se representan los resultados obtenidos empleando un caudal de aire de 200 mL/min (5 días, 30°C).



**Figura 4.20: Resultados obtenidos tras la FES en el reactor de bandejas utilizando un caudal de aireación de 200 mL/min: concentración de azúcares reductores (a), pH (b), actividad xilanasas (c) actividades exo-PG y celulasa (d).**

La concentración de azúcares reductores, cuya evolución se muestra en la figura 4.20 (a), se mantiene constante en un valor de aproximadamente 0,020 mmol/gss hasta el séptimo plato. A partir de esta bandeja, incrementa bruscamente hasta  $0,335 \pm 0,105$  mmol/gss, manteniendo este valor hasta el final de la columna.

Con respecto al pH, en los siete primeros platos no muestra diferencias significativas, exponiendo un valor que se encuentra en un intervalo comprendido entre 4,73 y 5,57. En cambio, a partir del octavo plato se produce un descenso importante, pasando de 5,57 a 3,77, y manteniéndose por debajo de este valor hasta el décimo plato.

La concentración de azúcares reductores y pH determinados a partir del plato 8 no se encuentran dentro del rango en el que cabe esperar la producción de las enzimas objeto de estudio sino del orden de los que presenta un extracto del sustrato sin actividad fermentativa. En efecto, se observó a simple vista que, en los últimos platos, apenas hubo crecimiento del hongo.

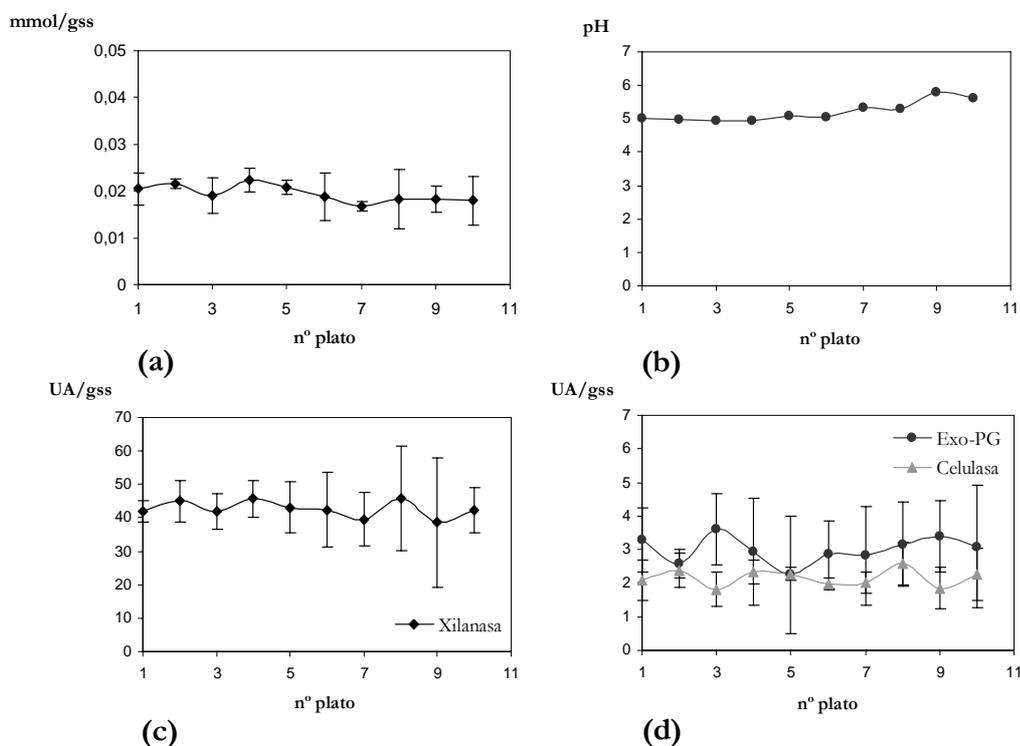
La enzima xilanasa, cuya actividad se expone en la figura 4.20 (c), sigue una evolución acorde con lo ya comentado; la actividad se mantiene en los siete primeros platos entre  $40,96 \pm 3,12$  UA/gss y  $45,89 \pm 4,04$  UA/gss. A partir del octavo plato se produce su descenso hasta hacerse prácticamente cero al final de la columna. Las actividades exo-PG y celulasa, mostradas en 4.20 (d), también exhiben la misma tendencia, con máximos situados en  $5,88 \pm 0,84$  y  $2,57 \pm 0,41$  UA/gss, respectivamente y con caídas a partir de séptimo plato.

El hecho de que los últimos tres platos presenten un menor crecimiento del hongo, una alta concentración de azúcares reductores, un bajo pH y una baja actividad de las enzimas en estudio permite afirmar que el hongo no dispuso en los últimos platos del oxígeno necesario para su desarrollo. Atendiendo a la evolución mostrada con el aumento progresivo de los caudales, esto sólo podría deberse a un problema de atasco entre los platos 7 y 8. A diferencia de lo ocurrido con el caudal de 120 mL/min, la oclusión se produjo al comienzo del experimento, ya que no se detectó el

crecimiento del hongo en los últimos platos. Este problema operativo puede solventarse aumentando aún más el caudal de entrada de la aireación.

- Caudal de 300 mL/min

Con idea de evitar la acumulación de una gran cantidad de agua en las tuberías del sistema se empleó un caudal de aire de 300 mL/min (5 días, 30°C), mostrando los resultados obtenidos en la figura 4.21.



**Figura 4.21: Resultados obtenidos tras la FES en el reactor de bandejas utilizando un caudal de aireación de 300 mL/min: concentración de azúcares reductores (a), pH (b), actividad xilanasa (c) y actividades exo-PG y celulasa (d).**

En la gráfica 4.21 (a) se representa la evolución seguida por la concentración de azúcares reductores a lo largo de los platos del reactor, determinándose valores muy

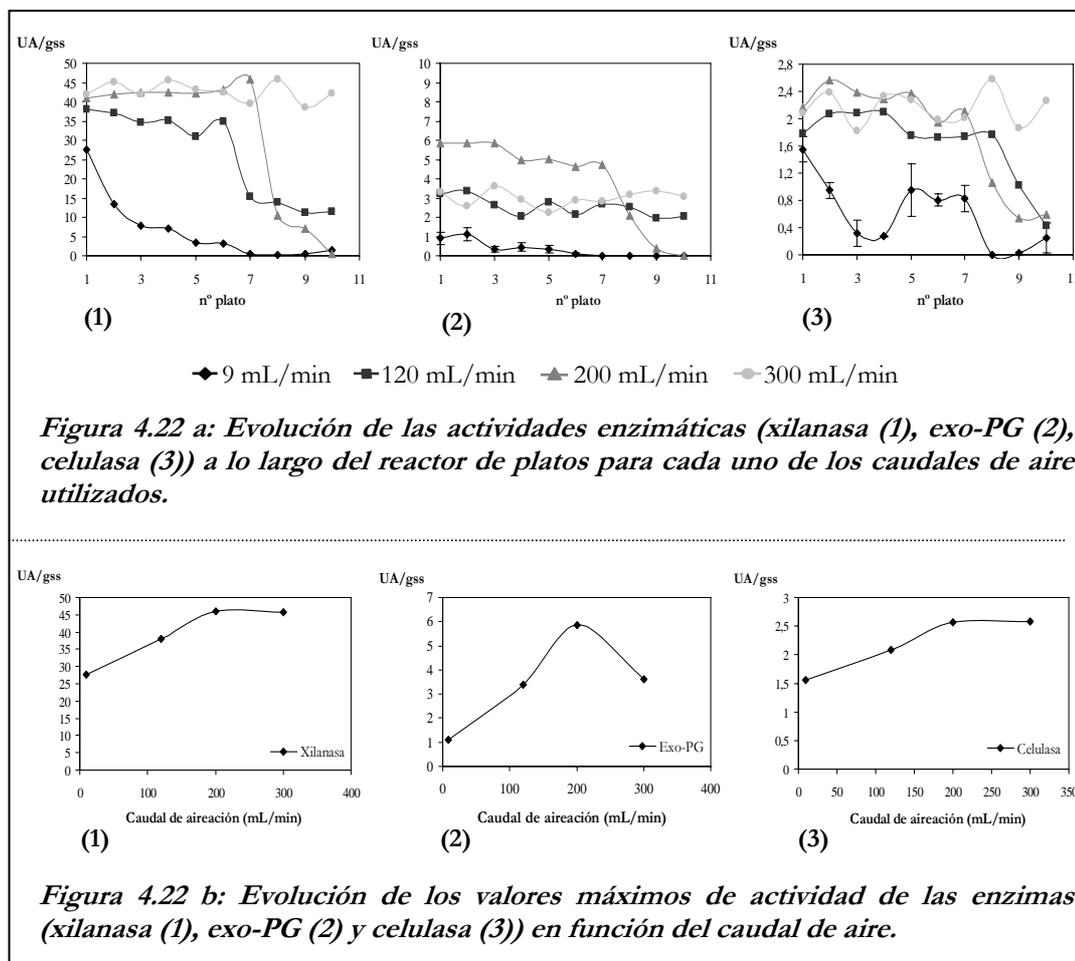
bajos a lo largo de todo el fermentador (entre  $0,017 \pm 0,001$  y  $0,022 \pm 0,003$  mmol/gss).

En relación al pH, 4.21 (b), no se obtienen diferencias significativas en los valores analizados en cada plato, detectándose un incremento suave de 5,03 a 5,62 al ascender de la primera a la última bandeja.

Con los valores de azúcares reductores y pH obtenidos cabe esperar una actividad enzimática completa en todos los platos. En efecto, en las gráficas 4.21 (c) y 4.21 (d) se representan las actividades enzimáticas analizadas en los distintos platos. A grandes rasgos, se observa como sus actividades se mantienen prácticamente constantes a lo largo de todo el reactor. Así, la enzima xilanasasa, cuya actividad en el primer plato es de  $41,98 \pm 3,30$  UA/gss, en el décimo presenta un valor de  $42,31 \pm 6,78$  UA/gss. En el caso de la enzima exo-PG, su actividad oscila entre  $2,25 \pm 1,75$  UA/gss y  $3,62 \pm 1,06$  UA/gss y finalmente en la celulasa, al ascender del primer al último plato, la actividad pasa de  $2,08 \pm 0,60$  a  $2,26 \pm 0,77$  UA/gss.

El hecho de conseguir en todos los platos una baja concentración de azúcares reductores, un pH comprendido entre 4,11 y 6,82 y determinarse actividad de las enzimas en estudio, indica que en estas condiciones se consigue airear de forma eficaz toda la columna durante los 5 días de fermentación. Por tanto, el caudal de 300 mL/min es suficiente para proporcionar al hongo inoculado en todos los platos, el oxígeno necesario para su desarrollo y, en consecuencia, para la producción de enzimas y evita además la obstrucción de las tuberías del sistema de aireación, arrastrando las gotas de agua que podrían acumularse durante el transcurso de la fermentación.

Para el estudio comparativo de la influencia de la aireación sobre la producción de las enzimas xilanasa, exo-PG y celulasa se representa, en primer lugar, la evolución conjunta de la actividad enzimática a lo largo del reactor para todos los caudales de aire utilizados (figura 4.22 (a)) y, a continuación, la tendencia que siguen los valores máximos de actividad determinados con cada uno de ellos (figura 4.22 (b)).



En la gráfica 1 de la figura 4.22 (a) se representa la influencia del caudal de aire sobre la producción de la enzima xilanasa. A rasgos generales se observa como, a medida que aumenta el valor de dicha variable, la producción de la enzima es mayor. A pesar de ello, los máximos de actividad alcanzados para los caudales de 200 y 300 mL/min

prácticamente tienen el mismo valor (gráfica 1 de la figura 4.22 (b)). Este hecho indica que el caudal de 200 mL/min es suficiente para obtener la máxima actividad de la enzima en alguno de los platos. Sin embargo, como ya se comentó anteriormente, con este caudal no se consigue airear adecuadamente toda la columna, y por tanto, no se detecta la misma actividad en todos los platos.

A la vista de los resultados obtenidos en el reactor de bandejas se concluye que el caudal de aire tiene una gran influencia sobre la producción de la enzima xilanasa. De esta forma, al emplear 300 mL/min se consigue aumentar 1,7 veces el máximo de actividad obtenido con 9 mL/min, además de garantizar actividades altas en todos los platos del reactor, con lo que mejora la productividad general del proceso.

Los valores obtenidos para el estudio de la actividad de la enzima *exo*-PG a distintos caudales se representan en la gráfica 2 de las figura 4.22 (a) y 4.22 (b). Se observa que los máximos valores de actividad se consiguen en este caso con una aireación de 200 mL/min; sin embargo, y como ya se comentó anteriormente, en estas condiciones no se logra la aireación completa de toda la columna, de forma que no se determina actividad en los últimos platos. Se contempla también que no se obtienen diferencias muy significativas de actividad al emplear las aireaciones de 120 y 300 mL/min, alcanzándose valores del mismo orden en todos los platos. Estos resultados indican que, si bien el caudal de 120 mL/min no conduce a los máximos valores de actividad *exo*-PG, sería el más adecuado para alcanzar un valor suficientemente alto de la misma, con lo que se mejoraría la productividad. En este caso, se consigue una actividad enzimática 3 veces mayor a la analizada con el caudal de 9 mL/min. Si lo que se pretende es conseguir la máxima actividad *exo*-PG en alguno de los platos, es necesario emplear un caudal de aireación de 200 mL/min. Se conseguiría así mejorar el valor máximo obtenido 5 veces respecto del determinado con 9 mL/min.

Finalmente, la influencia del caudal de aire sobre la máxima actividad celulasa se representa en la gráfica 3 de la figura 4.22 (b). En ella, se observa como a medida que aumenta el caudal aumenta el valor máximo de actividad, efecto que se mantiene hasta 200 mL/min, por encima del cual ya no se obtienen diferencias significativas. Sin embargo, como se observa en la gráfica 3 de la figura 4.22 (a), para determinar valores de actividad de dicha enzima en todos los platos por igual es necesario emplear un caudal de 300 mL/min. Para esta enzima, al aumentar la aireación de 9 a 300 mL/min la actividad máxima aumenta 1,7 veces.

Rosales y col. compararon distintas configuraciones de reactor para la producción de la enzima lacasa mediante FES, y llegaron a la conclusión de que el reactor de bandejas era la configuración que producía actividades más altas, debido a que el hongo no está sometido a estrés mecánico y a que, al utilizar una capa fina de sustrato, no se produce la aglomeración del sólido, facilitando el paso del aire a través del espacio interpartícula.<sup>304</sup>

La bibliografía recoge también trabajos relacionados con el escalado del reactor de bandejas, como es el caso del llevado a cabo por Sindhu y col., que consistió en comparar actividades enzimáticas de xilanasas obtenidas en erlenmeyers y en reactores de bandejas de mayor tamaño.<sup>305</sup> Estos reactores estaban constituidos por platos metálicos de 35x25x5 y de 40x30x5 cm<sup>3</sup>, a los que añadieron 250 y 500 g respectivamente de sustrato a fermentar. En este trabajo se describió una reducción de la actividad xilanasas en el escalado del proceso del orden del 12%. Por el

---

<sup>304</sup> Rosales, E.; Rodríguez, S.; Sanroman, M. (2007). Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1286–1290.

<sup>305</sup> Sindhu, I.; Chhibber, S.; Capalash, N.; Sharma, P. (2006). Production of Cellulase-Free Xylanase from *Bacillus megaterium* by Solid State Fermentation for Biobleaching of Pulp. *Current Microbiology*, **53**, 167-172.

contrario, en un estudio similar llevado a cabo por Archana y col., se analizaron actividades enzimáticas similares en erlenmeyers y en bandejas.<sup>306</sup>

#### 4.4.3. FES en reactor de tambor rotatorio

Hasta el momento se han mostrado los resultados obtenidos de reactores que operan en condiciones estáticas; sin embargo, para evaluar la influencia que la agitación tiene sobre el incremento de la actividad celular y su consiguiente aumento de actividad enzimática, se utilizó un reactor cuyo diseño permite la mezcla del medio de fermentación. Este diseño se describió ampliamente en 4.3.1.4.

##### 4.4.3.1. Efecto de la aireación y la agitación

En el presente apartado se van a mostrar los resultados de concentración de azúcares reductores, pH y actividad de las enzimas en estudio utilizando los caudales de aire (estéril y saturado en agua) de 0, 9, 120 y 200 mL/min sin agitación, y con distintos tipos de agitación: continua e intermitente (1 agitación de 1 min al día y 2 agitaciones de 10 min al día).

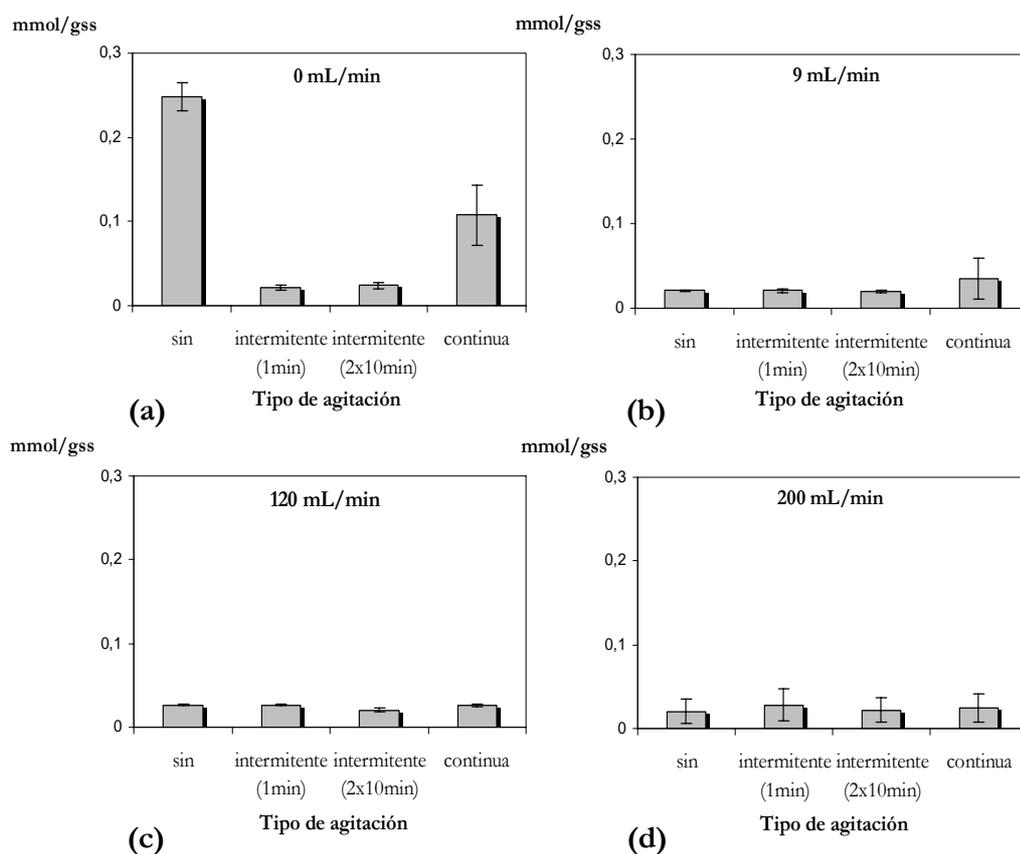
Para la organización y presentación de los resultados se van a agrupar, para cada concentración o actividad analizada, las gráficas correspondientes a cada uno de los caudales probados y, dentro de ellas, los distintos tipos de agitación aplicados.

---

<sup>306</sup> Archana, A.; Satyanarayana, T. (1997). Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **21**, 12–17.

- Concentración de azúcares reductores

En la figura 4.23 se muestra la concentración de azúcares reductores presente en los extractos obtenidos utilizando diferentes caudales de aireación, para las distintas condiciones de agitación establecidas.



**Figura 4.23:** Concentración de azúcares reductores en los extractos para cada caudal de aireación empleado: 0 mL/min (a), 9 mL/min (b), 120 mL/min (c) y 200 mL/min (d), en función del tipo de agitación aplicada.

Se observa como prácticamente en todos los casos la concentración de azúcares reductores es muy baja, aproximadamente de 0,020 mmol/gss, a excepción de dos de los experimentos llevados a cabo sin aireación forzada. A este respecto, cabría

recordar que una concentración baja de azúcares reductores en los extractos indica un elevado metabolismo microbiano y, por tanto, es de esperar una adecuada producción enzimática. Cuando no se suministra aireación (0 mL/min) y se impone al reactor una agitación continua, la concentración de azúcares reductores es 4,5 veces más elevada que la analizada con agitación intermitente. En estas condiciones, se comprueba experimentalmente que se produce la cohesión de las partículas sólidas en forma de aglomerados quedando el hongo retenido en el interior (ver figura 4.24). En esta situación, el hongo no dispone de oxígeno suficiente para llevar a cabo correctamente su metabolismo a partir de la degradación de los azúcares reductores del medio. Además, en el interior de estos agregados la transferencia de oxígeno y nutrientes es baja o nula.



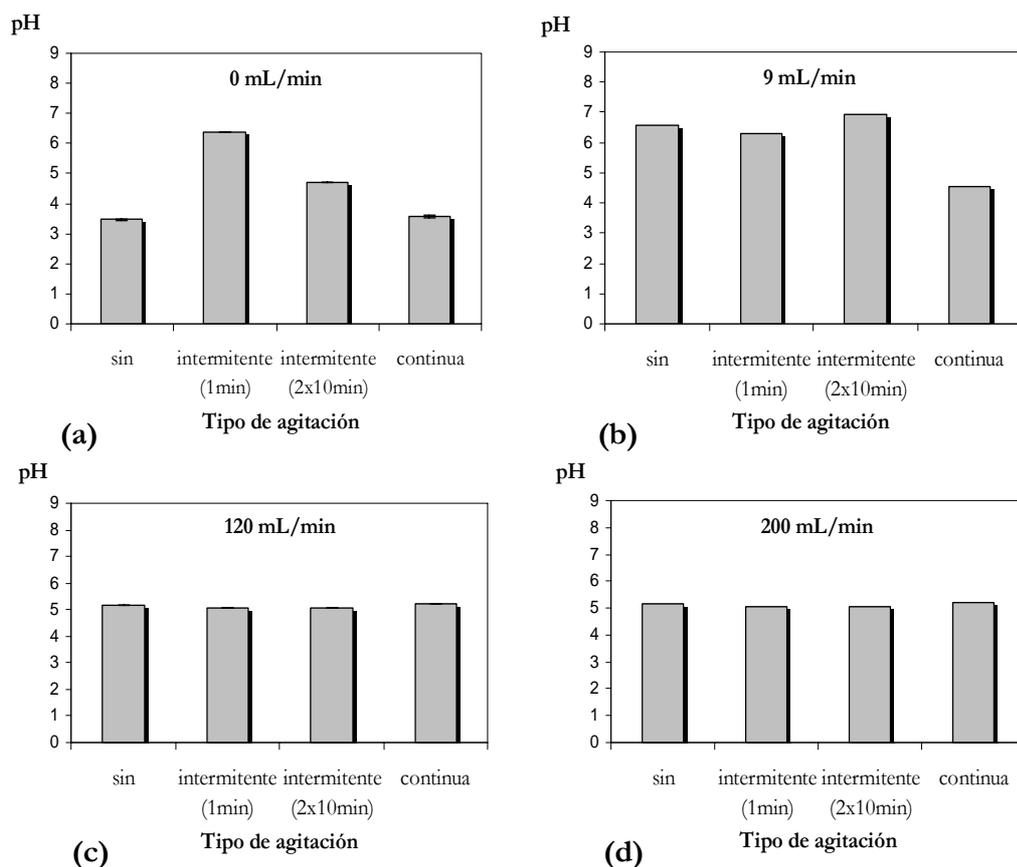
**Figura 4.24:** Aspecto que presentaba el medio de fermentación tras varios días en agitación continua sin aireación forzada.

Del mismo modo, cuando no se suministra aireación (0 mL/min) y se imponen condiciones estáticas se determina la concentración de azúcares reductores más elevada de la serie ( $0,248 \pm 0,017$  mmol/gss). Aquí, la falta de agitación contribuye aún más a la anaerobiosis del hongo, imposibilitando su desarrollo.

Con el resto de caudales de aire empleados y las distintas condiciones de agitación, se determina una concentración de azúcares reductores comprendida entre  $0,020 \pm 0,001$  y  $0,035 \pm 0,024$  mmol/gss, que es lo suficientemente baja como para esperar la detección de actividad enzimática.

- pH

En la figura 4.25 se representan los pH analizados en los extractos utilizando diferentes caudales de aireación, para las distintas condiciones de agitación establecidas.



**Figura 4.25:** pH en los extractos para cada caudal de aireación empleado: 0 mL/min (a), 9 mL/min (b), 120 mL/min (c) y 200 mL/min (d), en función del tipo de agitación aplicada.

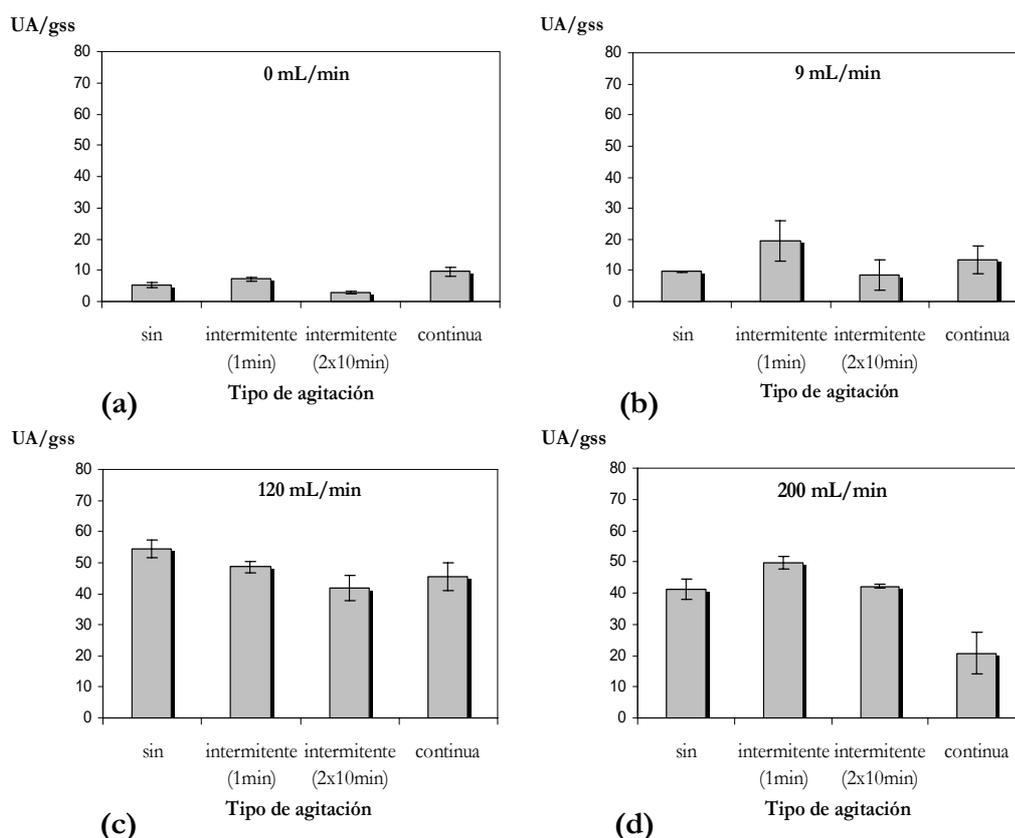
En la figura 4.25 se observa que prácticamente todos los pH analizados se encuentran en el intervalo comprendido entre 4,11 y 6,82 que, como se comentó anteriormente, es el esperado para extractos que presentan actividad de las enzimas

en estudio. Como excepciones cabe señalar dos de los experimentos llevados a cabo sin aireación forzada; el que transcurrió sin agitación y el que lo hizo con agitación continua, cuyos pH son de 3,46 y 3,58, respectivamente. Estos valores de pH corresponden al substrato de orujo de uva y cáscaras de naranja sin actividad fermentativa. Además, en estos dos casos se detectó una elevada concentración de azúcares reductores, por lo que cabría esperar que en ellos se determinase una baja o nula actividad de las enzimas en estudio.

- Xilanasa

En la figura 4.26 se exponen los valores de actividad xilanasa determinados en los extractos utilizando diferentes caudales de aireación, para las distintas condiciones de agitación establecidas.

La primera consideración que debe hacerse es la influencia positiva que presenta el caudal de aire sobre la producción de la enzima xilanasa. Así, a grandes rasgos, las mayores actividades se determinan en los dos caudales de aireación más altos ensayados (120 y 200 mL/min). Lógicamente, este efecto está en consonancia con el carácter aerobio del metabolismo del hongo y es coherente con los resultados de azúcares reductores y pH obtenidos para el caso de ausencia de aireación.



**Figura 4.26:** Actividad xilanasa en los extractos para cada caudal de aireación empleado: 0 mL/min (a), 9 mL/min (b), 120 mL/min (c) y 200 mL/min (d), en función del tipo de agitación aplicada.

En relación a la agitación, su efecto sobre la producción de la enzima es más variable. Así, cuando no se emplea aireación forzada (4.26 (a)), no se obtienen diferencias significativas en rangos de actividad para cada una de las condiciones de agitación utilizadas, con un valor máximo de  $9,57 \pm 1,40$  UA/gss cuando se agita el sistema de forma continua, probablemente porque, en ausencia de aireación, la agitación continua proporciona en los primeros días de fermentación la aireación necesaria para el desarrollo del hongo y, en consecuencia, para la producción de xilanasa,

aunque posteriormente sólido y hongo formen aglomerados, lo que dificulta su desarrollo por falta de oxígeno. Esta situación explicaría la alta concentración de azúcares reductores y bajo pH encontrados también para este caso.

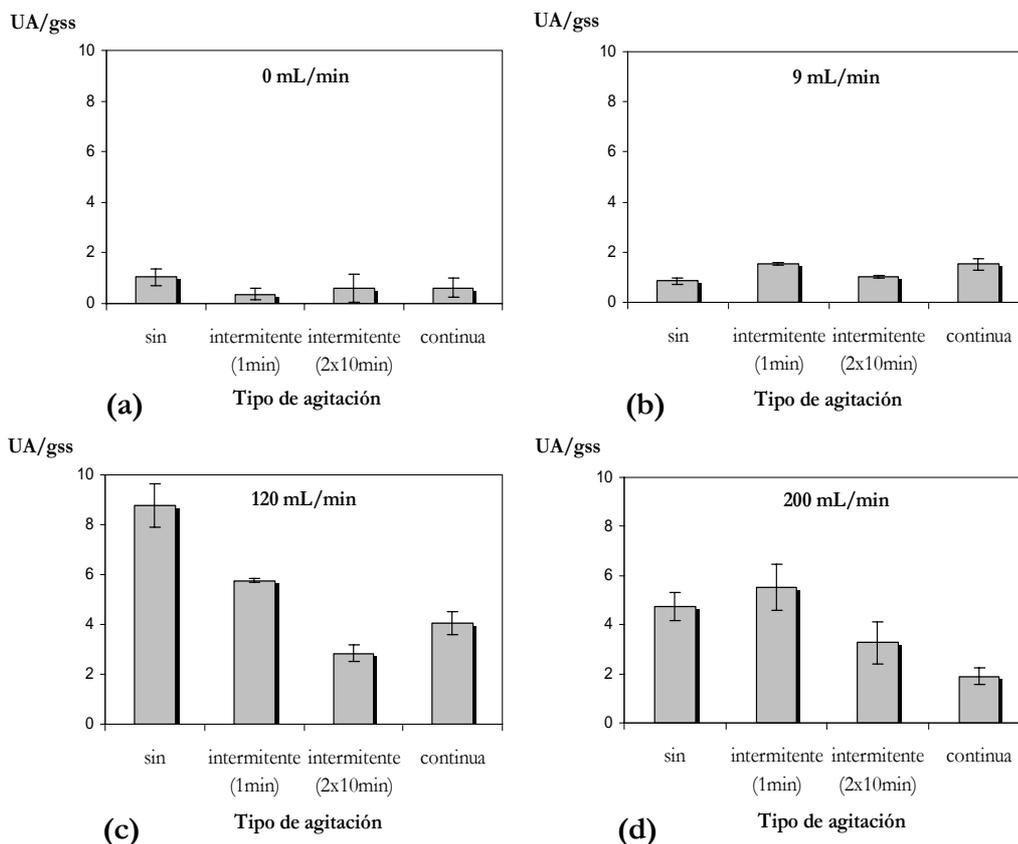
En el caudal de 9 mL/min, se alcanza la máxima actividad ( $19,52 \pm 6,39$  UA/gss) al utilizar una agitación intermitente de 1 min/día. Podría ocurrir que, a bajos caudales de aireación como este, sea necesario someter el sistema a una suave agitación para mejorar la transferencia de  $O_2$  y  $CO_2$  y que, sin embargo, al aplicar una agitación más frecuente disminuya la actividad de la enzima, posiblemente por ocasionarse daños en el micelio del hongo, afectando a la producción de la xilanasas.

Un efecto similar se detecta para el caudal de 120 mL/min, alcanzando las actividades más bajas cuando el sistema se agita dos veces al día y cuando se hace de forma continua. Sin embargo, ahora el caso sin agitación también presenta elevados valores de xilanasas ( $54,42 \pm 2,88$  UA/gss), lo que indicaría que, a este caudal, el oxígeno suministrado es suficiente para el metabolismo del hongo, sin necesidad de aplicar agitación. Este valor es 10 veces superior al determinado en las mismas condiciones pero sin utilizar aireación forzada.

En relación al caudal de 200 mL/min, se determina la actividad xilanasas más baja cuando el medio de fermentación se agita de forma continua. En cambio cuando el sistema es sometido a agitación intermitente, se obtienen resultados del mismo orden de magnitud a los determinados con 120 mL/min. Este hecho indica que es suficiente airear con este último caudal para conseguir la máxima actividad xilanasas.

- Exo-PG

En la figura 4.27 se exponen los resultados de actividad exo-PG obtenidos para los distintos caudales de aireación y condiciones de agitación empleados.



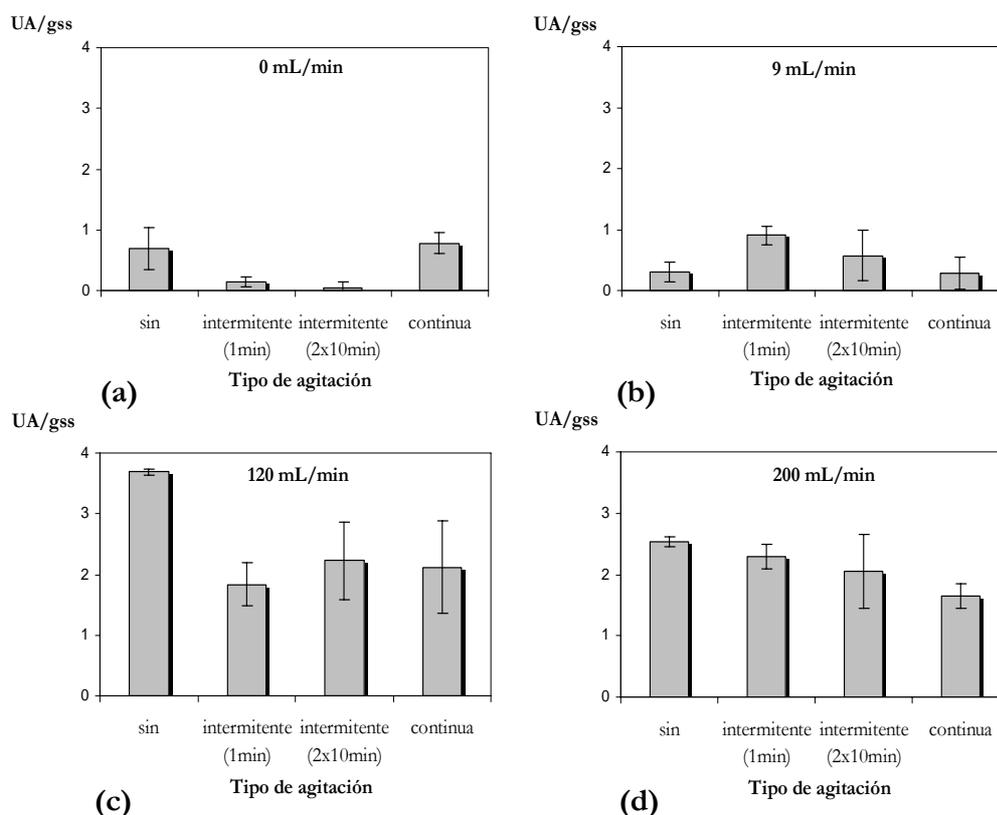
**Figura 4.27:** Actividad exo-PG en los extractos para cada caudal de aireación empleado: 0 mL/min (a), 9 mL/min (b), 120 mL/min (c) y 200 mL/min (d), en función del tipo de agitación aplicada.

De igual forma que se manifestó para la xilanasas, la aireación muestra una influencia positiva sobre la producción de la enzima exo-PG, determinándose los valores más elevados de actividad con los caudales de aire más altos.

Para los caudales más bajos ensayados (0 y 9 mL/min) las producciones son bajas (máximos de 0,63 UA/gss y 1,52 UA/gss respectivamente) y no se observa una influencia significativa del tipo de agitación sobre la producción de la exo-PG. Tras la aplicación del caudal de 120 mL/min, la producción aumenta considerablemente y el valor más alto de actividad exo-PG ( $8,77 \pm 0,88$  UA/gss) se alcanza en condiciones estáticas, análogamente a lo que ocurriría para la xilanasa. Este hecho podría indicar que, a este caudal, el hongo dispone del oxígeno necesario para un buen desarrollo y la aplicación de una agitación más frecuente presentaría efectos negativos sobre la producción de la exo-PG. Para el caudal de aire de 200 mL/min, la actividad más baja se alcanza agitando de forma continua, mientras que las mayores se obtienen en condiciones estáticas y cuando se agita 1 min al día. Sin embargo, estos valores máximos son inferiores a los determinados para 120 mL/min, lo que indicaría que es suficiente aplicar este último caudal para conseguir la aireación eficaz del sistema y la máxima producción de exo-PG.

- Celulasa

En la figura 4.28 se representan los resultados de actividad celulasa analizados utilizando diferentes caudales de aireación, para las distintas condiciones de agitación establecidas.



**Figura 4.28:** Actividad celulasa en los extractos para cada caudal de aireación empleado: 0 mL/min (a), 9 mL/min (b), 120 mL/min (c) y 200 mL/min (d), en función del tipo de agitación aplicada.

A la vista de los resultados representados en la figura 4.28 se puede observar también la influencia positiva que la aireación presenta sobre la producción de la celulasa, obteniéndose las actividades más bajas en los caudales de 0 y 9 mL/min (por debajo de 1 UA/gss) y hasta de  $3,7 \pm 0,05$  UA/gss para un caudal de 120 mL/min que, al igual que ocurría para las enzimas xilanasas y exo-PG, se alcanza cuando se trabaja sin agitación (5,35 veces superior al valor analizado en las mismas condiciones pero sin utilizar aireación forzada). También para el caso de 200 mL/min, la ausencia de agitación proporciona la actividad celulasa más alta y esta decrece con la frecuencia de agitación. Sin embargo, su máximo es inferior al determinado para 120 mL/min,

lo que indicaría que es suficiente aplicar este último caudal para conseguir la aireación eficaz del sistema y la máxima producción de celulasa.

A modo de conclusión general para el reactor de tambor rotatorio, se puede afirmar que la aireación presenta un efecto positivo sobre la producción de las enzimas en estudio hasta el caudal máximo de 120 mL/min, por encima del cual no se obtienen mayores rendimientos. Así, para este caudal se alcanzan actividades entre 5 y 11 veces mayores que si no se aplica aireación alguna. Con este caudal óptimo, las condiciones estáticas o de agitación suave (1 min/día) proporcionan las actividades enzimáticas más altas. Este incremento de las actividades enzimáticas a caudales intermedios ya fue descrito por Kalogeris y col.<sup>280,283</sup> Estos estudiaron la influencia del caudal del aire sobre la producción de celulasas y hemicelulasas en un tambor rotatorio a escala de laboratorio (10L) y concluyeron que, aunque la aireación ejerce en general un efecto positivo en la producción de enzimas, la actividad no es directamente proporcional al caudal, obteniéndose valores más bajos para las aireaciones más elevadas. Este hecho podría deberse a la dificultad de mantener el nivel de humedad imprescindible para la FES a partir de determinados caudales.

#### **4.4.4. Comparación de actividades en los distintos reactores de FES**

Una vez mostrados los resultados obtenidos con los tres tipos de reactor de FES utilizados (lecho fijo, bandejas y tambor rotatorio) es conveniente compararlos entre sí para determinar cuál es el más apropiado para la obtención de mayores actividades xilanasas, exo-PG y celulasa. Para ello, en la tabla 4.1 se exponen los máximos de actividad enzimática alcanzados con cada tipo de reactor (incluyendo las placas petri descritas en el Capítulo 3, apartado 3.4.5), e indicando las condiciones de operación utilizadas. En el caso del reactor de bandejas, los resultados mostrados son los

obtenidos con el caudal de 300 mL/min, dado que son los que garantizaron la aireación homogénea de todos los platos.

	Xilanasa		Exo-PG		Celulasa	
	Condiciones operación	Actividad enzimática (UA/gss)	Condiciones operación	Actividad enzimática (UA/gss)	Condiciones operación	Actividad enzimática (UA/gss)
<i>Placa petri</i>	Sin aireación	32,69 ± 3,94	Sin aireación	3,77 ± 0,87	Sin aireación	5,35 ± 0,00
<i>Lecho fijo</i>	Caudal de aire: 60 mL/min	48,70 ± 3,78	Caudal de aire: 90 mL/min	3,84 ± 0,69	Caudal de aire: 90 mL/min	3,42 ± 0,12
<i>Bandejas</i>	Caudal de aire: 300 mL/min	45,73 ± 15,7	Caudal de aire: 300 mL/min	3,62 ± 1,06	Caudal de aire: 300 mL/min	2,58 ± 0,64
<i>Tambor rotatorio</i>	Caudal de aire: 120 mL/min Sin agitación	54,42 ± 2,88	Caudal de aire: 120 mL/min Sin agitación	8,77 ± 0,88	Caudal de aire: 120 mL/min Sin agitación	3,69 ± 0,05

**Tabla 4.1: Comparación de los valores máximos de actividad enzimática para las distintas configuraciones de reactor de FES utilizadas.**

En la tabla 4.1 se observa que el tambor rotatorio proporciona las actividades enzimáticas más altas de entre las distintas configuraciones estudiadas (con excepción de la actividad celulasa, para la que no se obtuvieron diferencias significativas entre los cuatro modelos). Paradójicamente, si bien es cierto que el reactor de tambor rotatorio está diseñado para trabajar en agitación, las mayores actividades se determinan cuando la fermentación transcurre en estático o con baja agitación (1 min/día).

Esta ligera superioridad mostrada por el modelo de tambor rotatorio podría deberse a un sistema de aireación del medio de fermentación más eficaz. Así, por ejemplo, en el reactor de lecho fijo se observó un fenómeno negativo para la eficacia de la aireación: la compactación del medio de fermentación, creándose caminos preferenciales que afectan a la transferencia de materia y calor en el interior del lecho, afectando al suministro de oxígeno a las células y generando altos gradientes de temperatura que afectan a la estabilidad de las enzimas. En la configuración de platos, esta aglomeración se evita al utilizar una capa fina de sustrato, facilitando el paso del aire a través del espacio interpartícula. Aún así, en los experimentos descritos, su eficacia es ligeramente inferior a la de tambor rotatorio. De hecho, y por similitud entre ambos sistemas, la fermentación en el tambor rotatorio sin agitación debería comportarse de manera muy similar al primer plato del reactor de bandejas (utilizando el mismo caudal de aire). Con este último, empleando un caudal de 300 mL/min, se obtuvieron actividades enzimáticas inferiores. En este sentido, es preciso señalar que el material con el que están contruidos los diferentes reactores (plástico o vidrio), el grosor de los mismos y su forma han de influir necesariamente en la disipación del calor generado y, por lo tanto, en la productividad enzimática.

Finalmente, y como es de esperar, la ausencia de aireación en las placas de petri explicaría que con este sistema se obtenga la actividad xilanasas más baja. Por el contrario, la máxima actividad celulasa se alcanzó con este sistema, sin embargo, se determinó a un mayor tiempo de fermentación (10 días a diferencia de los 5 días que transcurrían las fermentaciones en los reactores).

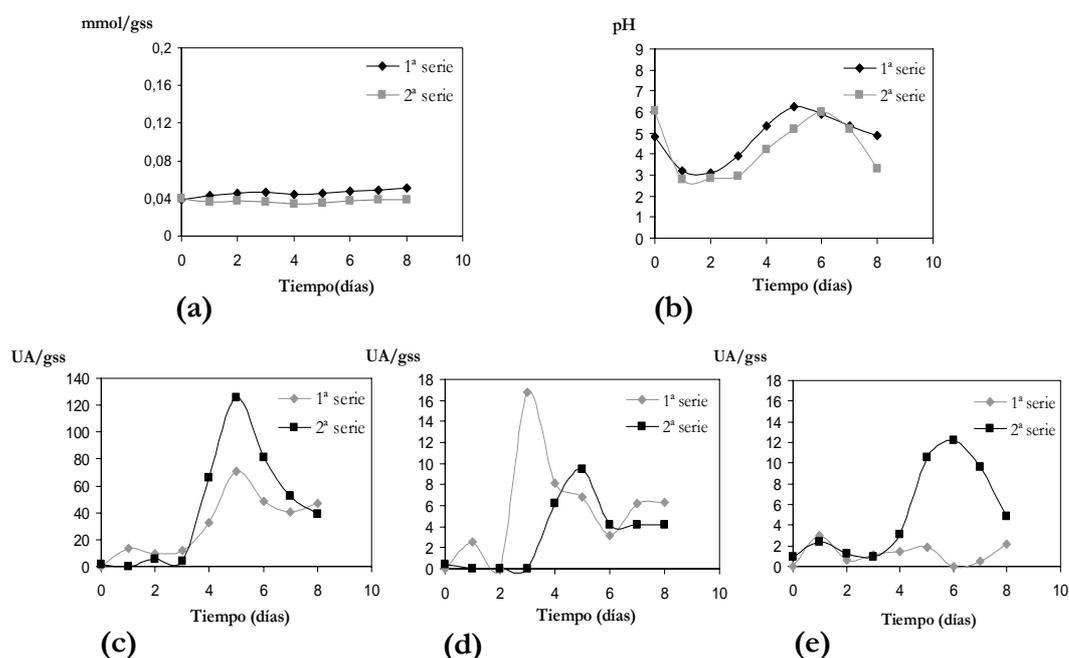
Otro aspecto a señalar en vista de los resultados obtenidos es que el caudal de aire necesario para alcanzar las máximas actividades enzimáticas depende de la configuración de reactor que se vaya a utilizar y de la enzima que se quiera obtener en mayor proporción.

A modo de conclusión, puede afirmarse que con las tres configuraciones de reactor evaluadas en este capítulo (lecho fijo, bandejas y tambor rotatorio) se obtienen buenos resultados de actividad de las tres enzimas evaluadas, resaltando la registrada por la xilanasa. De esta forma, se podría pensar en cualquiera de ellas a la hora de llevar a cabo un escalado del proceso en un fermentador de mayor tamaño. Con este fin, otros aspectos técnicos ya comentados en el apartado 4.1.3 del presente capítulo deberían ser tenidos en consideración a la hora de elegir la mejor opción: la disipación del calor generado en la fermentación, el mantenimiento de la humedad del medio, la agitación, etc.

#### **4.4.5. Fermentación en Cultivo Sumergido**

Las fermentaciones que se han descrito hasta ahora se llevaron a cabo en estado sólido, proceso que transcurre en ausencia de agua libre. En el presente apartado se van a mostrar los resultados obtenidos empleando un reactor de tanque agitado, en el cual la fermentación se desarrolla en cultivo sumergido.

Como ya se describió detalladamente en el apartado 4.3.2, se empleó un reactor discontinuo de tanque agitado de 5 L de capacidad, al que se incorporaron los apropiados sistemas de aireación, agitación, termostatación y control de pH, temperatura y oxígeno disuelto. Como medio de fermentación se utilizó una mezcla de orujo de uva y cáscaras de naranja suspendida en una solución nutritiva en una proporción de 20 g/L. Tras la inoculación, se tomaron muestras cada 24 horas, determinando en cada extracto la concentración de azúcares reductores, pH y actividad de las enzimas xilanasa, exo-PG y celulasa. Se realizaron dos series de experimentos en las mismas condiciones cuyos resultados se muestran en la figura 4.29.



**Figura 4.29: Resultados de las dos fermentaciones realizadas en el reactor de cultivo sumergido: evolución de la concentración de azúcares reductores con el tiempo (a), pH (b), actividad xilanasa (c), actividad exo-PG (d) y actividad celulasa (e).**

Como se observa en la figura 4.29 (a), la concentración de azúcares reductores se mantiene prácticamente constante y en valores muy bajos durante la fermentación. La máxima concentración se obtiene el octavo día de cultivo, con un valor comprendido entre 0,039 mmol/gss y 0,051 mmol/gss. En virtud de estos resultados es esperable un crecimiento adecuado de los microorganismos.

En relación al pH (figura 4.29 (b)), es preciso señalar que cada 24 horas se ajustó el pH del medio de fermentación a un valor de 3 añadiendo una disolución de HCl para evitar contaminaciones y adecuarlo a los óptimos establecidos en la bibliografía. A bajos pH cabe esperar una mayor actividad enzimática debido a que los nutrientes son más fácilmente asimilables por los microorganismos y se forman pellets de mayor tamaño.<sup>298</sup> Los valores mostrados en la gráfica corresponden al pH que

presentaba el medio justo antes de la adición. Como se analizará algo más adelante, y al igual que ocurría en las fermentaciones en estado sólido, se comenzó a detectar actividad enzimática cuando el pH se encontraba en el rango comprendido entre 4,11 y 6,82. En la figura se observa cómo los tres primeros días de la fermentación el pH se mantiene por debajo de 4 y, a partir de ahí, comienza a aumentar indicando que el hongo ha comenzado a acelerar su metabolismo.

La evolución seguida por la enzima xilanasa se representa en la figura 4.29 (c). Se puede constatar cómo, a partir del tercer día de fermentación, comienza su producción rápida. El valor máximo se alcanza al quinto día de incubación, en el que se determina una actividad comprendida entre 70,52 y 125,47 UA/gss. Para valorar la magnitud de estas actividades, es posible compararla con las obtenidas por Siedenberg y col., quienes utilizaron un reactor de 1,5 L similar al diseñado en la presente Tesis Doctoral, también con *Aspergillus awamori*.<sup>72</sup> Las fermentaciones se desarrollaron a 25°C, una aireación de 1 vvm y con ajuste de pH a 4,5. Como particularidad, es preciso comentar que en dicho experimento fue preciso adicionar xilano como inductor de xilanasa. Así, se obtuvo una actividad máxima de 30 U/g de biomasa seca con 400 rpm tras 170 horas (más de 7 días) de fermentación.

Los valores de actividad analizados para la enzima exo-PG se exponen en la figura 4.29 (d). Se observa un aumento de la actividad entre el segundo y el tercer día, hasta alcanzar el máximo entre el tercer y quinto día de fermentación, con una actividad comprendida entre 9,46 y 16,77 UA/gss. Oncu y col. utilizaron un reactor similar al descrito en este trabajo, pero que disponía de 4 placas deflectoras, para el estudio de distintas variables sobre la producción de pectinasas.<sup>298</sup> Determinaron las mayores actividades enzimáticas cuando no se controló el pH durante el proceso, la concentración de oxígeno disuelto era del 50% y se empleó una velocidad de agitación de 200 rpm.

En cuanto a las tendencias para la enzima celulasa, expuestas en 4.29 (e), se observa mayor heterogeneidad entre las dos pruebas realizadas. Así, mientras que en el primer ensayo la actividad se mantiene entre 0,53 y 3,01 UA/gss durante toda la fermentación, en la segunda repetición alcanza el valor máximo de 12,17 UA/gss tras 6 días de incubación.

En vista de los resultados obtenidos se observó una mayor actividad enzimática en cultivo sumergido que en estado sólido. Una de las principales razones podría ser la mayor transferencia del calor generado durante la fermentación en el medio líquido que en el sustrato sólido. La baja conductividad térmica del sólido podría provocar la generación de grandes gradientes de temperatura en el medio de fermentación que podrían afectar, entre otros factores, al desarrollo del hongo y a la producción de enzimas.

Otro aspecto a considerar es el control del pH. Durante las fermentaciones desarrolladas en cultivo sumergido se controló el pH a un valor de 3. Como se comentó anteriormente, a bajos pH cabe esperar una mayor actividad enzimática debido a que los nutrientes son más fácilmente asimilables por los microorganismos. Sin embargo, durante las FES, cuyo pH no fue controlado, este en algunos casos alcanzó valores próximos a 7.

Otro factor que podría haber favorecido la producción enzimática en la FCS es la agitación, que proporciona la mezcla de los distintos componentes del proceso (microorganismos, nutrientes y metabolitos), a diferencia de la FES donde se forman capas diferenciadas alrededor de las células microbianas que limitan la difusión de nutrientes, metabolitos e intercambio gaseoso, afectando al crecimiento. Sin embargo, la agitación no proporcionó mejores resultados al ser aplicada en el reactor

de tambor rotatorio, posiblemente porque resultó ser más abrasiva que en cultivo sumergido, ocasionando importantes daños al micelio.

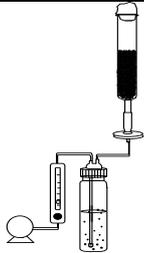
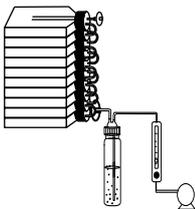
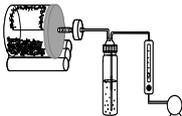
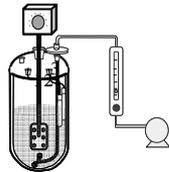
La humedad podría ser otro factor que limitó la producción de mayores actividades enzimáticas en estado sólido, ya que cuando se trabaja en ausencia de agua libre la difusión de los nutrientes está más limitada.

Es preciso señalar que a la hora de decantarse por un modelo de fermentación (FES o FCS) habrá que tener en cuenta otras variables influyentes en la productividad global, como costes de operación, volumen de reactor, tiempos de operación, volumen de efluentes, etc.

#### **4.4.6. Ventajas e inconvenientes de los distintos tipos de reactor utilizados**

Una vez analizados los resultados de concentración de azúcares reductores, pH y actividad de las enzimas xilanas, exo-PG y celulasa, es preciso exponer a modo de conclusión las ventajas y desventajas que presentan las distintas configuraciones de reactor utilizadas tanto en estado sólido como en cultivo sumergido.

Para facilitar este estudio en la tabla 4.2 se muestra un cuadro comparativo con las principales características de los 4 sistemas utilizados.

FACTOR	REACTORES			
	FES			FCS
	Lecho fijo	Bandejas	Tambor rotatorio	Tanque agitado
Sistema				
Sistema de toma de muestra	No dispone	No dispone	No dispone	Jeringa acoplada a tubería de silicona
Sonda de control de pH y T <sup>a</sup>	No dispone	No dispone	No dispone	Si dispone
Aireación	Máximas actividades enzimáticas con caudales comprendidos entre 60-90 mL/min	Caudal mínimo de 300 mL/min para airear toda la columna de platos	Caudal de aire óptimo de 120 mL/min	Caudal de aire de 1 vvm
Agitación	No dispone	No dispone	Óptimo en estático o agitación de 1 min/día	Por debajo de 120 rpm no se consigue la homogeneización del medio de fermentación
Esterilización	Autoclave	No necesaria. Las botellas roux se comercializan estériles	Vapor de agua	Vapor de agua
Inoculación	Esporas	Esporas	Esporas	Preinóculo desarrollado durante 5 días
Altura del lecho	13 cm	1,3 cm	2,5 cm	No dispone

(Continuación de la tabla anterior)

REACTORES				
FACTOR	FES			FCS
	Lecho fijo	Bandejas	Tambor rotatorio	Tanque agitado
Crecimiento miceliar	Intenso	Intenso	Intenso	Intenso
Extracción	Vertido del medio de fermentación a erlenmeyers en agitador orbital	Vertido del medio de fermentación a erlenmeyers en agitador orbital	Introducción del reactor en agitador orbital	Etapa no necesaria
Reproducibilidad de los resultados obtenidos (azúcares reductores, pH y actividad enzimática)	Alta	Intermedia	Alta	Baja

**Tabla 4.2: Cuadro comparativo de características y óptimos operativos de los distintos fermentadores utilizados.**

A continuación, se describirán cualitativamente las principales ventajas e inconvenientes de los distintos reactores empleados.

#### 4.4.6.1. Reactor de lecho fijo

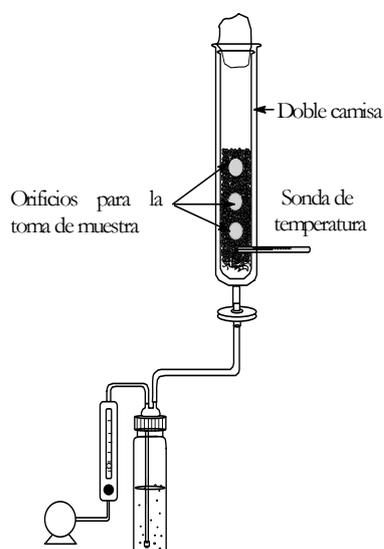
La principal ventaja que presenta el reactor de lecho fijo empleado es su facilidad de montaje. Se trata de un sistema sencillo con el que se consiguen altas actividades enzimáticas y resultados reproducibles. Además, con esta configuración de reactor se obtiene un abundante crecimiento fúngico, que podría explicarse en base a que:

- Con una baja aireación (60-90 mL/min) se proporciona el oxígeno necesario a todo el lecho.

- La altura y configuración del lecho es la más adecuada para eliminar eficazmente a través de la pared de la columna el calor generado en la fermentación, evitando la aparición de importantes gradientes de temperatura que podrían afectar al desarrollo del hongo.

Como principal inconveniente, el diseño de reactor utilizado no posee sondas para la medida del pH y la temperatura del medio de fermentación, por lo que no se puede controlar ninguno de estos dos parámetros durante la fermentación. Además, esta configuración de reactor no permite la toma de muestra durante el proceso, teniendo que sacrificar toda la columna para la obtención del extracto.

Todos estos inconvenientes son fácilmente solucionables con la modificación del diseño del reactor para futuros ensayos. En la figura 4.30 aparecen las mejoras propuestas para este modelo; incluye sondas de temperatura, doble camisa de termostatación y tres orificios de toma de muestras a distintas alturas de la columna.



*Figura 4.30: Mejoras propuestas para el reactor de lecho fijo.*

#### 4.4.6.2. Reactor de bandejas

El reactor de bandejas cuenta con la ventaja de garantizar, con un caudal de 300 mL/min, la aireación eficaz de toda la columna de platos, proporcionando un buen desarrollo del hongo y altas actividades enzimáticas en todos ellos. Este hecho es consecuencia de la escasa profundidad del sólido a fermentar en cada plato, existiendo una gran superficie de contacto entre la fase gaseosa y el sustrato sólido.

Por el contrario, el reactor de bandejas utilizado presenta el inconveniente de que no dispone de sondas para el control del pH y la temperatura del sólido durante la fermentación. Además, como ocurría con el reactor de lecho fijo, este sistema no permite la toma de muestras durante la fermentación. Además, si no se proporciona el caudal de aire apropiado (300 mL/min), se puede producir la obstrucción de las tuberías impidiendo la aireación de todos los platos.

Todos estos inconvenientes son solucionables con la modificación propuesta en la figura 4.31; se proponen bandejas perforadas, de forma que el aire se introduciría por la inferior y saldría por la superior tras atravesar todas ellas. La medida de la temperatura y la humedad del medio de fermentación se podría realizar con ayuda de una sonda que se introduciría a través de un orificio realizado en la pared del plato.

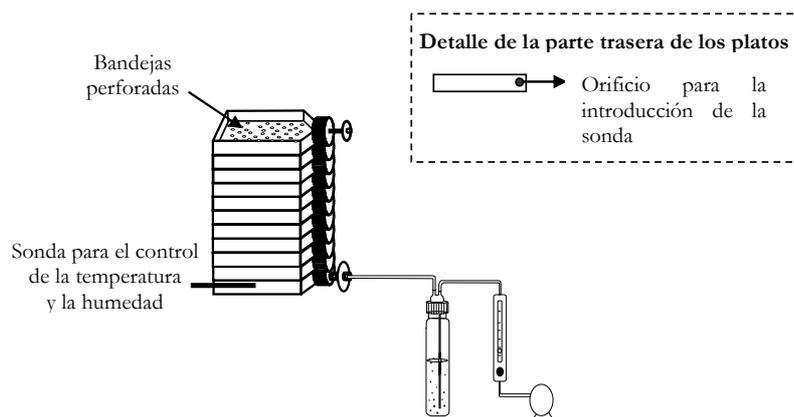


Figura 4.31: Mejoras propuestas para el reactor de bandejas.

En este sistema la toma de muestra en condiciones asépticas seguiría siendo complicada.

#### 4.4.6.3. Reactor de tambor rotatorio

El reactor de tambor rotatorio presenta la ventaja de disponer de un lecho de escasa altura, que se airea eficazmente con el empleo del caudal apropiado y permite la fácil eliminación del calor generado a través de la pared del reactor. En estas condiciones se obtiene un abundante crecimiento del hongo y las más altas actividades enzimáticas sin necesidad de emplear condiciones de agitación excesivas. Además, debido al tamaño y forma del reactor, el sistema permite llevar a cabo la extracción en el mismo recipiente mediante su colocación en el agitador y la adición del disolvente, utilizando las condiciones de extracción optimizadas.

Como inconvenientes, cabe señalar la aglomeración de las partículas del medio de fermentación al aplicar agitación constante (frecuente o continua) lo que dificulta la regulación de la temperatura del medio sólido y provoca una baja o nula transferencia del oxígeno en el interior de la partícula agrupada. Este problema se evita reduciendo al máximo el tiempo de agitación, como se propuso en el apartado 4.4.3. Además, el reactor de tambor rotatorio utilizado posee piezas no resistentes a 120°C, de ahí que su esterilización se deba llevar a cabo con vapor de agua. Sin embargo, no resultaría muy complicada la sustitución de estas piezas por otras que toleren las temperaturas alcanzadas en el autoclave. En este reactor la toma de muestra se podría realizar mediante la apertura de la cubierta de la botella bajo cámara de flujo laminar.

#### *4.4.6.4. Reactor de tanque agitado*

La principal ventaja que presenta el reactor de tanque agitado utilizado en este trabajo es que dispone de sondas de pH y temperatura. El control del pH en las fermentaciones llevadas a cabo en el reactor de tanque agitado es indispensable, ya que permite ajustar el pH a un valor de 3 para evitar contaminaciones y mejorar el rendimiento fúngico.

Con esta configuración se obtienen altas actividades xilanas, exo-PG y celulasa, incluso mayores a las determinadas en FES. Este hecho podría explicarse en base al mejor control de los parámetros influyentes (pH y temperatura) y a la mayor transferencia del calor generado durante la fermentación en el medio líquido que en el sustrato sólido utilizado en la FES. Además, en las fermentaciones en cultivo sumergido no es necesario llevar a cabo una etapa de extracción. De esta forma, utilizando el sistema de muestreo descrito en la tabla 4.2, se recogen los extractos enzimáticos cuando sean requeridos.

Como inconveniente cabe señalar que en las FCS llevadas a cabo en el reactor de tanque agitado no se obtienen valores de actividad enzimática reproducibles. El hecho de obtener una fermentación más o menos satisfactoria va a depender del estado del preinóculo utilizado. Se ha comprobado que a pesar de utilizar las mismas condiciones de cultivo para su preparación, los pellets producidos no siempre tienen el mismo tamaño y actividad.

Otro inconveniente que presenta la adición del preinóculo es que alarga 5 días el tiempo global del proceso con respecto a las fermentaciones en estado sólido.

El inconveniente que supone la necesidad de inocular con un precultivo se podría evitar adicionando esporas directamente al medio de fermentación. Como se

comentó en el apartado 4.3.2.2 esta propuesta de inoculación presenta el inconveniente de que se alarga aún más la duración de la fermentación.



#### 4.5. CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes del trabajo expuesto en el presente capítulo son las siguientes:

- En el reactor de lecho fijo la aireación presenta un efecto beneficioso sobre la producción de las enzimas xilanasa, exo-PG y celulasa. Sin embargo, hay un caudal máximo por encima del cual no se consiguen actividades enzimáticas más altas: 60 mL/min para la xilanasa y 90 mL/min para la exo-PG y celulasa.
- La aireación muestra una influencia muy importante sobre la producción de las enzimas objeto de estudio utilizando el reactor de bandejas. Para la aireación completa de dicho reactor es necesario emplear un caudal mínimo de 300 mL/min. Sin embargo, las actividades xilanasa y exo-PG más altas se consiguen con 200 mL/min.
- En el reactor de tambor rotatorio la aireación presenta un efecto positivo sobre la síntesis de las enzimas en estudio, hasta el caudal máximo de 120 mL/min por encima del cual no se obtienen mayores actividades. En general, con el empleo de este caudal de aireación, las condiciones estáticas o una agitación de 1 min al día proporcionan las actividades enzimáticas más altas.
- La fermentación en cultivo sumergido llevada a cabo en el reactor de tanque agitado proporciona valores de actividad enzimática superiores a los determinados en los reactores de FES utilizados en el presente capítulo. Sin embargo, en el reactor de tanque agitado no se obtienen actividades enzimáticas reproducibles.





# 5

## CARACTERIZACIÓN, CONCENTRACIÓN, PURIFICACIÓN Y APLICABILIDAD DE LAS ENZIMAS EN ESTUDIO



## 5.1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son compuestos que presentan un alto valor añadido y están involucradas en los procesos biológicos de una gran variedad de industrias como la alimentaria, la farmacéutica, la de cosméticos, etc. Dentro de las enzimas cabe destacar el grupo de las hidrolíticas, que se utilizan en la industria textil, en la producción de zumos y extractos de frutas, en la industria de la pulpa y el papel, etc.<sup>307</sup> A este grupo pertenecen las enzimas xilanasas y exo-PG, cuyas principales aplicaciones y su producción mediante fermentación en estado sólido se desarrollaron en los capítulos anteriores.

### 5.1.1. Estabilidad de las enzimas

Para la aplicación industrial de las enzimas el aspecto más importante a tener en cuenta es el de su estabilidad, ya que estas deben mantenerse activas durante el mayor tiempo posible.<sup>308</sup> La estabilidad de las enzimas está afectada tanto por parámetros físicos, como el pH y la temperatura, como por parámetros químicos, como son la presencia de inhibidores y activadores. Por este motivo, en la bibliografía aparecen publicados una gran cantidad de trabajos relacionados con la estabilidad de las enzimas, los cuales proporcionan información muy útil acerca de su estructura y su función.

En el caso de las xilanasas, las más estudiadas han sido las obtenidas de hongos y bacterias, y han mostrado ser activas, o prácticamente activas, a temperaturas

---

<sup>307</sup> Díaz, A.; Caro, I.; de Ory, I.; Blandino, A. (2005). Recovery of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation of grape pomace with *Aspergillus awamori*. *Chemical Engineering Transactions*, 911-916.

<sup>308</sup> Sathyanarayana, N.; Gummadi, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases-a review. *Process Biochemistry*, **38**, 7, 987-996.

mesofílicas (aproximadamente entre 40 y 60°C),<sup>309,310,311</sup> y a pH neutros (en particular las xilanasas obtenidas a partir de bacterias) o ligeramente ácidos (para xilanasas fúngicas).<sup>309</sup> Sin embargo, hay un gran número de procesos biotecnológicos que necesitan xilanasas resistentes a condiciones más extremas,<sup>309</sup> como es el caso de una de sus aplicaciones más importantes; el blanqueado de la pulpa y el papel. Este proceso transcurre en condiciones de pH y temperatura elevadas (55-70°C) con lo que el uso de xilanasas activas en condiciones de alcalinidad permite añadir directamente la enzima a la pulpa, sin un ajuste previo del pH. El problema radica en que hay relativamente pocos microorganismos que producen xilanasas que sean activas en estas condiciones.<sup>312,313,314,315,316</sup> No obstante, en la bibliografía se describe el ejemplo de enzimas sintetizadas por microorganismos extremófilos que son resistentes a mayor variedad de medios. De esta forma, se han encontrado xilanasas que son activas en rangos de temperatura de 5 a 105°C,<sup>309,317</sup> de pH de 2 a 11 y a altas concentraciones de NaCl.<sup>309,318</sup>

---

<sup>309</sup> Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**, 3–23.

<sup>310</sup> Subramaniyan, S.; Prema, P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, **22**, 33–64.

<sup>311</sup> Sunna, A.; Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, **17**, 39–67.

<sup>312</sup> Dhillon, A.; Gupta, J.; Jauhari, B.; Khanna, S. (2000). A cellulase-poor, thermostable, alkali-tolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. *Bioresource Technology*, **73**, 273–277.

<sup>313</sup> Lama, L.; Calandrelli, V.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B. (2004). Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. *Research in Microbiology*, **155**, 283–289.

<sup>314</sup> Zverlov, V.; Piotukh, K.; Dakhova, O.; Velikovdorskaya, G.; Borris, R. (1996). The multidomain xylanase A of the hyperthermophile bacterium *Thermotoga neapolitana* is extremely thermoresistant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **45**, 245–247.

<sup>315</sup> Bansod, S.; Rele, M. (1998). Alkaline xylanase from an alkalotolerant *Cephalosporium* sp.: characteristics. *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics*, **2**, 121–128.

<sup>316</sup> Gessesse, A. (1998). Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied Environmental Microbiology*, **64**, 3533–3535.

<sup>317</sup> Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, **23**, 411–456.

<sup>318</sup> Waino, M.; Ingvorsen, K. (2003). Production of betaxylanase and beta-xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utabensis*. *Extremophiles*, **7**, 87–93.

Las xilanasas también se emplean en la industria de detergentes y en los programas de gestión de residuos, procesos que transcurren a pH básicos y que necesitan enzimas activas en estas condiciones.<sup>309</sup> En el caso de la industria alimentaria, generalmente se utilizan xilanasas adaptadas a temperaturas bajas y medias.<sup>309,319</sup>

Las otras enzimas hidrolíticas de interés es este estudio son las pectinasas, siendo las más interesantes por su aplicabilidad industrial las producidas por hongos, debido a su alta actividad enzimática y su actividad óptima a bajos pH. Estas condiciones son generalmente las más apropiadas para las aplicaciones relacionadas con el procesado de frutas y verduras, principal interés comercial de estas enzimas.<sup>323,320</sup> Sin embargo, hay tratamientos que necesitan que sean resistentes a altos pH, como es el caso de la eliminación de la pectina de las fibras de alimentos cosechados y del tratamiento de aguas residuales pectínicas procedentes de las industrias de elaboración de zumos de frutas.<sup>321</sup>

En cuanto a la temperatura, cabe señalar que la mayoría de las poligalacturonasas fúngicas son termolábiles, presentando actividad óptima a temperaturas comprendidas entre los 30 y 50°C,<sup>323,322</sup> llegando a inactivarse irreversiblemente a los 60°C. Sin embargo, hay procesos que requieren pectinasas estables a temperaturas altas, como es el caso de la elaboración del zumo de manzana, donde la clarificación enzimática se puede llevar a cabo a 15°C durante 12 horas, o a 50°C durante 1

---

<sup>319</sup> Dutron, A.; Georis, J.; Genot, B.; Dauvrin, T.; Collins, T.; Hoyoux, A.; Feller, G. (2004). Use of family 8 enzymes with xylanolytic activity in baking. World Intellectual Property Organization, PCT, WO 2004/023879 A1.

<sup>320</sup> Dziezak, J. (1991). Enzymes: catalyst for food processes. *Food Technology*, **45**, 78–85.

<sup>321</sup> Celestino, M.; Freitas, M.; Medrano, J.; Souza, V.; Ferreira, X. (2006). Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. *Journal of Biotechnology*, **123**, 1, 33-42.

<sup>322</sup> Sakai, T.; Sakamoto, T.; Hallaert, J.; Vandamme, E. (1993). Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, **39**, 213–294.

hora.<sup>323,324</sup> En este último caso, el tratamiento se podría realizar en un tiempo menor siempre y cuando la enzima presentara estabilidad a la temperatura más alta. En la bibliografía se documenta que las pectinasas producidas por hongos del género *Penicillium*,<sup>323,325</sup> *Rhizopus*,<sup>323,326</sup> y *Sclerotinia*<sup>323,327</sup> han mostrado ser estables en estas condiciones.

No todos los procesos industriales en los que se aplican las pectinasas transcurren en condiciones extremas de pH y temperatura. Así, por ejemplo, en la industria de elaboración de piensos se requiere que mantengan su actividad en un amplio rango de pH y que presenten estabilidad a una temperatura moderada, ya que el pH y la temperatura del aparato digestivo de los animales son aproximadamente de 4,8 y 40°C, respectivamente.<sup>309</sup>

Además de la influencia de pH y temperatura en la actividad enzimática resulta muy interesante estudiar su comportamiento en presencia de impurezas como los iones metálicos. Las xilanasas y las pectinasas se aplican en procesos como la degradación de residuos industriales, en los que hay presentes una gran cantidad de impurezas, como algunos iones metálicos, que podrían inhibir su actividad. Sin embargo, los metales también pueden tener efectos positivos sobre la catálisis enzimática, por ejemplo aceptando o donando electrones, uniendo la enzima con el sustrato mediante enlaces coordinados, manteniendo a los grupos reaccionantes con la

---

<sup>323</sup> Ortega, N.; de Diego, S.; Perez-Mateos, M.; Busto, M. (2004). Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, **88**, 2, 209-217.

<sup>324</sup> Lea, A. (1995). Enzymes in the production of beverages and fruit juices. *Enzymes in food processing*. Tucker, G.A. and Woods, L.F.J., Editors. Blackie Academic & Professional, London, 223-249.

<sup>325</sup> Gillespies, A.; Cook, K.; Coughlan, M. (1990). Characterization of endopolygalacturonase produced by solid-state cultures of the aerobic fungus *Penicillium capsulatum*. *Journal of Biotechnology*, **13**, 279-292.

<sup>326</sup> Ros, J.; Saura, D.; Saimeron, M.; Lencian, J. (1993). On the response under different treatments of the thermostable endopolygalacturonases by *Rhizopus nigricans*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, **196**, 4, 356-359.

<sup>327</sup> Archer, S.; Fielding, A. (1975). Thermostable polygalacturonase secreted by *Sclerotinia fructigana*. *Journal of Food Science*, **40**, 423-424.

orientación tridimensional requerida, estabilizando una conformación activa para la función catalítica de la enzima, etc.<sup>328,329</sup> Es por ello que en el presente capítulo se presentan los ensayos de estabilidad de la xilanasa y la exo-PG en presencia de distintos cationes.

### 5.1.2. Concentración de las enzimas

Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de aplicar una enzima en un determinado proceso biotecnológico es el establecimiento de un protocolo adecuado de concentración de los extractos para reducir su volumen y facilitar su uso. Además, las enzimas de uso comercial suelen suministrarse secas, debido a que presentan mayor estabilidad que en disolución acuosa.<sup>330</sup>

Los métodos que comúnmente se citan en la bibliografía con el propósito de concentrar los extractos enzimáticos son la precipitación y la liofilización. La precipitación se basa en la disminución de la solubilidad de las proteínas, induciéndose su precipitación mediante el descenso de la constante dieléctrica del medio. En general, las moléculas de disolvente con elevadas constantes dieléctricas, como el agua o el dimetil sulfóxido, interactúan establemente con las moléculas de proteínas, favoreciendo la disolución de las mismas. Por otra parte, los disolventes orgánicos con pequeñas constantes dieléctricas, como la acetona o el metanol, disminuyen la solubilidad de las moléculas de proteína en el medio, induciendo su

---

<sup>328</sup> Mohana, S.; Shah, A.; Divecha, J.; Madamwar, D. (2008). Xylanase production by *Burkholderia sp.* DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash. *Bioresource Technology*, **99**, 7553-7564.

<sup>329</sup> Palmer, T. (2001). *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Chemical chemistry*. Horwood Publication, Chichester, UK, 191-222.

<sup>330</sup> DePaz, R.; Dale, D.; Barnett, C.; Carpenter, J.; Gaertner, A.; Randolph, T. (2002). Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 6, 765-774.

precipitación.<sup>331</sup> Como ejemplo de la utilización de disolventes orgánicos en la precipitación de proteínas se puede citar la metodología seguida para la precipitación de una queratinasa producida por *Aspergillus oryzae*, y de proteasas producidas por *Mucor bacilliformis*, para la cual se utilizó etanol y acetona.<sup>332,333</sup>

Debido a que los disolventes orgánicos pueden producir la desnaturalización de las proteínas, es conveniente llevar a cabo el proceso de precipitación a bajas temperaturas. Por ese motivo, Angayarkanni y col. llevaron a cabo la concentración de pectinasas producidas por hongos de la especie *Aspergillus* a la temperatura de 4°C y utilizando etanol como agente precipitante.<sup>334</sup>

Otra manera de disminuir la solubilidad de las proteínas y, por consiguiente, favorecer su precipitación consiste en la adición de sales al extracto enzimático. A medida que se aumenta la concentración de sal, hay menos agua disponible para solubilizar la proteína, por lo que esta comienza a precipitar.<sup>335</sup> La sal comúnmente utilizada con este propósito es el sulfato amónico, dada su alta solubilidad en agua y por tratarse de una sal relativamente barata. No obstante, debe tenerse en cuenta que, con esta técnica, se producen permanentes pérdidas de actividad debido a la desnaturalización de las proteínas.

Otra metodología que también se emplea en la concentración de proteínas es la liofilización, que consiste en la eliminación del agua presente en una sustancia,

---

<sup>331</sup> Wang, N. Enzyme purification by acetone precipitation. Biochemical engineering laboratory. Department of Chemical & Biomolecular Engineering. University of Maryland.

<sup>332</sup> Farag, A.; Hassan, A. (2004). Purification, characterization and immobilization of keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, 2, 85-93.

<sup>333</sup> Fernández-Lahore, H.; Fraile, E.; Cascone, O. (1998). Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. *Journal of Biotechnology*, **62**, 2, 83-93.

<sup>334</sup> Angayarkanni, J.; Palaniswamy, M.; Murugesan, S.; Swaminathan, K. (2002). Improvement of tea leaves fermentation with *Aspergillus sp.* pectinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **94**, 4, 299-303.

<sup>335</sup> Jakoby, W. (1971). Crystallization as a purification technique. Enzyme Purification and Related technique. *Methods in Enzymology*, Jakoby, W.B. (Ed.), **22**, Academic Press.

previamente congelada, aplicando un vacío que permite su sublimación directa hasta la fase gaseosa. Mediante esta técnica es posible secar las muestras, sin dañarlas, a bajas temperaturas.<sup>336,337,338</sup> Como ejemplo se puede citar la concentración de las proteínas de la sidra llevada a cabo por Blanco y col.<sup>339</sup>

Esta técnica no sólo ofrece la posibilidad de concentrar los extractos enzimáticos, sino que además permite su preservación. Además, debido a la estructura porosa que presentan todos estos productos tras ser liofilizados, se rehidratan fácilmente. Así, por ejemplo, Vasiljevic y Jelen utilizaron este método para la conservación de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa presente en extractos de fermentación, recuperando prácticamente toda la actividad de la enzima tras la rehidratación de la muestra.<sup>340</sup>

### 5.1.3. Purificación de las enzimas

Hay procesos industriales que requieren enzimas que se encuentren libres de la presencia de otras proteínas, en cuyo caso resulta de gran interés llevar a cabo la purificación previa de los extractos enzimáticos. La purificación de proteínas es una de las técnicas bioquímicas más comunes, que se utiliza para separar selectivamente una proteína de otras mediante un procedimiento de fraccionamiento apropiado.<sup>341,342</sup>

<sup>336</sup> Franks, F. (1990). Freeze-drying: from empiricism to predictability. *Cryo-Letters*, **11**, 93-110.

<sup>337</sup> Zhai, S.; Su, H.; Taylor, R.; Slater, N. (2005). Pure ice sublimation within vials in a laboratory lyophiliser; comparison of theory with experiment. *Chemical Engineering Science*, **60**, 1167-1176.

<sup>338</sup> Dalgleish, J. (1990). Freeze-drying for the Food Industries. Elsevier Applied Science, London.

<sup>339</sup> Blanco, D.; Expósito, Y.; Junco, S.; Gutiérrez, M. (2003). Fractionation and characterization of soluble proteins from cider. *Food Chemistry*, **83**, 4, 507-513.

<sup>340</sup> Vasiljevic, T.; Jelen, P. (2003). Drying and storage of crude  $\beta$ -galactosidase extracts from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* 11842. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **4**, 3, 319-329.

<sup>341</sup> Gómez-Moreno, C.; Sancho, J. (2003). Estructura de Proteínas. Ariel (Ed.), Barcelona.

<sup>342</sup> Bes, M.; Sancho, J.; Peleato, M.; Medina, M.; Gómez-Moreno, C.; Fillat, M. (2003). Purification of coloured photosynthetic proteins for understanding protein isolation principles. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, **31**, 119-122.

Los métodos de purificación se basan en diferentes características de las proteínas, como la solubilidad (fraccionamiento por adición de sales, fraccionamiento con disolventes orgánicos o precipitación isoelectrica), la carga (cromatografía de intercambio iónico, técnicas electroforéticas), el tamaño molecular (cromatografía de exclusión), las interacciones bioespecíficas (cromatografía de afinidad), etc.<sup>343</sup>

En la bibliografía referente a la publicación de pecinasas y xilanasas ha sido reportada, sobre todo, la utilización de la cromatografía de intercambio iónico. Para llevar a cabo este tipo de cromatografía se necesita un intercambiador iónico, que es un sólido que presenta grupos cargados a los que se unen las proteínas por fuerzas electrostáticas, permitiendo que se separen unas de otras en función de su carga. Habitualmente se utilizan como intercambiadores matrices derivadas de celulosa microcristalina: dietil aminoetil celulosa (DEAE, intercambiador aniónico) y carboximetil celulosa (CM-celulosa, intercambiador catiónico).

En la mayoría de las ocasiones es necesario realizar una concentración previa del extracto enzimático antes de proceder a su purificación. Así, por ejemplo, Chitradon y col. llevaron a cabo la purificación de pectinasas producidas por *Rhizopus* utilizando para ello resinas de DEAE y CM, siendo para ello necesario realizar una concentración previa de la muestra con sulfato amónico.<sup>344</sup> De forma análoga Ninawe y col. purificaron la enzima xilanasas producida por *Streptomyces cyaneus* SN32 mediante una columna DEAE, concentrando inicialmente el extracto con sulfato amónico.<sup>218</sup>

---

<sup>343</sup> [http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica\\_biologia/docencia/FMBvirtual/PraFMB2007-08.doc](http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/FMBvirtual/PraFMB2007-08.doc).

<sup>344</sup> Chitradon, L.; Poonpairaj, P.; Mahakhan, P.; Kitpreechavanich, V.; Lotong, N. (1996). Pectinases from *Rhizopus sp.* Efficient in enhancing the hydrolyzation of raw cassava starch: Purification and characterization. *Progress in Biotechnology*, **14**, 715-722.

#### 5.1.4. Aplicabilidad de las enzimas

Como se ha comentado anteriormente, una de las principales aplicaciones de las enzimas hidrolíticas xilanasas y exo-poligalacturonasa es la clarificación y extracción de zumos de frutas. Está demostrado que las pectinasas juegan el papel más importante en estos procesos y que la presencia de otras actividades enzimáticas laterales mejora su rendimiento.<sup>236</sup> De esta forma, la combinación de pectinasas con celulosas, arabinasas y xilanasas, aumenta la eficacia de la extracción de los zumos de frutas.<sup>345</sup>

Uno de los principales problemas que aparece en el proceso de elaboración de zumos de frutas es la turbidez, que se debe a la presencia de coloides compuestos por polisacáridos (pectina, celulosa, hemicelulosa, lignina y almidón), proteínas, taninos y metales.<sup>346,347</sup> Las principales responsables de la turbidez son las pectinas, que estructuralmente son polisacáridos constituidos por residuos de ácido galacturónico unidos mediante enlaces  $\alpha$ -1,4, que se sitúan en la lamela media y en la pared primaria de las células vegetales.<sup>348</sup>

Como consecuencia de la depectinización enzimática, se obtiene un zumo con un menor contenido en pectina y una viscosidad más baja, lo que beneficia los posteriores procesos de filtración.<sup>346</sup>

---

<sup>345</sup> Gailing, M.; Guibert, A.; Combes, D. (2000). Fractional factorial designs applied to enzymatic sugar beet pulps pressing improvement. *Bioprocess Engineering*, **22**, 69–74.

<sup>346</sup> Liew, A.; Sulaiman, N.; Aroua, M.; Megat, M. (2007). Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering*, **81**, 65–71.

<sup>347</sup> Vaillant, F.; Millan, A.; Dornier, M.; Decloux, M.; Reynes, M. (2001). Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *Journal of Food Engineering*, **48**, 83–90.

<sup>348</sup> Kashyap, D.; Vohra, P.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, **77**, 3, 215–227.

Debido a la gran variedad de sustancias pectínicas presentes en los diferentes tejidos vegetales, se necesita un rango de pectinasas bastante complejo, incluyendo exopoligalacturonasa, endopoligalacturonasa, glucanohidrolasa, pectin esterasa y pectato liasa.<sup>349</sup> Dentro de los productores de estos tipos de enzimas destacan los hongos filamentosos, las bacterias y algunas levaduras. Desde el punto de vista de la producción industrial, la principal fuente de estas enzimas son los crudos de fermentación de hongos, principalmente los del género *Aspergillus*, como es el caso de *Aspergillus niger*.<sup>349,350</sup>

---

<sup>349</sup> Bailey, M.; Pessa, E. (1990). Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme and Microbial Technology*, **12**, 4, 266-271.

<sup>350</sup> Godfrey, T.; Reichelt, J. (1983). *Industrial Enzymology*. Macmillan Publisher, UK, 503-544.

## **5.2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO**

Los principales objetivos que se pretenden conseguir con el desarrollo de este capítulo son:

- Estudiar la estabilidad de las enzimas xilanasa y exo-PG frente al pH y la temperatura, y en presencia de cationes.
- Comparar los resultados obtenidos en la concentración de las enzimas en estudio utilizando los métodos de precipitación y liofilización.
- Estudiar la aplicabilidad del extracto enzimático concentrado en la clarificación de mostos, comparando su eficacia con la de crudos enzimáticos comerciales.
- Desarrollar una metodología para la purificación parcial de las enzimas xilanasa y exo-PG. Este objetivo resulta de gran interés para su posterior aplicación en procesos en los que se requiera un mayor grado de pureza de los extractos.
- Comparar la pureza de los extractos parcialmente purificados con crudos enzimáticos y enzimas xilanasa y exo-PG comerciales.



### 5.3. MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente apartado se indicará, en primer lugar, la metodología utilizada para la obtención del extracto enzimático sobre el cual se realizaron los distintos estudios desarrollados en este capítulo. Posteriormente, se describirán los protocolos seguidos en la caracterización de las enzimas xilanasa y exo-PG en base a su comportamiento frente al pH, la temperatura y en presencia de distintas sales inorgánicas. A continuación, se detallarán los diferentes ensayos utilizados para la concentración de los extractos enzimáticos, comparando su actividad clarificadora con la de los extractos comerciales comúnmente utilizados en la industria de zumos de frutas. Finalmente, se describirá el protocolo llevado a cabo para la purificación parcial de las dos enzimas objeto de estudio, comparando el grado de pureza conseguido con el de los extractos enzimáticos comerciales.

#### 5.3.1. Obtención de los extractos enzimáticos

Para el desarrollo de las fermentaciones se utilizó como medio de fermentación una mezcla constituida por un 50% (p/p) de orujo de uva y un 50% (p/p) de cáscaras de naranja, inoculada con el hongo *Aspergillus awamori*. Tanto la preparación del sólido como su inoculación se detallaron en el apartado 3.3 del Capítulo 3.

Las fermentaciones en estado sólido se llevaron a cabo sin agitación en el biorreactor de tambor rotatorio descrito en el apartado 4.3.1.4 del Capítulo 4, que fue aireado con un flujo medio de 120 mL/min e incubado a 30°C durante 5 días. Se eligió esta configuración de reactor y estas condiciones de operación porque fueron las que proporcionaron las mejores actividades de las enzimas objeto de estudio.

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación se extrajo el sólido fermentado, empleando las condiciones descritas en el apartado 3.3.5 del Capítulo 3. Posteriormente la suspensión obtenida se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm y 4°C. El sobrenadante o extracto enzimático obtenido se utilizó para el desarrollo de los distintos estudios que se describirán a continuación, en los cuales se evaluó la actividad de las enzimas xilanasa y exo-PG, de acuerdo con el protocolo que se describió en el apartado 3.3.6 del Capítulo 3.

### **5.3.2. Determinación de las proteínas totales en los extractos (método de Lowry)**

Para evaluar el grado de pureza de los extractos enzimáticos obtenidos se determinó la actividad específica (expresada en UA/mg), calculada dividiendo la actividad enzimática por mL (UA/mL) entre la concentración de proteínas totales presentes en los mencionados extractos (mg/mL). Para la obtención de este último parámetro se empleó el método de Lowry que consiste, en primer lugar, en la formación de un complejo Cu-proteína en disolución alcalina de baja sensibilidad. En un segundo paso se potencia el desarrollo de la reacción coloreada mediante el reactivo de Folin, que se basa en la reducción por parte de los grupos fenólicos presentes en ciertos residuos de aminoácidos (como la tirosina y el triptófano), del reactivo fosfomolibdato-fosfotungstato (reactivo de Folin), produciéndose un color azul intenso que es máximo a pH 10. El ion cobre, que en la reacción se encuentra en forma de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , no precipita por la presencia del tartrato.

Para el desarrollo de este método se utilizaron las disoluciones siguientes:

- Reactivo de Folin-Ciocalteu comercial constituido por tungstato sódico, molibdato sódico, HCl,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  y  $\text{Br}_2$ .

- Solución A, formada por  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en NaOH 0,1 M.
- Solución B, constituida por  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  al 0,5% en tartrato sódico potásico al 1%.
- Solución C, preparada mediante la mezcla de 25 mL de la solución A con 0,5 mL de la B.

La metodología seguida consistía en la adición de 1 mL de solución C recién preparada a cada tubo que contenía 200  $\mu\text{L}$  de extracto, incubándose la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se adicionaron a cada tubo 100  $\mu\text{L}$  de solución de Folin diluida a la mitad, mezclando rápidamente y dejándolos en contacto durante 10 min, procediendo a la lectura de la absorbancia a 640 nm.

Para el cálculo de la concentración de proteínas en las muestras se preparó una recta patrón utilizando distintas soluciones con cantidades crecientes de albúmina.

### **5.3.3. Ensayos de estabilidad de las enzimas xilanasa y exo-PG**

Como se comentó en la introducción, es muy importante conocer las características de las enzimas que se van a aplicar en un determinado proceso industrial. Quizás las más relevantes sean la estabilidad en presencia de cationes y a distintos pH y temperaturas. A continuación, se describe la metodología empleada para su estudio.

#### *5.3.3.1. Efecto de la presencia de cationes*

Este estudio consistió en evaluar la influencia de una serie de cationes sobre la actividad de las enzimas xilanasa y exo-PG. Para ello, se puso en contacto el extracto enzimático con sales de los cationes en una concentración 0,1M; concretamente se

utilizaron  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$  y  $\text{FeSO}_4$ .

Para estudiar la influencia que ejercía cada ion sobre la actividad de las enzimas se compararon los resultados de actividad enzimática obtenidos con los de un control, que siguió el mismo tratamiento pero contenía agua destilada en lugar de la disolución del ion.

La metodología seguida para el desarrollo de este estudio no fue la misma para las enzimas xilanasa y exo-PG, de ahí que se describan a continuación de forma independiente.

a) *Xilanasa*

Para llevar a cabo la determinación de la estabilidad de la enzima xilanasa en presencia de distintos cationes, se añadieron 0,3 mL de extracto enzimático y 0,3 mL de la disolución del ion correspondiente a un tubo eppendorf de 2 mL. Posteriormente, la mezcla se incubó durante 5 minutos en un baño a  $50^\circ\text{C}$ , realizándose a continuación el test enzimático de actividad.

b) *Exo-PG*

En el procedimiento llevado a cabo para el estudio de estabilidad de la exo-PG se incluyó un paso previo de concentración, ya que la actividad de dicha enzima en los extractos no era muy elevada. Para disponer de una solución con mayor actividad exo-PG se liofilizó el extracto, para lo cual se colocaron 4 mL del mismo en distintos tubos pirex de 10 mL, que se congelaron ( $-21^\circ\text{C}$ ) y sometieron a alto vacío. Este proceso duró 24 horas, obteniéndose un sólido de color amarillo que se disolvió

añadiendo a cada tubo 0,45 mL de tampón acetato 0,1M a pH 5 (volumen mínimo necesario para realizar el test enzimático).

Para estudiar la influencia de los distintos cationes sobre la actividad de la enzima, se añadieron a cada tubo eppendorf 0,1mL de la solución del ión correspondiente y 0,1mL de extracto enzimático concentrado. La mezcla se incubó en un baño termostaticado a 45°C durante 5 minutos, tiempo tras el cual se realizó el test enzimático directamente en el tubo eppendorf.

### 5.3.3.2. Efecto del pH

Este estudio consistió en la evaluación de la estabilidad de las enzimas xilanasa y exo-PG frente al pH. Para este estudio se utilizaron los tampones que aparecen en la tabla 5.1 en una concentración 0,2 M. Como controles se utilizaron el tampón citrato 0,05M a pH 5,4 para el caso de la xilanasa, y el acetato 0,1M a pH 5 para la exo-PG, que siguieron el mismo tratamiento que las muestras. Se utilizaron estos tampones de referencia debido a que en la bibliografía son comúnmente utilizados para llevar a cabo los test enzimáticos.<sup>351,352,353,354</sup> En general, a estos pH las enzimas en estudio presentan su actividad óptima.

---

<sup>351</sup> Simpson, H.; Haufler, U.; Daniel, R. (1991). An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. *Biochemical Journal*, **277**, 413-417.

<sup>352</sup> Biswas, S.; Jana, S.; Mishra, A.; Nanda, G. (1989). Production, purification and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*. *Biotechnology and Bioengineering*, **35**, 244-251.

<sup>353</sup> Silva, D.; Tokuioshi, K.; da Silva, E.; Da Silva, R.; Gomes, E. (2005). Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry*, **40**, 2885-2889.

<sup>354</sup> Riou, C.; Freyssinet, G.; Fevre, M. (1992). Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and environmental microbiology*, **58**, 578-583.

Tampón	pH
Acetato (0,2M)	3
	4
	5
Citrato (0,2M)	5
	6
	7
Tris (0,2M)	7
	8
	9
Glicina (0,2 M)	9
	10
	11
Control exo-PG: Acetato (0,1M)	5
Control xilanasa: Citrato (0,05M)	5,4

**Tabla 5.1: Tampones utilizados para el estudio de la estabilidad de las enzimas xilanasa y exo-PG a distintos pH.**

Como se observa en la tabla anterior, para los pH de 5, 7 y 9 se utilizaron dos tampones diferentes para estudiar con cuál de ellos se obtienen mejores resultados.

Al igual que se describió en el estudio de estabilidad de las enzimas en presencia de iones metálicos, el tratamiento seguido para las dos enzimas en estudio no fue exactamente el mismo, de ahí que se describan de forma independiente.

a) *Xilanasa*

Para la determinación de la estabilidad de la enzima con el pH, se mezclaron en cada tubo eppendorf 0,25 mL de extracto enzimático con 0,25 mL de la disolución del tampón correspondiente, incubándose la mezcla a 30°C durante 30 minutos.

Transcurrido este tiempo se analizó la actividad de la enzima xilanasa en las distintas soluciones.

b) *Exo-PG*

Como se comentó en el estudio de estabilidad de la exo-PG en presencia de iones metálicos, esta enzima presentaba baja actividad en los extractos obtenidos siendo necesario realizar un paso previo de concentración. Al igual que en el caso anterior se eligió la liofilización para este propósito. Se prepararon 26 tubos pirex de 10 mL (se estudiaron 12 pH distintos más un control, realizándose el estudio por duplicado), a cada uno de los cuales se añadieron 4 mL de extracto enzimático a concentrar. La liofilización transcurrió durante 24 horas, obteniéndose un sólido que se resuspendió en 0,4 mL del tampón correspondiente. La mezcla se incubó a 30°C durante 30 minutos, tiempo tras el cual se determinó la actividad en cada disolución.

*5.3.3.3. Efecto de la temperatura*

El objetivo de este experimento es estudiar la estabilidad de las enzimas xilanasa y exo-PG a distintas temperaturas, a cada una de las cuales se analizó la evolución de las actividades enzimáticas con el tiempo, obteniendo datos suficientes para el cálculo de las constantes de desactivación.

Debido a que estas enzimas se utilizan en distintas aplicaciones (industria alimentaria, del papel, textil, etc.), es interesante estudiar su actividad a temperaturas muy distintas para analizar su comportamiento en cada caso. Entre ellas se escogió 4°C, temperatura habitual para la conservación de los alimentos, 30°C, temperatura ambiente y 70°C, que proporcionará información acerca del comportamiento de las enzimas en condiciones más extremas. Además, se analizó cada enzima a la

temperatura a la que se realizan sus correspondientes test enzimáticos (45°C para la exo-PG y 50°C para la xilanasa).

Para el desarrollo de este experimento, se añadieron 6 mL de extracto enzimático en distintas botellas de vidrio de 20 mL que se incubaron a las temperaturas de estudio. Este procedimiento se siguió para ambas enzimas aunque, como ocurría en los estudios anteriores, fue necesaria la concentración del extracto para el caso de la exo-PG, que se llevó a cabo liofilizando 60 mL de solución y resuspendiendo el sólido formado en 6 mL de tampón acetato 0,1M a pH 5.

Para el cálculo de la constante de desactivación se tomó cada cierto tiempo una alícuota de la botella a la que se le realizó el test enzimático, dejando el resto de la mezcla en incubación a la temperatura correspondiente. Puesto que en el experimento a 4°C se esperaba una desactivación lenta, a esta temperatura se utilizó un tiempo de incubación mayor para disponer de datos suficientes para el cálculo de la constante de desactivación. Con el fin de evitar posibles contaminaciones microbianas se añadió azida sódica al 0,02% a los extractos, que es comúnmente utilizada por distintos autores con esta finalidad.<sup>355</sup> Por el contrario, cuando se incubó la mezcla a 70°C, fue necesaria la medida de la actividad en cortos periodos de tiempo, ya que en estas condiciones se esperaba una desactivación más rápida.

#### **5.3.4. Protocolos empleados en la concentración de las enzimas**

En los capítulos anteriores se describió la obtención de extractos enzimáticos mediante fermentación en estado sólido de orujo de uva y cáscaras de naranja, que presentaban actividad xilanasa y exo-PG. Dichas enzimas tienen aplicación en una

---

<sup>355</sup> Fayyaz, A.; Asbi, B.; Ghazali, H.; Che, Y.; Jinap, S. (1995). Stability studies of papaya pectinesterase. *Food Chemistry*, **53**, 4, 391-396.

gran variedad de procesos industriales, pudiéndose utilizar en muchos de ellos directamente el crudo de fermentación, sin ser necesarias etapas previas de purificación. Sin embargo, resulta de interés que el volumen de extracto enzimático a añadir sea lo menor posible con el fin de no alterar las muestras a tratar. Por este motivo, se van a describir en este capítulo dos métodos sencillos para la concentración de proteínas, que son la precipitación y la liofilización, y que se emplearon en el presente trabajo.

#### *5.3.4.1. Precipitación con distintos agentes químicos*

Este método consiste en la concentración de las proteínas al precipitar estas en presencia de agentes químicos como el sulfato amónico, el etanol o la acetona, resuspendiéndose posteriormente el pellet formado en un menor volumen de disolvente. En cada caso, la cantidad de agente precipitante necesaria para conseguir la precipitación de las proteínas fue diferente, mostrándose las distintas relaciones utilizadas en la tabla 5.2. Además, para cada agente se evaluaron dos temperaturas, para comprobar con cuál de ellas el proceso presentaba un mayor rendimiento. Como ya se comentó en la introducción, debido a que los disolventes orgánicos pueden producir la desnaturalización de las proteínas, es conveniente llevar a cabo el proceso de precipitación a bajas temperaturas; así se trabajó a  $-20^{\circ}\text{C}$  y a  $4^{\circ}\text{C}$  en el caso del etanol y la acetona. En lo que se refiere al sulfato amónico, se preparó una disolución saturada del mismo estudiándose su efecto a  $4^{\circ}\text{C}$  y a temperatura ambiente.

Agente precipitante	Temperatura	Relación volumétrica agente precipitante/ extracto enzimático
Sulfato amónico	4°C Ambiente	0,5/1
Etanol	-20°C 4°C	2/1
Acetona	-20°C 4°C	6/1

**Tabla 5.2: Condiciones utilizadas para la precipitación de las proteínas.<sup>356</sup>**

El proceso se llevó a cabo en tubos de centrifuga de 100 mL, a cada uno de los cuales se añadieron 18 mL de extracto y el correspondiente volumen de agente precipitante. Ambos se mezclaron suavemente incubándose la mezcla durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras a 11000 rpm y a 4°C durante 30 minutos, observándose la formación de un precipitado blanco en el fondo. Con la ayuda de una micropipeta, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente, resuspendiéndose posteriormente con 0,9 mL de tampón acetato 0,1M a pH 5.

#### 5.3.4.2. Fraccionamiento de tres fases

Adicionalmente, se utilizó otro método de concentración de enzimas por precipitación que se conoce como fraccionamiento de tres fases, en el cual el precipitado aparece entre una fase acuosa y una orgánica.<sup>357</sup> Este procedimiento consiste en la adición de sulfato amónico y *terc*-butanol al extracto enzimático, de

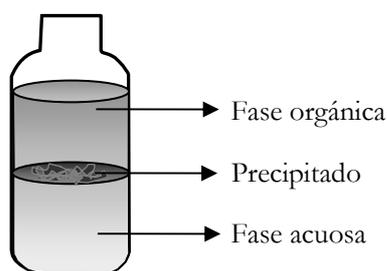
<sup>356</sup> Bollag, D.; Rozycki, M.; Edelstein, S. (1996). Protein Methods. Second Edition. John Wiley & sons Ltd., New York, 83-106.

<sup>357</sup> Dogan, N.; Tari, C. (2008). Characterization of three phase partitioned exo-polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. *Biochemical Engineering Journal*, **39**, 1, 43-50.

forma que el primero provoca la precipitación de las proteínas, mientras que el segundo, al ser parcialmente soluble en agua, la retira en cierta medida del medio concentrando aún más las proteínas. En consecuencia, se forman dos fases: una orgánica constituida por el *terc*-butanol y una acuosa constituida por el agua del extracto, situándose entre ambas la proteína precipitada.

Para llevar a cabo este experimento se utilizó una proporción 1:1 de extracto enzimático y *terc*-butanol y una concentración de sulfato amónico del 30% (p/V) (condiciones óptimas para la precipitación de la *exo*-PG).<sup>357</sup>

El procedimiento se realizó en tubos de centrifuga de 100 mL, a cada uno de los cuales se adicionaron 18 mL de extracto enzimático, 5,4 g de sulfato amónico y 18 mL de *terc*-butanol, que fueron mezclados suavemente e incubados a temperatura ambiente durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se observó la aparición de las dos fases y una película de sólido entre ambas.



**Figura 5.1: Esquema del fraccionamiento de tres fases.**

Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 4°C y 11000 rpm durante 5 minutos para mejorar la separación de las tres fases. Se eliminó la superior (orgánica) con ayuda de una pipeta pasteur, recogiendo el sólido precipitado que se resuspendió en 0,9 mL de buffer acetato 0,1M a pH 5. Finalmente se determinaron las actividades de las enzimas xilanas y *exo*-PG en la suspensión obtenida.

#### 5.3.4.3. Liofilización

Como se describió en la introducción, este método se basa en la eliminación del agua presente en una sustancia, con previa congelación de la misma al aplicar un alto vacío que provoca su paso directo del estado sólido al estado gaseoso.<sup>358</sup> Tras este proceso, se obtiene un sólido que se resuspende en un volumen mínimo de disolvente, consiguiendo así un extracto enzimático más concentrado.

Para poder comparar con los otros métodos de concentración utilizados, se partió del mismo volumen de extracto y se disolvió el sólido formado en cada caso en la misma cantidad de disolvente. De esta forma, se repartieron los 18 mL de extracto en tres tubos pirex de 10 mL, que se congelaron a -20°C y se introdujeron en un liofilizador durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se obtuvo un sólido en el fondo del tubo que se resuspendió en 0,9 mL de tampón acetato 0,1M a pH 5. A esta suspensión se le determinó la actividad xilanasa y exo-PG.

Se compararon las actividades xilanasa y exo-PG de los distintos concentrados enzimáticos obtenidos, bien por precipitación o por liofilización, y se analizaron las proteínas presentes en los mismos mediante electroforesis discontinua SDS-PAGE.

#### 5.3.5. Ensayos de aplicabilidad del extracto enzimático concentrado en la clarificación de mostos

El extracto enzimático concentrado, obtenido tras la precipitación con etanol a -20°C se utilizó para estudiar la aplicabilidad de los crudos de FES en la clarificación de mostos de uva blanca. Se empleó este método para la concentración del extracto

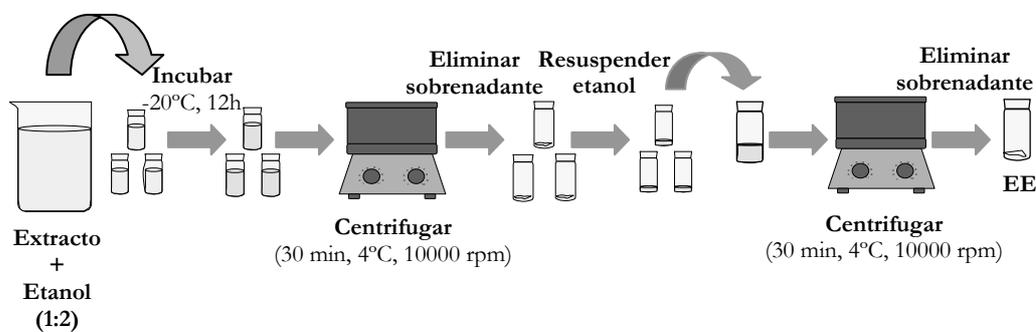
---

<sup>358</sup> John, W. (1988). Lyophilization: Freeze drying a downstream process. *Downstream Processes: Equipment and Techniques*, 315-351.

enzimático ya que, como se detallará en el apartado de Discusión de resultados, proporcionó la mayor actividad exo-PG, principal enzima que participa en el proceso de clarificación.

Para obtener la cantidad de concentrado enzimático suficiente para estos ensayos, en un vaso de precipitados de 1 L se añadieron 364 mL de extracto y el doble volumen de etanol. Se homogeneizó la solución con ayuda de una varilla y se repartieron 70 mL de la mezcla en tubos de centrifuga de 100 mL, que fueron incubados a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se observó la turbidez de la solución como consecuencia de la precipitación de las proteínas.

Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, retirando el sobrenadante. Los precipitados formados se disolvieron en la mínima cantidad de etanol y se vertieron a un único tubo, que se centrifugó en las mismas condiciones, retirando el sobrenadante y conservando el precipitado. Este concentrado enzimático, que por comodidad se denominará EE, se empleó en la clarificación de los mostos.



**Figura 5.2:** Esquema del proceso de obtención del concentrado enzimático EE.

La eficacia de clarificación del concentrado EE se evaluó comparándola con la de los crudos enzimáticos comerciales siguientes:

- *EC*: Producto de la casa comercial Agrovin (*Enovin Clar*) que hidroliza de manera selectiva las uniones entre las sustancias pépticas que están presentes en la lámina media y la pared de las células del hollejo, disminuyendo la viscosidad del mosto y facilitando la clarificación y el desfangado de mostos blancos y rosados. La adición de EC acelera la clarificación del mosto, debido a la rápida disminución de su turbidez. Combina las diversas actividades pectinolíticas: pectinlisa, poligalacturonasa y pectinestera.
- *EV*: Preparación enzimática de la casa comercial Agrovin (*Enozym Vintage*) diseñada para la extracción y estabilidad de compuestos polifenólicos durante la fase de maceración fermentativa en uva tinta. Permite la maceración eficiente de las uvas de variedades tintas ayudando a la extracción equilibrada de antocianos y taninos. La casa comercial asegura que con este preparado el tiempo de maceración puede reducirse en un 25%.

EV contiene una proporción equilibrada de actividades enzimáticas pectinolíticas: pectinlisa, poligalacturonasa y pectinesterasa. Además, cuenta con las actividades secundarias celulasa y hemicelulasa que actúan sobre las paredes de las células vegetales del hollejo. También dispone de actividad  $\beta$ -glucanasa y proteasa.

Los dos preparados anteriores se obtienen a partir de cultivos específicos, sobre medios naturales, del hongo filamentoso *Aspergillus niger* no modificado genéticamente. Las enzimas son extraídas con agua, purificadas, concentradas y estandarizadas.

Para el estudio de clarificación se añadieron 450 mL de mosto fresco de uva blanca de la variedad *Palomino Fino* a probetas de 500 mL. Posteriormente, se disolvieron 10 mg de concentrado enzimático (EE, EC y EV) en 50 mL de mosto, que se adicionaron a la probeta hasta completar los 500 mL. La solución se agitó vigorosamente con ayuda de una varilla y se incubó a 25°C en estático. Se tomaron muestras a media altura de la probeta tras 19 y 40 h de incubación y se midió su turbidez con un turbidímetro 2100AN (Hach), que proporcionaba los resultados en NTU (Unidades de turbidez nefelométricas).

Como control se utilizó una probeta que contenía 500 mL de mosto al cual no se le habían adicionado enzimas.

### 5.3.6. Análisis de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis discontinua SDS-PAGE consiste en la migración de las proteínas en función de su tamaño por la aplicación de un campo eléctrico. Este proceso se llevó a cabo utilizando la metodología descrita por Laemmli,<sup>359</sup> que utiliza geles discontinuos de poliacrilamida constituidos por dos fases, una separadora y una concentradora.

Se utilizó gel separador al 15%, constituido por 6,25 mL de tampón de separación (45,4 g de Tris base a pH 8,8, 1 g de SDS y 500 mL de agua destilada), 6,2 mL de acrilamida (30%), 37,5 mL de TEMED (Tetrametiletilenodiamina) (10%) y 75 µl de APS (Persulfato amónico) (12,5%).

---

<sup>359</sup> Laemmli, U. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of 19 bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

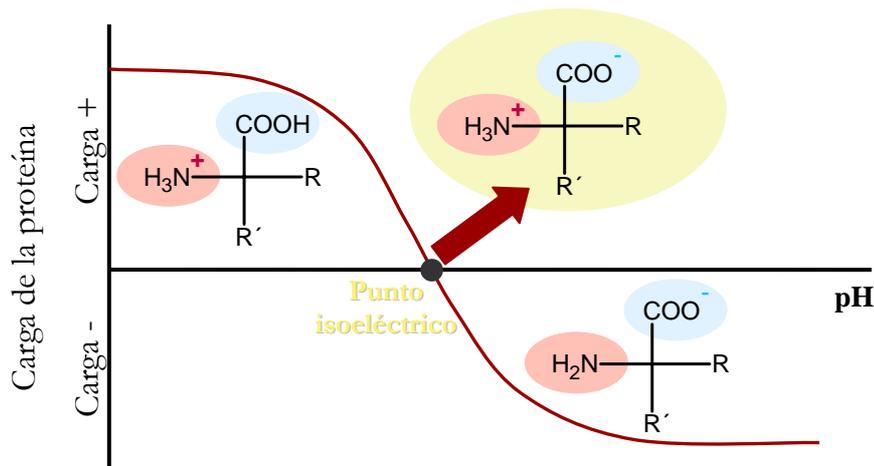
El gel concentrador se componía de tampón concentrador (151,5 g de Tris base a pH 6,8, 1 g de SDS y 500 mL de agua destilada), 1 mL de acrilamida (30%), 1,5 mL de agua destilada, 25  $\mu$ l de TEMED (10%) y 25  $\mu$ l de APS (12,5%).

Para poder visualizar las bandas de proteínas obtenidas, se tiñeron con azul de Coomassie R250 durante dos horas y se destiñó el gel con una solución de metanol-agua que contenía un 9% de ácido acético. El peso molecular de las bandas de proteínas se identificó por comparación con marcadores de peso molecular estándar.

### **5.3.7. Metodología de purificación de las enzimas por cromatografía de intercambio iónico**

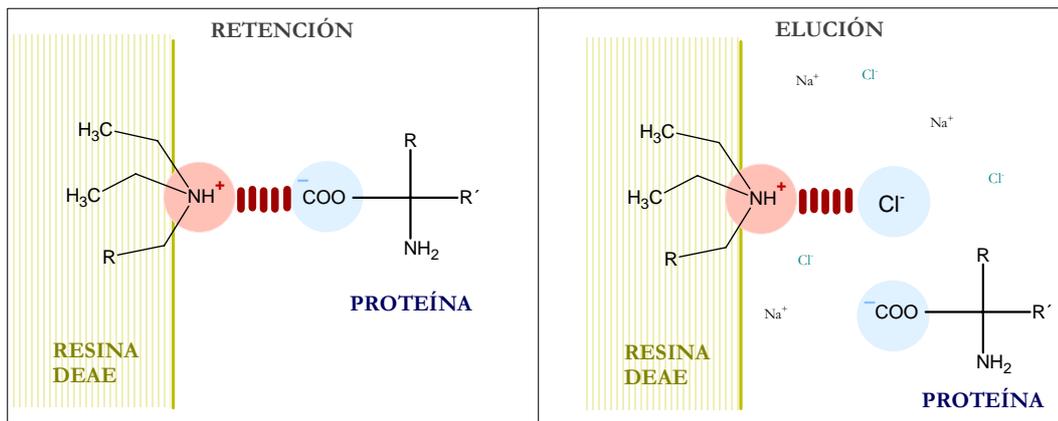
Como ya se comentó en la introducción de este capítulo, la cromatografía de intercambio iónico permite separar las proteínas en base a la distinta carga que presentan en función del pH al que son expuestas. Como bien es sabido, las proteínas contienen grupos ionizables que están cargados positiva o negativamente en función del pH del medio, de forma que cuando es inferior al punto isoelectrico de la proteína, su carga neta es positiva mientras que cuando es superior, la carga neta es negativa. Cuando el pH del medio coincide con el punto isoelectrico de la proteína, esta presenta una carga neta cero.

En la figura 5.3 se muestra un esquema de los distintos estados en los que se encuentra una proteína general sencilla en función del pH del medio.



**Figura 5.3:** Esquema sencillo de los distintos estados en los que se encuentra una proteína genérica en función del pH del medio.

Para llevar a cabo la purificación de las enzimas en estudio se utilizó la cromatografía de intercambio iónico, empleando una matriz de dietil aminoetil celulosa (DEAE). Esta sustancia actúa como un intercambiador aniónico debido a que presenta grupos dietil-aminoetil  $[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2]$  que están cargados positivamente. De esta forma, se retienen aquellas proteínas que están cargadas negativamente, mientras que las que presentan cargas positiva o nula, no interaccionan con la DEAE. La elución de las proteínas fijadas se consigue con el cambio del pH y/o incrementando la concentración iónica. En este caso concreto, se realizó mediante la adición de disoluciones con concentración creciente de NaCl (50, 150, 250 y 500 mM), eluyéndose en primer lugar las proteínas menos afines a la resina, intercambiándose por los iones  $\text{Cl}^-$  tal y como se describe en la figura 5.4.



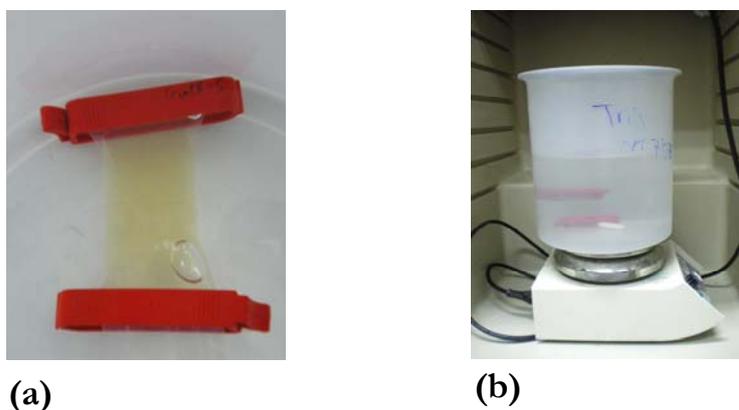
**Figura 5.4:** Proceso que ocurre en la superficie de la resina DEAE.

Para lograr la purificación de las proteínas objeto de estudio, se utilizó una metodología que consistía en dializar previamente el crudo de fermentación, para después ser purificado mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando la resina DEAE.

Con la secuencia de procesos propuesta se consigue lo siguiente:

- Introducir en la resina de intercambio iónico una muestra con un menor contenido salino. Las sales presentes en los extractos podrían presentar más afinidad por la resina que las enzimas en estudio, haciendo que el proceso de purificación fuera menos efectivo.
- Disponer del mismo pH en el extracto, en los tampones de elución y de acondicionamiento de la resina, lo que impediría que esta sufriera un cambio brusco en esas condiciones tras el paso de la muestra. Debido a que en un experimento previo se utilizó tampón acetato a pH 5 y no se consiguió la retención de las enzimas en estudio, se utilizó un pH mayor, concretamente Tris-HCl 50 mM a pH 7.

Para el desarrollo de esta metodología, se utilizaron 20 mL de extracto de fermentación que se conservaba a  $-20^{\circ}\text{C}$  y que fue descongelado lentamente durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 11000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos para eliminar posibles partículas que hubieran precipitado por la congelación de la muestra. Con ayuda de una micropipeta se introdujo en una membrana de diálisis, la cual se sumergió en un vaso de precipitados que contenía 3 L del tampón. La diálisis transcurrió durante 3 horas con agitación suave y a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  para evitar la desnaturalización de las proteínas.



**Figura 5.5:** Extracto en el interior de la membrana de diálisis (a) y dispositivo utilizado para llevar a cabo la diálisis (b).

Una vez finalizada la diálisis se centrifugó el extracto a 10000 rpm, durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  para eliminar posibles sustancias precipitadas que podrían interferir en la etapa de purificación.

Para el proceso de purificación fue necesario equilibrar previamente la resina. En un vaso de precipitados se añadió a 20 mL de tampón (Tris-HCl a pH 7) una cantidad de resina en exceso, dejando la mezcla en contacto durante tres horas. Transcurrido este tiempo, se vertió la suspensión a una columna de vidrio hasta disponer de aproximadamente 2 mL de resina compactada, sobre la cual se hicieron pasar unos 5

mL de tampón Tris para asegurar su estabilidad. Posteriormente se adicionó la muestra a la columna, que se selló por ambos lados y se colocó en una noria en agitación durante 30 minutos. En este tiempo se produce la interacción de los restos positivos de la resina con los restos negativos de aquellas proteínas que, en estas condiciones de pH, se encontraban por encima de su punto isoeléctrico. Esta etapa de agitación permitía disponer de una distribución homogénea del extracto en la resina que se observa en el detalle de la figura 5.6 b.



(a)



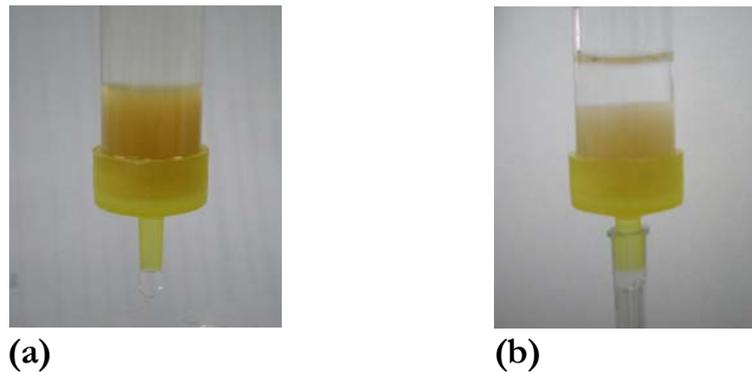
(b)

**Figura 5.6:** *Dispositivo utilizado para la agitación de la columna (a) y primer plano de la misma (b).*

Una vez finalizados los 30 minutos de agitación se colocó la columna en posición vertical para conseguir la compactación de la resina. Tras la observación de las dos fases diferenciadas se recogió lo que se denominó “fracción no retenida”, que contenía aquellas proteínas que no se habían unido a la resina.

Posteriormente se adicionaron 15 mL de tampón de diálisis Tris-HCl (50 mM a pH 7) recogiendo lo que se denominó “lavado”, que contenía aquellas sustancias que se habían unido a la resina de forma inespecífica y que se separaban con el simple paso del tampón.

Finalmente, se eluyó la columna con los tampones en concentración creciente de NaCl (50, 150, 250 y 500 mM), recogiendo 10 fracciones de 0,750 mL para cada una (“eluido”), que se iban colocando en un baño de hielo para su posterior análisis. Tras este paso, se observó la disminución de intensidad de color de la resina como consecuencia de la eliminación de compuestos coloreados retenidos por la misma y entre los cuales podrían encontrarse algunas proteínas (figura 5.7).



*Figura 5.7: Aspecto que presentaba la resina antes (a) y después (b) de ser eluida con NaCl.*

### 5.3.8. Estudio de la pureza de crudos enzimáticos comerciales

En el apartado anterior se ha descrito una metodología para la purificación de los extractos enzimáticos obtenidos mediante FES. Con el fin de evaluar el grado de purificación conseguido, se comparó con el que presentan extractos comerciales empleados en el tratamiento de zumos y mostos. Los concentrados enzimáticos estudiados en este apartado fueron:

- Enzimas comerciales:
  - *Xilanasa comercial*: Xilanasa de *Thermomyces lanuginosus* expresada en *Aspergillus oryzae* (Sigma).

- *Exo-PG comercial*: Pectinasa de *Aspergillus niger* (Fluka).
- Crudos enzimáticos comerciales: Contienen una mezcla de enzimas diferentes, no especificadas, y que se utilizan en distintas etapas del proceso de elaboración del vino.
  - *RA*: Preparación enzimática de la casa comercial DMS (Rapidase AR 2000) que contiene pectinasas con actividades secundarias glicosidasas. Su utilización permite optimizar el proceso natural que transforma los precursores de aromas glicosilados inodoros en aromas libres en el vino.

Este preparado enzimático se obtiene de cepas clásicas de *Aspergillus niger* (no modificadas genéticamente).

- *NC*: Preparación enzimática de la casa comercial Novo Nordisk (Novoclairzym) utilizada para la decantación de los zumos.
- *NF*: Preparación enzimática de la casa comercial Novo Nordisk (Novoferm) constituida por enzimas pectolíticas de *Aspergillus niger* que además presentan actividad  $\beta$ -glucosidasa.
- *VF*: Preparación enzimática de la casa comercial Novo Nordisk (Vinoflow) utilizada para promover la degradación de sustancias pécticas y la hidrólisis de  $\beta$ -glucanos.

Debido a que tanto las enzimas comerciales como los crudos enzimáticos utilizados se presentaban en forma de polvo, se prepararon disoluciones de 1mg/mL de cada

uno de ellos en tampón acetato 0,1M a pH 5. Dado que en las fichas técnicas de estos concentrados no aparecían claramente definidas ni las enzimas ni sus actividades, se determinaron las actividades específicas (UA/mg) de la xilanasas y la exo-PG. Estos valores permitieron comparar la pureza de los extractos parcialmente purificados con la de los concentrados enzimáticos comerciales.



## 5.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este apartado se muestran los resultados obtenidos del estudio de estabilidad de las enzimas xilanasa y exo-PG en presencia de distintos cationes, frente al pH y la temperatura. Los valores obtenidos en este último experimento se utilizaron para el cálculo de las constantes de desactivación a cada una de las temperaturas estudiadas. Posteriormente, se analizarán los resultados conseguidos tras la concentración de los extractos enzimáticos, por precipitación o por liofilización, indicando cuál de ellos fue el más eficaz para cada enzima. Asimismo, se presentan los resultados obtenidos en la aplicación del extracto enzimático concentrado en la clarificación de mostos. Finalmente, se evaluarán los resultados obtenidos tras el desarrollo del método de purificación, comparando la pureza del extracto purificado con la de preparados enzimáticos comerciales.

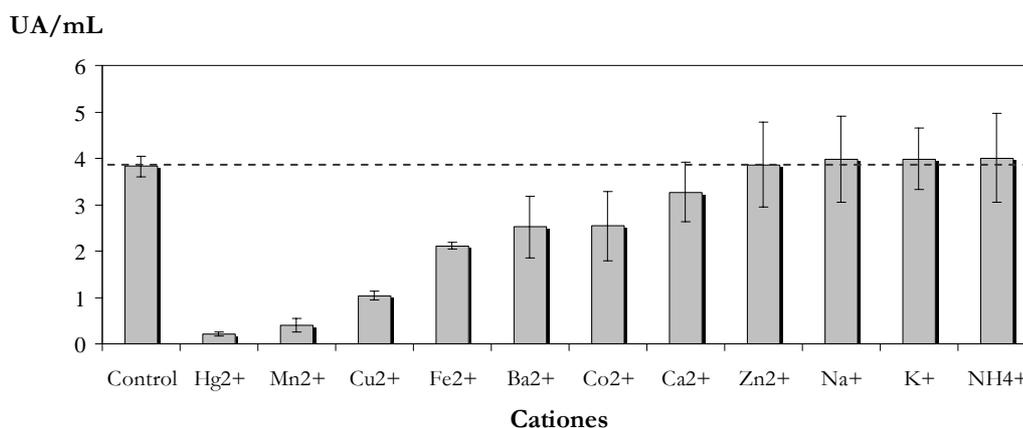
### 5.4.1. Caracterización de las enzimas xilanasa y exo-PG

Todos los experimentos que se presentan a continuación se realizaron por duplicado, por lo que se indica el valor medio y el límite de confianza para una probabilidad del 95%.

#### *5.4.1.1. Estudio de la estabilidad frente a distintos cationes*

En este apartado se va a evaluar la influencia de cationes, principalmente metálicos, sobre la actividad de las enzimas en estudio.

En la figura 5.8 se muestra la actividad xilanasa medida en el extracto de referencia (que contenía agua destilada en lugar de la disolución de ion) y en los extractos expuestos a las distintas soluciones de cationes.



**Figura 5.8:** Efecto de distintos cationes sobre la actividad xilanasas.

Como se observa en la figura 5.8, entre los distintos iones estudiados  $Zn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $NH_4^+$  prácticamente no modifican la actividad de la enzima xilanasas.

Los iones  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  y  $Fe^{2+}$  disminuyen la actividad de la enzima. Sin embargo, la inhibición más importante se produce en presencia del  $Mn^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , con los cuales la actividad del control se reduce en un 90% y 73% respectivamente, y sobre todo, con el  $Hg^{2+}$ , con el cual la actividad disminuye un 94%. En la bibliografía se describe que esta inhibición podría deberse a que este tipo de iones reaccionan con los grupos sulfhidrilos de la enzima. Según esta hipótesis los resultados sugerirían la posible existencia de un residuo importante de cisteína en el centro activo de la enzima o cerca del mismo.<sup>360,361</sup>

<sup>360</sup> Heck, J.; de Barros, S.; Hertz, P.; Záchia, M. (2006). Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, **32**, 3, 179-184.

<sup>361</sup> Chivero, E.; Mutukumira, A.; Zvauya, R. (2001). Partial purification and characterisation of a xylanase enzyme produced by a micro-organism isolated from selected indigenous fruits of Zimbabwe. *Food Chemistry*, **72**, 179-185.

Como ejemplo de esta inhibición se pueden citar los resultados obtenidos por Düsterhöft y col. tras estudiar la estabilidad, en presencia de diferentes iones, de dos enzimas xilanasas producidas por el hongo termofílico *Humicola insolens*, que fueron aisladas a partir de un preparado comercial.<sup>362</sup> Ambas enzimas se inhibieron en presencia de los iones  $Mn^{2+}$  y  $Hg^{2+}$  a una concentración de 1 mM, siendo el último de ellos el que causó el efecto más importante, reduciendo la actividad de las dos enzimas 1,96 y 6,66 veces, respectivamente. Otro de los iones estudiados por dichos autores fue el  $Zn^{2+}$ , el cual sólo alteró a una de las xilanasas, disminuyendo su actividad en un 19% respecto al control. Estos resultados no coincidían con los obtenidos en el presente trabajo, en el que el ion  $Zn^{2+}$  no modificó la actividad de la xilanasas.

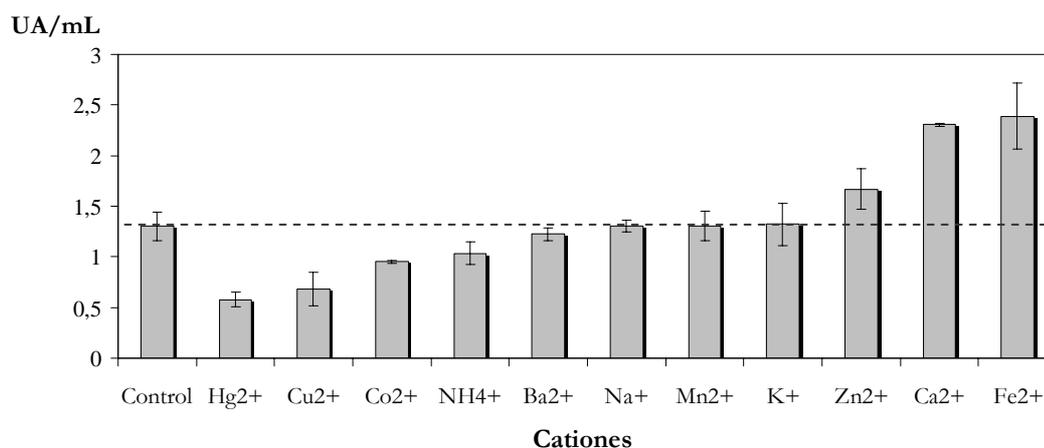
En la figura 5.8 también se observa que el ion  $Cu^{2+}$  inhibe la actividad de la enzima, aunque en menor medida que el  $Hg^{2+}$  y el  $Mn^{2+}$ . Este efecto se ha detectado en xilanasas purificadas por otros autores, como la producida por nuevas cepas de *Burkholderia*.<sup>328</sup> En este caso se incubaron los extractos junto al ion en una concentración 10 mM durante 30 min, reduciéndose la actividad en un 76%. Se conoce que los iones  $Cu^{2+}$  catalizan la auto-oxidación de cisteínas provocando la formación de puentes disulfuro dentro y entre moléculas, o incluso la formación de ácido, lo cual podría afectar a su actividad.<sup>328</sup>

En general, y en virtud de los resultados obtenidos, la enzima xilanasas caracterizada en este trabajo resultó ser bastante estable en presencia de cationes.

En la figura 5.9 se reflejan los resultados de actividad obtenidos para la enzima exo-PG.

---

<sup>362</sup> Düsterhöft, E.; Linssen, V.; Voragen, A.; Beldman, G. (1997). Purification, characterization, and properties of two xylanases from *Humicola insolens*. *Enzyme and Microbial Technology*, **20**, 6, 437-445.



**Figura 5.9: Efecto de distintos cationes sobre la actividad exo-PG.**

Se observa un aumento de actividad para los iones  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Fe^{2+}$ , incrementándose la actividad respecto del control en un 28%, 77% y 83%, respectivamente. Este efecto podría deberse a la unión de estos iones a la enzima, provocando un cambio conformacional en la misma, lo que conllevaría al aumento de su actividad.

Los iones  $Ba^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Mn^{2+}$  y  $K^+$  prácticamente no alteran la actividad de la enzima exo-PG.

En la parte izquierda de la figura 5.9 aparecen aquellos iones que inhiben a la enzima exo-PG, siendo el  $Hg^{2+}$  el que causa el efecto más importante, disminuyendo la actividad 2,25 veces la del control. El  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $NH_4^+$  también reducen la actividad en un 48%, 27% y 20%, respectivamente.

En la bibliografía se reporta que los iones  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  bloquean los grupos tiol de las proteínas.<sup>363</sup> Además, el  $\text{Cu}^{2+}$  induce la polimerización de las proteínas mediante la formación de puentes His-Cu-His entre cadenas peptídicas adyacentes y puede interferir en la estructura de algunas proteínas a través de su geometría de coordinación.

A la vista de los resultados obtenidos, podría concluirse que la enzima exo-PG descrita en este trabajo es bastante estable en presencia de cationes, observándose fenómenos de desactivación en muy pocos casos.

En la bibliografía se describe el comportamiento frente a distintos iones de otras pectinasas aisladas de hongos, como es el caso de la descrita por Celestino y col., que fue purificada de cultivos sumergidos del hongo termofílico *Acrophialophora nainiana*. Dicha enzima presentaba inhibición por una gran cantidad de cationes como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , en una concentración 12,5 mM.<sup>321</sup> Otro ejemplo a citar es el de las poligalacturonasas producidas por *Sporotrichum thermophile* y especies del género *Bacillus*, cuyas actividades se estimulaban en presencia de iones  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ , mientras que se inhibían cuando se ponían en contacto con iones  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .<sup>321,364,365</sup>

#### 5.4.1.2. Estudio de la estabilidad frente a distintos pH

En la introducción se mencionó la necesidad de conocer el rango de pH fuera del cual las enzimas no son activas, antes de ser aplicadas sobre una matriz concreta. No

---

<sup>363</sup> Silva, D.; Silva, E.; Simões, R.; Da Silva, R.; Ferreira, V.; Gomes, E. (2007). Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **42**, 8, 1237-1243.

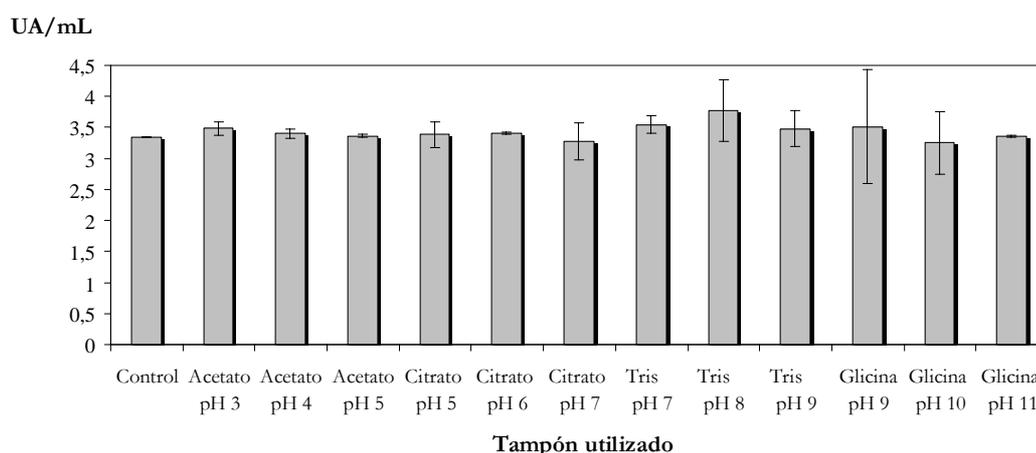
<sup>364</sup> Kobayashi, T.; Higaki, N.; Suzumatsu, A.; Sawada, K.; Hagihara, H.; Kawai, S.; Ito, S. (2001). Purification and properties of a high molecular-weight, alkaline exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **29**, 70-75.

<sup>365</sup> Kaur, G.; Kumar, S.; Satyanarayana, T. (2004). Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. *Bioresource Technology*, **94**, 239-243.

sólo es necesario que la enzima actúe sobre un determinado sustrato, sino que además tiene que encontrarse activa en las condiciones de pH necesarias para llevar a cabo el proceso en el que interviene.

Para llevar a cabo el estudio de estabilidad frente al pH se emplearon los tampones acetato (para los pH de 3, 4 y 5), citrato (para los pH de 5, 6 y 7), Tris (para los pH de 7, 8 y 9) y glicina (para los pH de 9, 10 y 11), utilizándose dos diferentes para los pH de 5, 7 y 9 para ver con cual de ellos se obtenían los mejores resultados (ver apartado 5.3.3.2 de Material y métodos).

En la figura 5.10 se muestran los resultados obtenidos para la enzima xilanasa, expresados en UA/mL.



**Figura 5.10: Efecto del pH sobre la actividad de la enzima xilanasa.**

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la enzima xilanasa es bastante estable en un rango de pH comprendido entre 3 y 9, manteniendo su actividad relativa entre los valores  $3,38 \pm 0,20$  y  $3,78 \pm 0,50$  UA/mL. Sin embargo, a pH 10 se observa una ligera disminución, alcanzando el mínimo con un valor de  $3,25 \pm 0,51$  UA/mL (3% inferior al valor medido en el control).

Como se pone de manifiesto en la figura 5.10, a pH 5 no hay una diferencia significativa entre utilizar tampón acetato o citrato, ya que la actividad de la enzima analizada es prácticamente la misma. Esta diferencia tampoco es importante a pH 9, donde la actividad determinada con tampón Tris es de  $3,48 \pm 0,29$  UA/mL y con glicina de  $3,51 \pm 0,92$  UA/mL. A pH 7 la actividad con tampón Tris es un 8% superior a la analizada con tampón citrato frente al mismo pH.

En cuanto a las características respecto al pH que presentan otras xilanasas descritas en la bibliografía, hay que señalar que generalmente son activas a pH ácidos y neutros, sin embargo se inhiben a pH altos.<sup>366,367</sup> Como ejemplo se puede citar la xilanasa aislada de *Penicillium capsulatum* por Ryan y col., que a la temperatura de 50°C únicamente era activa a pH ácido, presentando inhibición a partir de pH 5.<sup>366</sup> A diferencia de estos resultados de la literatura, la xilanasa descrita en este trabajo exhibía una gran estabilidad hasta pH 10, presentando potencialmente una gran aplicabilidad en procesos en los que se precisen altos pH.

En la bibliografía también se detallan enzimas que pertenecen a este grupo y que han mostrado ser activas a pH básicos; este es el caso de las cuatro xilanasas aisladas y purificadas por Wang y col., que se obtuvieron tras la fermentación de salvado de arroz utilizando *Streptomyces actuosus* A-151.<sup>368</sup> Aunque estas enzimas presentaban su óptima actividad a pH bajos, continuaron siendo activas en condiciones básicas, manteniendo el 80% de su actividad en un amplio rango de pH. Sin embargo a pH 10, en tres de ellas se redujo la actividad entre un 70 y un 80% tras ser incubadas

---

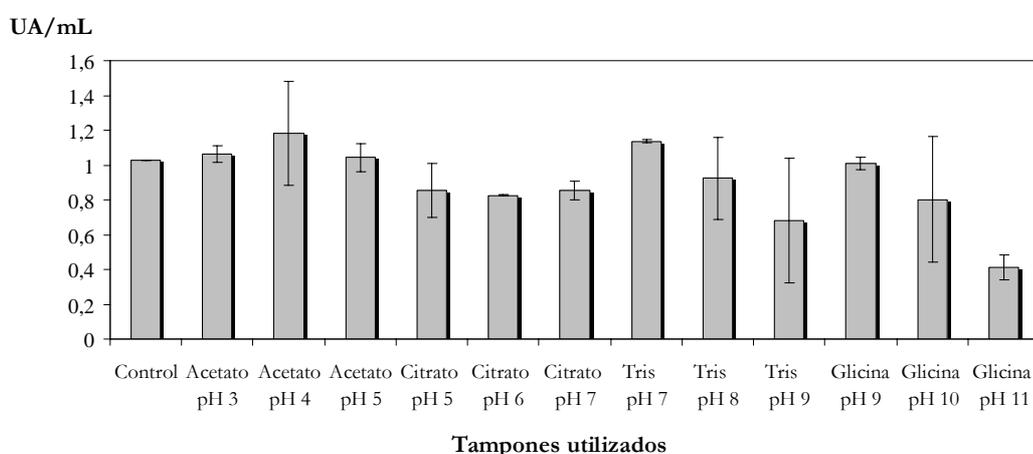
<sup>366</sup> Ryan, S.; Nolan, K.; Thompson, R.; Gubitz, G.; Savage, A.; Tuohy, M. (2003). Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**, 775–785.

<sup>367</sup> Turkiewicz, M.; Kalinowska, H.; Zielinska, M.; Bielecki, S. (2000). Purification and characterization of two endo-1,4- $\beta$ -xylanases from Antarctic krill, *Euphausia superba* Dana. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **127**, 3, 325-335.

<sup>368</sup> Wang, S.; Yen, Y.; Shih, I.; Chang, A.; Chang, W.; Wu, W.; Chai, Y. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**, 7, 917-925.

durante 30 minutos a 37°C, mientras que la otra se mantenía activa al 50% en estas condiciones.

Para el estudio de estabilidad frente al pH de la exo-PG se utilizaron los mismos tampones que se describieron para la xilanasa. De igual manera, se emplearon dos tampones diferentes para los pH de 5, 7 y 9, determinando con cual de ellos la enzima presentaba mayor actividad. En la figura 5.11 se muestran los resultados obtenidos expresados en UA/mL.



**Figura 5.11: Efecto del pH sobre la actividad de la enzima exo-PG.**

Las máximas actividades exo-PG analizadas en este trabajo se miden con tampón acetato a pH 4 ( $1,18 \pm 0,30$  UA/mL) y a pH 7 con Tris ( $1,14 \pm 0,01$  UA/mL).

Los valores más bajos se obtienen a pH 11; sin embargo, en estas condiciones la enzima aun conserva una actividad residual del 40%.

Como se observa en la figura 5.11, para la exo-PG hay una diferencia significativa entre los resultados obtenidos para los dos tampones distintos utilizados a los pH de 5, 7 y 9. Así, la actividad a pH 5 es de  $1,04 \pm 0,08$  UA/mL con tampón acetato,

mientras que con citrato tiene un valor de  $0,85 \pm 0,16$  UA/mL. En cuanto a pH 7, con Tris se obtiene una actividad que es un 33% superior a la obtenida con tampón citrato. La diferencia más importante es la analizada para los dos tampones utilizados a pH 9, de forma que con tampón Tris la actividad tiene un valor de  $0,68 \pm 0,36$  UA/mL, mientras que con glicina es de  $1,01 \pm 0,04$  UA/mL.

En la literatura también se han encontrado exo-poligalacturonasas que han mostrado ser activas en un amplio rango de pH, como es el caso de la producida por *Bacillus KSM-P576*.<sup>364</sup> Para el estudio de estabilidad de esta enzima, se incubó durante 1 hora a 30°C en presencia de diferentes tampones a una concentración 50 mM, con pH comprendidos entre 4 y 12,7. La enzima presentó una alta estabilidad en el rango de pH estudiado, a excepción de los pH de 4 y 12,7, en los que se produjo una disminución de la actividad en un 60 y un 10% respectivamente. Otro ejemplo a citar es la exo-poligalacturonasa producida por el hongo *Fusarium oxysporum*, que en presencia de fosfato potásico 100 mM en un rango de pH comprendido entre 3,5 y 9, mantuvo su actividad entre el 70 y el 100%.

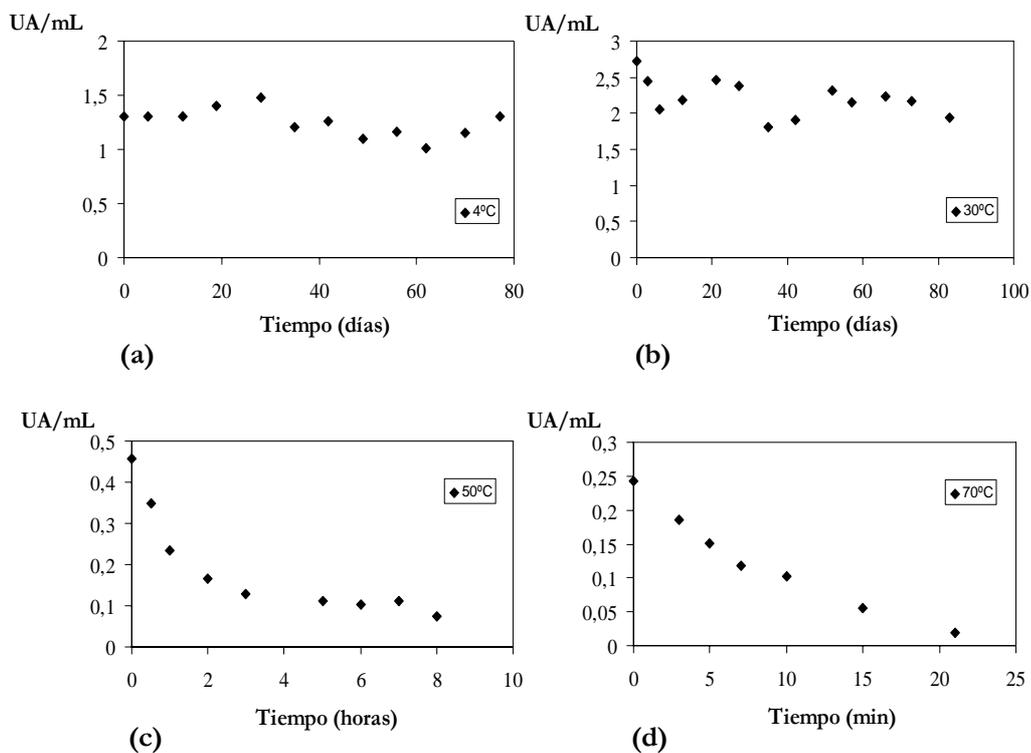
#### 5.4.1.3. Estudio de la estabilidad con la temperatura. Cálculo de las constantes cinéticas de desactivación enzimática

En la introducción se describió cómo la mayoría de las enzimas xilanasas y exo-PG que proceden de la fermentación de hongos y bacterias generalmente son activas (o prácticamente activas) a temperaturas mesofílicas. Sin embargo, estas enzimas se aplican en procesos en los que se requiere que sean resistentes a temperaturas más extremas. Por este motivo, en el presente apartado se llevará a cabo el estudio de estabilidad de las enzimas xilanasas y exo-PG con la temperatura, eligiéndose 4°C (temperatura habitual para la conservación de las enzimas), 30°C (temperatura ambiente) y 70°C (que proporcionará información acerca del comportamiento de las enzimas en condiciones de alta temperatura). Además, se analizó cada una de ellas a

las temperaturas a las que transcurren sus test enzimáticos que son 45°C, para la exo-PG, y 50°C para la xilanasa (ver apartado 5.3.3.3 de Material y métodos).

El análisis de la actividad enzimática con el tiempo proporcionó los datos necesarios para la determinación de las constantes de desactivación.

En la figura 5.12 se muestra, para cada una de las temperaturas de incubación estudiadas, la evolución seguida por la actividad de la enzima xilanasa, expresada en UA/mL, con respecto al tiempo. Obsérvese que las escalas utilizadas en cada experimento, tanto de actividad como de tiempo, son diferentes.



**Figura 5.12: Evolución de la actividad de la enzima xilanasa a distintas temperaturas: 4°C (a), 30°C (b), 50°C (c) y 70°C (d).**

A las temperaturas de 4 y 30°C se observa que la xilanasa mantiene prácticamente su actividad inicial en el tiempo estudiado (80 días), lo cual indica que en estas condiciones la enzima es bastante estable. Con respecto a la temperatura de 50°C, se contempla una desactivación más rápida, aunque tras 7 horas de incubación aún conserva una actividad residual del 24,7%. Como cabría esperar, a la temperatura de 70°C la velocidad de desactivación de la enzima es la más alta, reduciéndose la actividad inicial en un 92,4% en tan sólo 21 minutos.

En la bibliografía se describe el estudio de estabilidad frente a la temperatura de una xilanasa producida por *Penicillium capsulatum*, que mantenía su actividad inicial tras incubarse a 30°C (pH 5) durante dos semanas.<sup>366</sup> A 70°C esta enzima era menos estable que la caracterizada en este capítulo, puesto que perdía su actividad completamente en 3 minutos. Sin embargo, la enzima aislada de *Penicillium* era más estable a 50°C, de forma que conservaba una actividad residual del 48% después de incubarse durante 24 horas a dicha temperatura.

Otro ejemplo de xilanasa con baja estabilidad a alta temperatura es el caso de la aislada de *Pycnoporus cinnabarinus*, que se inactivó completamente a 70°C en menos de 15 minutos.<sup>369</sup> Esta desactivación tan rápida a altas temperaturas no se observa en xilanasas termoestables, como ocurre con la producida por *Bacillus subtilis* que tras ser incubada durante 10 minutos a 70°C y pH 6, mantenía una actividad residual del 80%.<sup>370</sup> Otro ejemplo que se describe en la bibliografía es el caso de una xilanasa aislada de especies del género *Thermomonospora*, que conservaba el 100% de su actividad a 50°C tras ser incubada a pH 7 durante 72 horas, y presentaba unos

---

<sup>369</sup> Sigoillot, C.; Lomascolo, A.; Record, E.; Robert, J.; Asther, M.; Sigoillot, J. (2002). Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 6, 876-883.

<sup>370</sup> Sa-Pereira, P.; Mesquita, A.; Duarte, J.; Aires, M. (2002). Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. *Enzyme and Microbial Technology*, **30**, 924-933.

tiempos vida media de 8 y 4 horas a 60 y 70°C respectivamente. Esta estabilidad desaparecía a 80°C, anulándose la actividad tras 18 minutos de incubación.<sup>371</sup>

Normalmente la desactivación de las enzimas se puede describir mediante un modelo cinético de primer orden, según el cual el logaritmo de la actividad enzimática residual desciende linealmente en función del tiempo.<sup>323</sup> La ecuación de velocidad de desactivación en este caso vendría dada por la expresión:

$$-\frac{dA}{dt} = kA \quad \text{Ecuación 1}$$

Siendo  $k$  la constante de desactivación de la enzima y  $A$  la actividad de la enzima en un tiempo  $t$ .

Integrando la expresión anterior se obtendría:

$$\int_{A_0}^A \frac{dA}{A} = -\int_0^t k dt \quad \rightarrow \quad \ln \frac{A}{A_0} = -k \cdot t \quad \text{Ecuaciones 2 y 3}$$

Siendo  $A_0$  la actividad de la enzima a  $t=0$ .

De esta forma, el valor de la *constante de desactivación* de la enzima se obtiene a partir de la pendiente de la recta obtenida de representar el logaritmo del cociente entre la actividad de la enzima a un tiempo dado y la actividad inicial, frente al tiempo.

---

<sup>371</sup> George, S.; Ahmad, A.; Rao, M. (2001). A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability. *Bioresource Technology*, **78**, 3, 221-224.

Suponiendo que las enzimas xilanasa y exo-PG descritas en el presente trabajo siguen una cinética de desactivación de orden 1, se podrían calcular los valores de dichas constantes a cada temperatura ensayada (tabla 5.3).

Anteriormente se comentó que la desactivación de la enzima aumenta a medida que lo hace la temperatura, hecho que se observa en la tabla 5.3. Como cabía esperar, la constante de desactivación más alta se obtiene para la temperatura de 70°C, cuyo valor es de  $9,62 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ . En cuanto a las temperaturas de 4 y 30°C se observan resultados muy parecidos, concretamente de  $2 \cdot 10^{-6}$  y  $3 \cdot 10^{-6} \text{ min}^{-1}$  respectivamente, que son muy inferiores a los obtenidos para 40 y 70°C.

Otro parámetro importante a determinar en relación a la desactivación enzimática es el *tiempo de vida media*, que se define como el tiempo al cual la actividad de la enzima se reduce en un 50% y cuya expresión se describe a continuación.

$$\ln \frac{A_0/2}{A_0} = -k \cdot t_{1/2} \rightarrow t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Ecuación 4}$$

En la tabla 5.3 se muestran los valores obtenidos para los tiempos de vida media de la enzima xilanasa a cada una de las temperaturas estudiadas.

Temperatura	k	t <sub>1/2</sub>
4°C	$2 \cdot 10^{-6} \text{ min}^{-1}$	240,58 días
30°C	$3 \cdot 10^{-6} \text{ min}^{-1}$	160,45 días
50°C	$4,2 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	2,75 h
70°C	$9,62 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	7,21 min

**Tabla 5.3: Valores de las constantes de desactivación y los tiempos de vida media de la enzima xilanasa determinados a las temperaturas de estudio.**

Como era de esperar, a medida que se incrementa la temperatura disminuye el tiempo de vida media. De esta forma, a la temperatura de 70°C la actividad de la xilanasa se reduce a la mitad tras 7,21 minutos de incubación. Por este motivo, si se pretende utilizar la enzima en procesos que transcurran a esta temperatura, no actuará durante más de 15 minutos, puesto que habría perdido toda su actividad. Sin embargo, a la temperatura de 4°C la enzima es estable durante más tiempo, reduciéndose su actividad a la mitad tras 240,58 días de incubación.

La dependencia de la constante de desactivación con la temperatura se analiza mediante la ecuación de Arrhenius (ecuación 5), la cual se utilizó para el cálculo de la energía de desactivación del proceso,  $E_d$ .

$$k = k_0 \cdot e^{\frac{-E_d}{RT}} \rightarrow \ln k = \ln(k_0) - \left(\frac{E_d}{R}\right) \frac{1}{T} \quad \text{Ecuación 5}$$

El análisis de regresión lineal de los datos del logaritmo neperiano de las constantes de desactivación frente al valor inverso de las temperaturas aporta el valor de  $k_0$  (factor preexponencial) y de  $E_d$  (energía de desactivación térmica), que resultó ser de 137,25 kJ/mol ( $r^2=0,8419$ ).

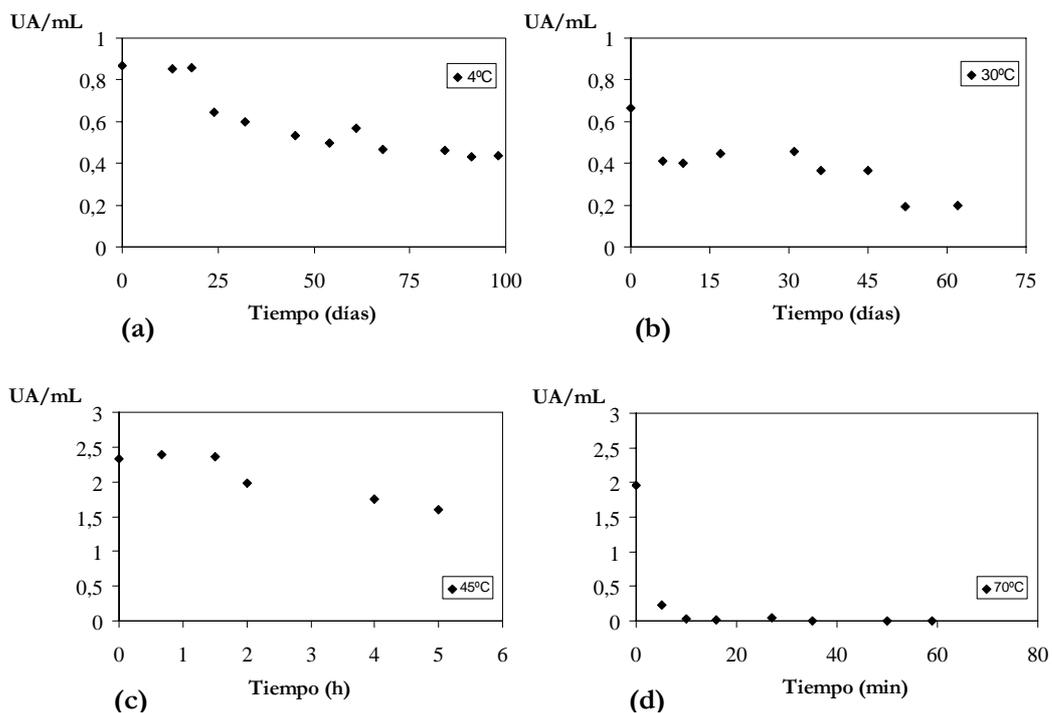
Valores de energía de desactivación similares se han obtenido para xilanasas del crudo de fermentación de diferentes cepas de la bacteria *Thermomyces lanuginosus*.<sup>372</sup> De esta forma, para las xilanasas producidas por *T. lanuginosus* SSBP y DMS 5826 se estimaron energías de desactivación de 102 kJ/mol y 134,8 kJ/mol, respectivamente. Sin embargo, la energía de desactivación de la xilanasa caracterizada en el presente trabajo es relativamente pequeña si se compara con las obtenidas por

---

<sup>372</sup> Xiong, H.; Nyssölä, A.; Jänis, J.; Pastinen, O.; von Weymarn, N.; Leisola, M.; Turunen, O. (2004). Characterization of the xylanase produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635. *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 1, 93-99.

microorganismos termofílicos. Así, por ejemplo, una xilanasa producida por *Thermomyces reesei* QM9414 presentaba una energía de activación de 311 kJ/mol.

En cuanto a la enzima exo-PG, en la figura 5.13 se muestra la evolución seguida por su actividad (medida en UA/mL) con respecto al tiempo para cada una de las temperaturas de incubación estudiadas.



**Figura 5.13:** Evolución de la actividad de la enzima exo-PG a distintas temperaturas: 4°C (a), 30°C (b), 45°C (c) y 70°C (d).

La exo-PG presenta bastante estabilidad a todas las temperaturas estudiadas excepto a 70°C, donde la actividad se anula prácticamente tras 10 min de incubación. A modo orientativo, dicha enzima mantiene una actividad del 66% tras ser almacenada durante 61 días a 4°C, y del 69% tras hacerlo a 30°C durante 31 días. Finalmente, a la

temperatura de 45°C la exo-PG muestra una actividad residual del 70% tras 5 horas de incubación.

De acuerdo con la bibliografía, la temperatura óptima de esta enzima se encuentra en un rango comprendido entre los 30 y los 50°C, de forma que por encima de este valor se observa una rápida desactivación.<sup>323</sup> Este es el caso de las pectinasas producidas por *Aspergillus indicus* que fueron estudiadas por Angayarkanni y col., las cuales mostraron ser estables a 37°C durante 2 días, mientras que a 50°C se desactivaban en 60 minutos.<sup>334</sup>

Ortega y col. estudiaron la estabilidad térmica de las poligacturonasas presentes en los crudos comerciales Rapidase C80, Pectinase CCM y Pectinex 3XL, y observaron que el segundo de ellos mantenía un 57% de la actividad inicial tras ser incubado a 50°C durante 1 h, sin embargo, Rapidase C80 y Pectinex 3XL sólo mantenían un 5 y un 10%, respectivamente.<sup>323</sup>

A la vista de los datos que proporciona la bibliografía, se observa como la estabilidad de la enzima exo-PG descrita en el presente trabajo es comparable, incluso superior en algunos casos, a la que presentan las poligalacturonasas presentes en crudos enzimáticos comerciales.

Las constantes de desactivación y los tiempos de vida media de esta enzima se calcularon de la misma manera que para la xilanasas. Para ello, a cada una de las temperaturas estudiadas se realizó un análisis de regresión del logaritmo de la actividad residual frente al tiempo.

En la tabla 5.4 se muestran los valores de las constantes de desactivación y los tiempos de vida media para cada temperatura.

Temperatura	k	t <sub>1/2</sub>
4°C	8·10 <sup>-6</sup> min <sup>-1</sup>	60,17 días
30°C	1·10 <sup>-5</sup> min <sup>-1</sup>	48,14 días
45°C	1,1·10 <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup>	10,50 h
70°C	3,376·10 <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	2,05 min

**Tabla 5.4:** Valores de las constantes de desactivación y los tiempos de vida media de la enzima *exo-PG* determinados a las temperaturas de estudio.

Como se ha comentado anteriormente, en la tabla 5.4 se observa como la desactivación de la *exo-PG* es más rápida cuanto mayor es la temperatura, presentando mayor estabilidad a 4°C, donde la constante tiene un valor de 8·10<sup>-6</sup> min<sup>-1</sup> y el tiempo de vida media es de unos 60 días. Por el contrario, a 70°C se obtiene una constante de desactivación de 3,376·10<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> y en estas condiciones la enzima reduce su actividad a la mitad en tan sólo 2,05 minutos. Para las temperaturas de 30 y 45°C la *exo-PG* presenta bastante estabilidad, determinándose unos tiempos de vida media de 48,14 días y 10,50 horas respectivamente.

Como se explicó para la enzima xilanasas, mediante el ajuste de regresión lineal de los resultados obtenidos al representar el logaritmo neperiano de las constantes de desactivación frente al valor inverso de las temperaturas, se obtiene el valor de la energía de desactivación que resultó ser de 128,91 kJ/mol ( $r^2=0,8139$ ). Esta energía de desactivación es ligeramente inferior a la obtenida para una *exo-PG* producida por *Aspergillus sojae* que tenía un valor de 152 kJ/mol.<sup>373</sup>

<sup>373</sup> Tari, C.; Dogan, N.; Gogus, N. (2008). Biochemical and thermal characterization of crude *exo-polygalacturonase* produced by *Aspergillus sojae*. *Food Chemistry*, **111**, 4, 824-829.

La enzima exo-PG se desactivó más rápidamente que la xilanasa en todas las temperaturas estudiadas, mostrando mayores constantes de desactivación, o lo que es lo mismo, tiempos de vida media más bajos. Así, por ejemplo, a 4°C la constante de desactivación y el tiempo de vida media de la xilanasa tenían valores de  $2 \cdot 10^{-6} \text{ min}^{-1}$  y 240,58 días respectivamente, mientras que para la exo-PG eran de  $8 \cdot 10^{-6} \text{ min}^{-1}$  y 60,17 días.

#### **5.4.2. Comparación de distintos métodos de concentración de las enzimas**

En la introducción de este capítulo se expuso la importancia de disponer de extractos enzimáticos más concentrados, ya que permite adicionar un menor volumen en la matriz sobre la cual va a actuar la enzima. Además, tras la aplicación de los métodos de concentración las enzimas se encuentran en una matriz sólida, en la que suelen presentar mayor estabilidad que en el extracto donde se hallaban inicialmente.<sup>330</sup>

Por este motivo, en el presente apartado se van a mostrar los resultados obtenidos tras la aplicación de los métodos de precipitación (por adición de sales o disolventes orgánicos) y de liofilización para la concentración de las enzimas xilanasa y exo-PG presentes en los extractos (ver apartado 5.3.4 de Material y métodos). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado, exponiendo en cada caso los límites de confianza para una probabilidad del 95%.

En la tabla 5.5 se exponen los resultados analizados para ambas enzimas, los cuales se expresan de dos maneras diferentes: como el aumento de actividad del extracto concentrado con respecto al inicial (cociente entre la actividad del extracto concentrado y la del inicial) o como el porcentaje de recuperación, que se calcula como el cociente, multiplicado por cien, entre la actividad determinada en el extracto

concentrado y la actividad teórica que se obtendría si en el proceso de precipitación se hubiera recuperado toda la enzima contenida inicialmente en la muestra.

$$\text{Aumento de actividad} = \frac{A_f}{A_0} \quad \% \text{ Recuperación} = \frac{A_f}{A_t} \cdot 100$$

$A_0$ : Actividad inicial del extracto sin concentrar

$A_f$ : Actividad final del extracto concentrado

$A_t$ : Actividad teórica del concentrado con recuperación total

Método de concentración	Aumento actividad		% Recuperación	
	Xilanasa	Exo-PG	Xilanasa	Exo-PG
Sulfato amónico	4°C	0,05 ± 0,04	0	0,23
	Ambiente	0,06 ± 0,01	0	0,30
Etanol	-20°C	7,28 ± 0,27	10,05 ± 2,86	39,18
	4°C	7,83 ± 0,41	9,53 ± 0,92	30,11
Acetona	-20°C	6,38 ± 0,03	5,99 ± 1,77	31,88
	4°C	9,85 ± 0,49	5,67 ± 0,49	49,26
Sulfato amónico y <i>tert</i> -butanol		0,43 ± 0,4	0,01 ± 0,02	2,14
Liofilización		10,90 ± 1,87	7,17 ± 0,85	66,21

**Tabla 5.5: Resultados obtenidos tras la aplicación de diferentes métodos de concentración de las enzimas en estudio.**

A la vista de los resultados obtenidos, se puede señalar que el método más eficaz para la obtención de un extracto concentrado en xilanasa es la liofilización, presentando un aumento de actividad respecto al control de  $10,90 \pm 1,87$  y una recuperación del 66,21%. En cuanto a los distintos agentes de precipitación utilizados, el más eficaz es la acetona a 4°C, consiguiéndose un aumento de la actividad de  $9,85 \pm 0,49$  y una recuperación del 49,26%. Comparando estos dos métodos de concentración de

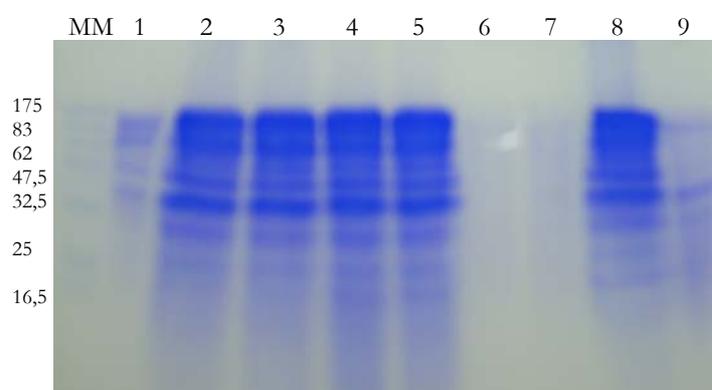
proteínas se observa que es más eficiente la liofilización, aunque quizás sería más rentable el uso de la acetona a 4°C, ya que es un disolvente relativamente barato y disponible en forma pura, presentando pocos contaminantes que podrían inhibir o desactivar a la enzima.<sup>331</sup> Además, la liofilización presenta una serie de inconvenientes como son el alto coste de los equipos y de la energía (más de tres veces superior a otros métodos de secado), y el largo tiempo de secado (normalmente 24 horas). El uso de la liofilización sólo está justificado en aquellos casos en los que se obtienen rendimientos mucho más altos que con otros métodos, para contrarrestar el gasto económico que supone el proceso.

Los índices más bajos de recuperación para esta enzima se alcanzaron cuando se utilizó sulfato amónico como agente precipitante, solo o con *tert*-butanol, donde el aumento de actividad no llegó al 1%. Como ya se comentó en la introducción, el sulfato amónico es el método más comúnmente utilizado para la precipitación de las proteínas, ya que se trata de un reactivo relativamente barato.<sup>335</sup> Sin embargo, hay ocasiones en las que se producen pérdidas de actividad provocadas por la desnaturalización de las proteínas, de ahí que, como en este caso, el aumento de actividad pueda llegar a ser menor que uno.

En relación a la exo-PG, en la tabla 5.5 se observa que el mejor método para conseguir un extracto concentrado es el etanol a -20°C, alcanzando un aumento de actividad respecto de la muestra de referencia de  $10,05 \pm 2,86$  y una recuperación del 50,23%. Valores del mismo orden de magnitud se obtienen con el mismo disolvente a 4°C, midiéndose un aumento de actividad de  $9,53 \pm 0,92$  y una recuperación del 47,64%. Para esta enzima, la liofilización también resulta ser un método efectivo de concentración, puesto que se consigue un aumento de actividad de  $7,17 \pm 0,85$  y una recuperación del 35,83%.

Al igual que para la enzima xilanasa, el sulfato amónico no permite la recuperación de la enzima. Sin embargo, con este método Sharma y Gupta purificaron una pectinasa presente en el preparado comercial Pectinex 3 XL, obteniéndose una solución que presentaba una actividad específica 9,7 veces superior a la del extracto de partida.<sup>374</sup>

Los distintos métodos de concentración utilizados también se compararon mediante el análisis de las proteínas presentes en cada uno de los extractos. Para ello se aplicó la técnica de electroforesis SDS-PAGE, obteniendo el gel que se muestra en la figura 5.14.



**Figura 5.14: Análisis mediante electroforesis de los diferentes extractos proteicos obtenidos tras la aplicación de los métodos de concentración estudiados.** La columna identificada como MM corresponde a los marcadores de peso molecular (kDa). Las muestras se cargaron en el siguiente orden: extracto inicial (línea 1), acetona a -20°C y a 4°C (líneas 2 y 3), etanol a 20°C y a 4°C (líneas 4 y 5), sulfato amónico a temperatura ambiente y a 4°C (líneas 6 y 7), extracto liofilizado (línea 8) y sulfato amónico-terc-butanol (línea 9).

Como se observa en la figura 5.14, el patrón de bandas obtenido para las muestras de acetona (líneas 2 y 3), etanol (líneas 4 y 5) y liofilización (línea 8) es muy similar al del extracto de partida (línea 1), con la diferencia de que presentan una intensidad mucho mayor. Esto indica que los métodos empleados son muy eficientes para la

<sup>374</sup> Sharma, A.; Gupta, M. (2001). Purification of pectinases by three-phase partitioning. *Biotechnology Letters*, **23**, 1625-1627.

concentración de las proteínas presentes en el extracto de partida, lo que corrobora los resultados comentados anteriormente. En concordancia con los datos mostrados en la tabla 5.5 en los que la precipitación con sulfato amónico fue el método con el que se midieron los rendimientos de concentración más bajos, las bandas de proteínas obtenidas con este método (línea 9) son de menor intensidad que las del extracto de partida.

Como conclusión de este estudio cabe señalar que, aunque el método más comúnmente descrito en la literatura para la precipitación de xilanasas y pectinasas es el empleo de sulfato amónico, en el presente trabajo se obtuvieron bajos rendimientos de recuperación. Por el contrario, la precipitación con acetona o etanol y la liofilización han mostrado ser alternativas viables para la concentración de los extractos de xilanasas y exo-PG. No obstante, debido a los costes que conlleva la técnica de liofilización, se recomienda la precipitación.

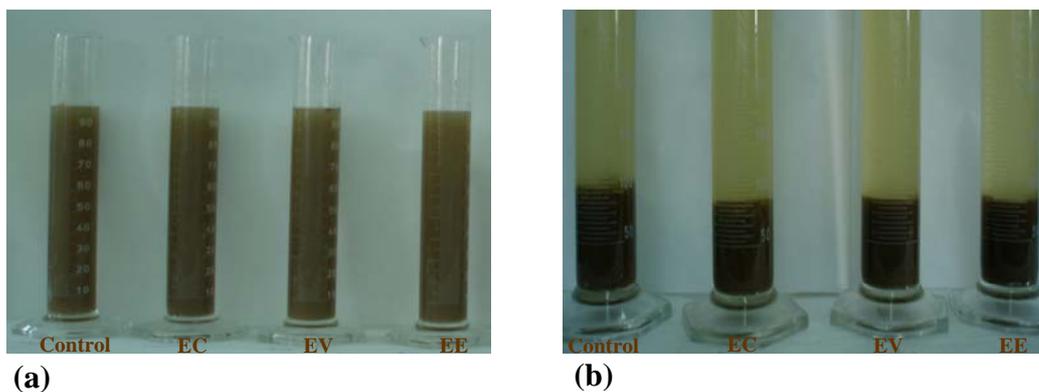
#### **5.4.3. Estudio de la aplicabilidad del extracto enzimático concentrado con etanol en la clarificación de mostos**

Con idea de evaluar la eficacia del extracto enzimático concentrado mediante precipitación con etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  (EE) en la clarificación de mostos, en el presente apartado se va a comparar su funcionamiento con el de los crudos enzimáticos comerciales de Agrovin, EC (Enovin Clar) y EV (Enozym Vintage) (ver apartado 5.3.5 de Material y métodos). Se eligió este método de concentración de las proteínas debido a que proporcionó los mejores resultados para la exo-PG, que es una de las principales enzimas que participan en el proceso de clarificación.

Cada experimento se realizó por duplicado, y se muestran las medias de los datos de turbidez y los límites de confianza para una probabilidad del 95%.

En este estudio se utilizó un control, que únicamente contenía zumo, para evaluar la clarificación conseguida simplemente por la sedimentación natural de las partículas en ausencia de enzimas.

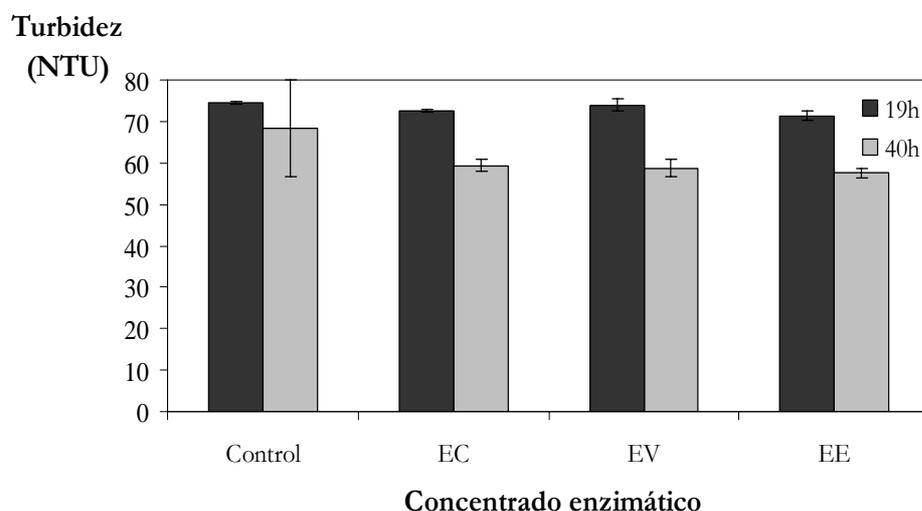
Como se pone de manifiesto en la figura 5.15, tras 19 horas de clarificación se observa la presencia de un cierto volumen de mosto clarificado incluso en el control. Este hecho se debe a que la clarificación más significativa se produce tras la sedimentación de un gran número de partículas que se encuentran suspendidas en el mosto. Sin embargo, con la adición de las enzimas se consigue un mayor volumen de mosto clarificado, lo que demuestra que, como resultado de la actividad enzimática, se degradan las moléculas de polímeros presentes en el mosto.



**Figura 5.15:** Aspecto que presentaba el mosto a tiempo cero (a) y tras 19 horas de clarificación con enzimas comerciales (EC y EV) y extracto concentrado (EE) (b).

Además del análisis del volumen de mosto clarificado, la medida de su turbidez permite comparar la eficacia de los concentrados enzimáticos empleados. Para determinar el grado de clarificación obtenido en cada caso se midió la turbidez inicial del mosto que resultó ser de 2702 NTU (unidades de turbidez nefelométricas).

Los datos de turbidez medidos tras 19 y 40 h de clarificación de mosto con los concentrados enzimáticos empleados se representan en la figura 5.16.



**Figura 5.16:** Turbidez del mosto tras 19 y 40 h de clarificación de los concentrados enzimáticos (EC: Enovin Clar, EV: Enozym Vintage y EE: extracto concentrado con etanol) y el control (sin la adición de enzimas). (Turbidez inicial=2702 NTU)

Como puede apreciarse en la figura 5.16, tras 19 horas de incubación se mide una menor turbidez en los mostos tratados con las enzimas, siendo el extracto EE el que proporciona un grado de clarificación superior. En este último caso se determina una turbidez que es un 4,2% inferior a la medida en el control.

La diferencia de turbidez entre los mostos tratados con enzimas y el control son más importantes tras 40 h de incubación, determinándose un valor de turbidez entre un 13,2 y un 15,9% inferiores al del control. El mayor grado de clarificación se alcanza con el concentrado enzimático obtenido en el presente trabajo (EE), con el cual se consigue disminuir la turbidez inicial del mosto en un 97,9%.

El hecho de conseguir un mayor grado de clarificación con el extracto enzimático EE podría deberse a la presencia de otras actividades enzimáticas laterales, como es el caso de las xilanasas o celulasas, que podrían facilitar el proceso de clarificación. A pesar de que los concentrados enzimáticos comerciales también contienen diferentes enzimas (esterasas, poligalacturonasas, pectinliasas, etc.), su naturaleza exacta y relación no está especificada.<sup>375</sup> En la bibliografía se describe como la mejora del proceso de clarificación del mosto se consigue cuando se añade el balance correcto de actividades exógenas que complementan las pobres actividades enzimáticas endógenas de la uva.<sup>376</sup>

#### 5.4.4. Purificación de las proteínas por cromatografía de intercambio iónico

En el presente apartado se van a mostrar los resultados obtenidos tras la purificación de los extractos enzimáticos mediante cromatografía de intercambio iónico DEAE (matriz intercambiadora de aniones). Esta técnica no sólo permite la purificación de la muestra, sino que además la concentra debido a que las proteínas se eluyen de la columna en un menor volumen de tampón.

Como ya se comentó en el apartado 5.3, para la purificación de las enzimas xilanasas y exo-PG se llevó a cabo un procedimiento que consistía en dializar previamente el extracto enzimático para disminuir la concentración de sales, antes de someterlo a la purificación en columna DEAE. En la resina se retuvieron aquellas proteínas que, en las condiciones de pH utilizadas, presentaban carga neta negativa. Posteriormente eran eluidas mediante la adición de tampones con cantidades crecientes de NaCl; concretamente de 50, 150, 250 y 500 mM. De esta forma, a las concentraciones de sal

---

<sup>375</sup> Harman, G.; Kubicek, C. (1998). *Trichoderma and Gliocladium. Enzymes, biological control and commercial applications*. Taylor and Francis, London, 2.

<sup>376</sup> Roldán, A.; Palacios, V.; Peñate, X.; Benítez, T.; Pérez, L. (2006). Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of *Palomino fino* grapes in the sherry region. *Journal of Food Engineering*, **75**, 375–382.

más bajas se separaban de la DEAE aquellas proteínas que mostraban menor afinidad por la resina.

Para cada tampón de elución se recogieron distintas fracciones, en las que no sólo se analizó la actividad de las enzimas xilanasa y exo-PG, sino que además se determinaron las proteínas totales para poder calcular las actividades enzimáticas específicas. Este parámetro es realmente interesante, ya que proporciona información acerca del grado de pureza de la proteína.

El proceso se realizó por triplicado por lo que se muestran los valores medios y los límites de confianza para un 95% de probabilidad.

Tras probar distintas relaciones volumen de muestra/volumen de resina se determinó que el valor óptimo es el de 10/1 y por tanto fue el que se eligió para la purificación de los extractos enzimáticos. Así, se comprobó que al utilizar relaciones superiores, las eluciones no presentaban mayor actividad exo-PG por mL, debido a que dicha actividad se reparte entre más fracciones. Con respecto a la enzima xilanasa, en estas condiciones no se consiguieron mejores resultados que con la relación de 10/1.

En la tabla 5.6 se expone la actividad de la enzima xilanasa determinada en la muestra inicial, en la fracción no retenida, en los primeros 5 mL del lavado y en la elución de 50 mM de NaCl, en la que se detecta la máxima actividad específica para dicha enzima. Asimismo, se muestra la concentración de proteínas totales y la actividad específica por mg de proteína.

Muestra	Actividad xilanasas (UA/mL)	Proteínas totales (mg/mL)	Actividad específica (UA/mg)
Inicial	6,71 ± 0,32	1,45 ± 0,21	4,63
Fracción no retenida	4,84 ± 0,16	0,52 ± 0,18	9,31
Lavado	4,71 ± 0,30	0,22 ± 0,12	21,41
Elución 50 Mm en NaCl	5,61 ± 1,22	0,22 ± 0,05	25,5

**Tabla 5.6: Resultados obtenidos para la xilanasas tras la purificación en columna DEAE del extracto dializado.**

Tras el análisis de las muestras obtenidas al eluir la columna se detectó actividad xilanasas en algunas de las fracciones de la elución 50 mM en NaCl, mostrándose en la tabla 5.6 el resultado de aquella fracción que presenta mayor actividad específica.

El hecho de detectarse actividad tanto en la fracción no retenida como en la elución de NaCl podría deberse a la presencia de, al menos, dos xilanasas que presentan un punto isoeléctrico diferente. Una de ellas no se habría retenido en la resina por presentar una carga neta positiva al pH que transcurría el proceso de purificación (pH 7).

En la tabla 5.6 se observa actividad xilanasas en el lavado, hecho que indica que cierta cantidad de la enzima se retiene de forma inespecífica a la columna y es liberada fácilmente tras el paso del tampón sin NaCl.

Debido a que la actividad xilanasas está repartida entre la fracción no retenida, el lavado y las eluciones de 50 mM en NaCl, no se aprecia un aumento de la actividad xilanasas por mL ( $5,61 \pm 1,22$  UA/mL en la elución de 50 mM en NaCl, frente a  $6,71 \pm 0,32$  UA/mL en la muestra de partida). Sin embargo, si se obtiene un aumento de 5,51 veces de la actividad específica ( $25,5$  UA/mg en la elución de 50 mM en NaCl

frente a 4,63 UA/mg en la muestra de partida), ya que la enzima está más enriquecida en la fracción purificada que en el extracto inicial.

Con este procedimiento también se logró retener en la resina la enzima exo-PG presente en el extracto de partida, que se eluyó tras añadir tampón Tris-HCl con una concentración 500 mM en NaCl. En la tabla 5.7 se muestran los resultados obtenidos para dicha enzima en la muestra inicial, la fracción no retenida, los primeros 5 mL del lavado y la elución que presentó mayor actividad específica exo-PG.

Muestra	Actividad exo-PG (UA/mL)	Proteínas totales (mg/mL)	Actividad específica (UA/mg)
Inicial	0,64 ± 0,03	1,45 ± 0,21	0,44
Fracción no retenida	0 ± 0	0,52 ± 0,18	0
Lavado	0 ± 0	0,22 ± 0,12	0
Elución 500 mM de NaCl	1,25 ± 0,70	0,08 ± 0,06	15,63

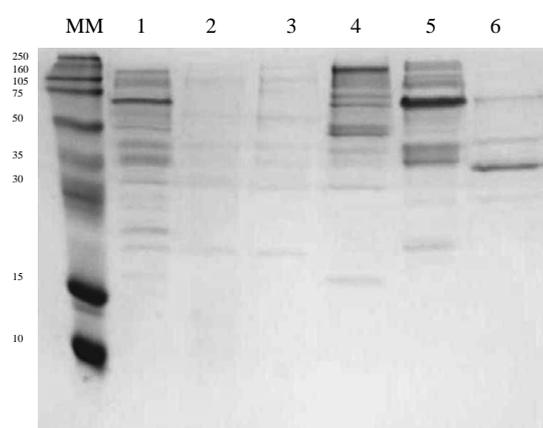
**Tabla 5.7: Resultados obtenidos para la exo-PG tras la purificación en columna DEAE del extracto dializado.**

Como se observa en la tabla 5.7 la enzima se unió a la resina, de ahí que no se detecte actividad en la fracción no retenida ni en el lavado. Para la exo-PG, no sólo se consigue su concentración, aumentando la actividad de 0,64 ± 0,03 UA/mL a 1,25 ± 0,70 UA/mL, sino que además se logra su purificación, obteniendo en la elución de 500 mM en NaCl una actividad específica 35,5 veces mayor a la de la muestra de partida.

En la fracción no retenida no se observa actividad exo-PG, hecho que indica que la resina no se ha saturado en la enzima. Por tanto, tras el paso de los 20 mL de extracto por la resina, aún quedan restos positivos libres. Por este motivo, cabría

pensar que la xilanasa determinada en la fracción no retenida no correspondería a un exceso de la misma obtenido tras la saturación de la resina, hecho que apoyaría la hipótesis de la presencia de varias xilanasas en el extracto de partida.

Se evaluaron las proteínas presentes en las distintas soluciones recogidas tras la elución de la columna mediante electroforesis SDS-PAGE, obteniéndose el gel que se muestra en la figura 5.17. Se cargaron la muestra de partida (línea 1), la fracción no retenida (línea 2), las fracciones de 50 y 500 mM en NaCl (líneas 3 y 6) que presentaron mayor actividad específica xilanasas y exo-PG y las muestras de 150 y 250 mM en NaCl (líneas 4 y 5), que contenían un mayor número de proteínas.



**Figura 5.17:** Análisis mediante electroforesis de los diferentes extractos proteicos obtenidos tras la purificación en columna DEAE. La columna identificada como MM corresponde a los marcadores de peso molecular (kDa). Las muestras se cargaron en el siguiente orden: extracto inicial (línea 1), fracción no retenida (línea 2), elución NaCl 50mM (línea 3), elución NaCl 150mM (línea 4), elución NaCl 250 mM (línea 5) y elución NaCl 500 mM (línea 6).

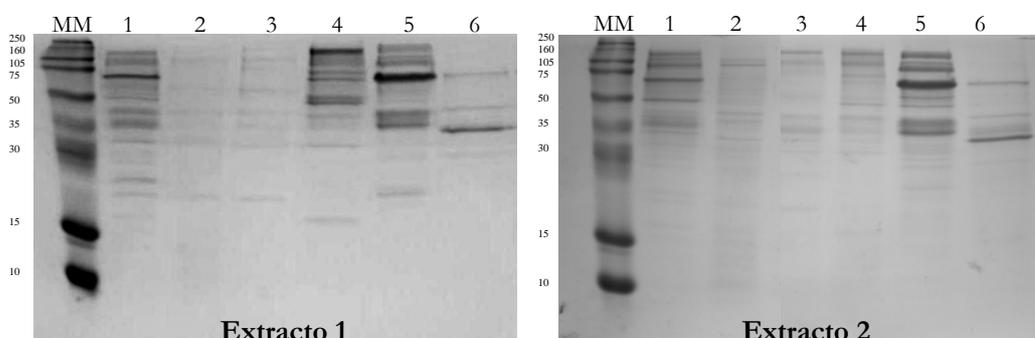
En la figura 5.17 se observa que hay un menor número de bandas en la fracción no retenida (línea 2) que en la muestra de partida (línea 1), lo que indica que la mayor parte de las proteínas se retuvieron en la columna. Si se comparan las señales obtenidas en las distintas eluciones con NaCl (líneas 3-6), se observa que hay un mayor número de bandas en las de 150 y 250 mM (líneas 4 y 5) que corresponden a

las proteínas que se han conseguido separar de la xilanasa y de la exo-PG, ya que estas dos enzimas se detectaron en las eluciones de 50 y 500 mM. Además, las líneas 3 y 6 del gel, correspondientes a las fracciones 50 y 500 mM de NaCl, presentan muchas menos bandas que la muestra de partida, hecho que indica que las proteínas en estudio se encuentran más puras en los extractos obtenidos tras la elución de la columna que en el extracto de partida. En la elución de 500 mM (línea 6) se observan algunas bandas de mayor intensidad que en la muestra inicial, lo que manifiesta que se produjo, además de la purificación de las proteínas, la concentración de estas.

Como conclusión de este primer estudio, es preciso indicar que con la metodología seguida no se consiguió una purificación total de las enzimas xilanasa y exo-PG, pero si se separaron parcialmente de otras proteínas presentes en el extracto. No obstante, en los procesos en los que normalmente se aplican estas dos enzimas se utilizan crudos enzimáticos en los que se encuentran junto a otras proteínas, por lo que el grado de purificación alcanzado en este trabajo podría ser suficiente.

Con idea de estudiar la reproducibilidad de la metodología seguida para la purificación parcial de las proteínas, se repitió esta utilizando en el segundo experimento un extracto enzimático diferente, obtenido en las mismas condiciones que el anterior aunque utilizando el reactor de bandejas para el desarrollo de las FES. Se comprobó que los dos extractos se comportaron de forma análoga al ser sometidos a la metodología de purificación desarrollada en este trabajo, con la única diferencia de que el primer extracto presentaba mayor actividad de las enzimas exo-PG y xilanasa, ya que el reactor de tambor rotatorio proporciona actividades enzimáticas más elevadas que el reactor de bandejas.

Como muestra de esta reproducibilidad en la figura 5.18 se comparan los geles obtenidos tras el análisis de electroforesis SDS-PAGE de ambos extractos, en los que se observan las proteínas presentes en las distintas eluciones de la columna DEAE.



**Figura 5.18:** Análisis mediante electroforesis de las diferentes soluciones proteicas obtenidas tras la purificación en columna DEAE para los extractos 1 y 2. La columna identificada como MM corresponde a los marcadores de peso molecular (kDa). Las muestras se cargaron en el siguiente orden: extracto inicial (línea 1), fracción no retenida (línea 2), elución NaCl 50 mM (línea 3), elución NaCl 150 mM (línea 4), elución NaCl 250 mM (línea 5) y elución NaCl 500 mM (línea 6).

Comparando los geles de la figura 5.18 se observa que no hay diferencias significativas entre ambos en cuanto a la distribución de las proteínas en las diferentes fracciones. Este hecho indica que el procedimiento descrito en el presente trabajo de purificación en columna DEAE, con la diálisis previa del extracto, presenta una alta reproducibilidad.

En la bibliografía se describen otras metodologías muy similares a las descritas en este trabajo para la purificación de xilanasas y pectinasas. Como ejemplo se puede citar la purificación de una xilanasa producida por *Streptomyces cyaneus* SN32 llevada a cabo por Ninawe y col.,<sup>218</sup> que consistió, en un primer paso, en la precipitación de 500 mL de extracto con sulfato amónico (60%), resuspendiendo el sólido formado en 35 mL de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). Posteriormente se dializó el extracto concentrado, para finalmente purificarlo mediante cromatografía de intercambio iónico DEAE utilizando para ello 40 mL de resina. Con esta metodología se obtuvo

un extracto que presentaba una actividad específica 2,3 veces superior a la del extracto de partida.

Una metodología con mayor número de etapas que la desarrollada en este capítulo se describe en la bibliografía para la purificación de una exopoligalacturonasa producida por *Penicillium frequentans*.<sup>377</sup> Consistía en la filtración y diálisis del extracto (frente a tampón Tris-acetato a pH 6,5), para la posterior separación en una columna DEAE-Sefacel mediante la adición del tampón con concentraciones creciente en NaCl. Las fracciones obtenidas con 20 mM en NaCl se mezclaron, se dializaron y se introdujeron en otra columna DEAE-Sefacel, obteniéndose un extracto en el que la enzima exo-PG se encontraba 4,3 veces más pura que en el extracto de partida.

La mayoría de los estudios anteriores seguidos por otros autores para la purificación de enzimas utilizan al menos dos etapas de separación en columna. Sin embargo, con la metodología desarrollada en este capítulo, con un único paso de separación se obtienen unos niveles de purificación de las enzimas xilanasa y exo-PG muy elevados, lo que ratifica la eficiencia del procedimiento propuesto.

#### **5.4.5. Comparación de los extractos parcialmente purificados con crudos comerciales**

Como se ha descrito anteriormente, una de las principales aplicaciones de las enzimas exo-PG y xilanasa es su utilización en el proceso de clarificación del vino. Por este motivo se van a comparar los extractos purificados, mediante la metodología previamente desarrollada en el apartado 5.3.7, con crudos enzimáticos y enzimas

---

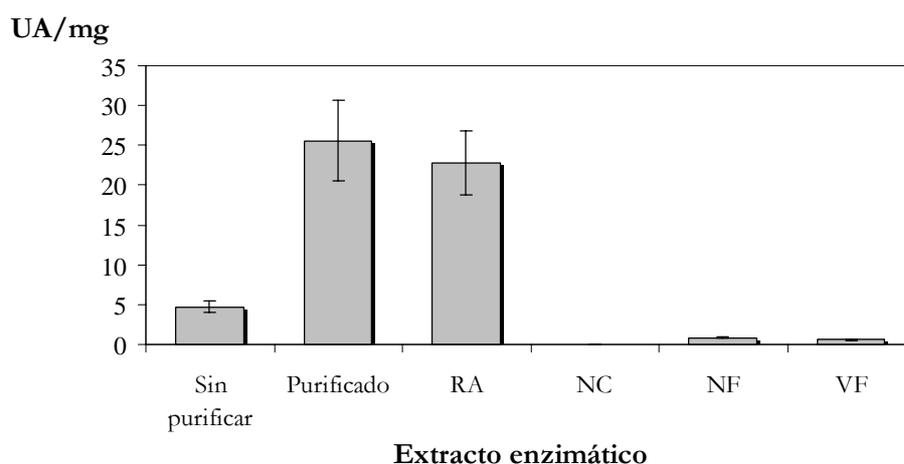
<sup>377</sup> Dos Santos, M.; Chellegatti, C.; Vieira, M.; Said, S. (2002). Purification and partial characterization of exopoligalacturonase from *Penicillium frequentans*. *Microbiological Research*, **157**, 1, 19-24.

comerciales que normalmente se aplican en alguna de las etapas del proceso de elaboración del vino.

Los crudos enzimáticos utilizados fueron AR, NV, NF y VF, que fueron descritos en el apartado 5.3.8. Estos productos comerciales tienen distintas aplicaciones en la industria vitivinícola y su composición enzimática exacta es desconocida. También formaron parte de este estudio las enzimas comerciales xilanasa y exo-PG que, de acuerdo con la casa comercial, habían sido extraídas del crudo de fermentación de hongos.

Todos estos concentrados enzimáticos se compararon con los extractos parcialmente purificados mediante cromatografía de intercambio iónico DEAE obtenidos en este trabajo. Cabe recordar que, tras la aplicación del método de purificación y elución de la resina con NaCl 50 mM, se obtuvo un extracto con una actividad específica xilanasa muy elevada (25,5 UA/mg), mientras que la exo-PG se obtuvo en la fracción de 500 mM en NaCl (15,63 UA/mg). Por lo tanto, la elución de 50 mM se utilizó para evaluar la actividad específica de la enzima xilanasa y la de 500 mM para la de la exo-PG.

En la figura 5.19 se exponen las actividades específicas de xilanasa de los productos comerciales y la del extracto antes y después de ser parcialmente purificado mediante DEAE. No se han representado los resultados obtenidos para la xilanasa comercial, aunque se comentarán más adelante.



**Figura 5.19:** Comparación de la actividad específica xilanasa del extracto antes y después de ser purificado por DEAE con la de crudos enzimáticos comerciales (RA: Rapidase, NC: Novoclaizym, NF: Novoferm y VF: Vinoflow).

Se observa que el extracto purificado presenta una actividad específica xilanasa más elevada que cualquiera de los concentrados comerciales utilizados. Su valor es 29,2 y 41,5 veces mayor que el de NF y el de VF, respectivamente. También muestra mayor actividad que RA, aunque la diferencia con este extracto es menos significativa. La ficha técnica que acompaña a este preparado comercial indica que presenta actividad pectinolítica, glicosídica,  $\beta$ -glucanasa y hemicelulasas, perteneciendo a este último grupo la xilanasa.

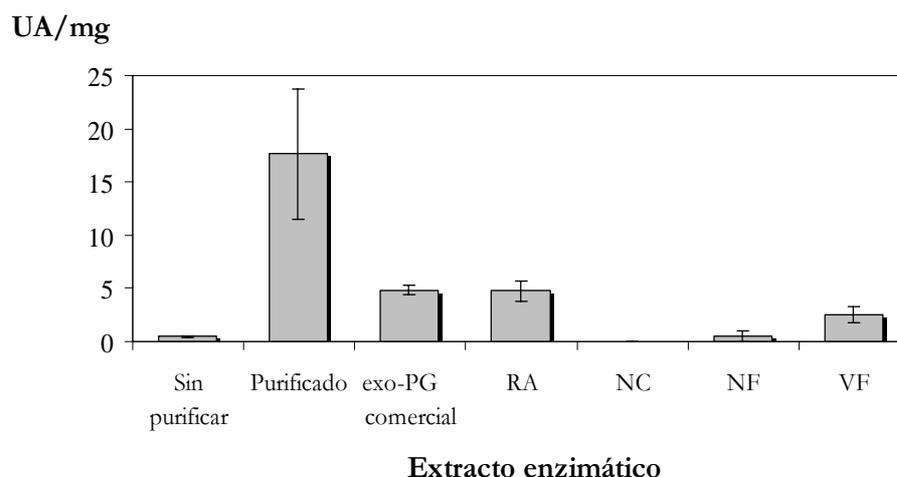
De todos los crudos enzimáticos comerciales utilizados el único que no muestra actividad xilanasa es NC.

En la figura 5.19 también se representa la actividad xilanasa en el extracto sin purificar, el cual manifiesta una actividad 5,3 y 7,6 veces superior a las de NF y VF, respectivamente.

A la vista de los resultados anteriormente mencionados se puede concluir que incluso el extracto sin purificar, contiene mayor actividad xilanasa que algunos de los concentrados enzimáticos comerciales utilizados. Este aumento es más acusado cuando se considera el extracto parcialmente purificado.

Los resultados analizados para la xilanasa comercial no se han representado en la figura 5.19 debido a que son muy elevados, dificultando la visualización de los demás. Este extracto presenta una actividad de  $170,4 \pm 0,94$  UA/mg, valor esperable teniendo en cuenta que la enzima se había obtenido de un microorganismo manipulado genéticamente y, además, había sido purificada en un alto grado. Todo esto, lógicamente, eleva su coste.

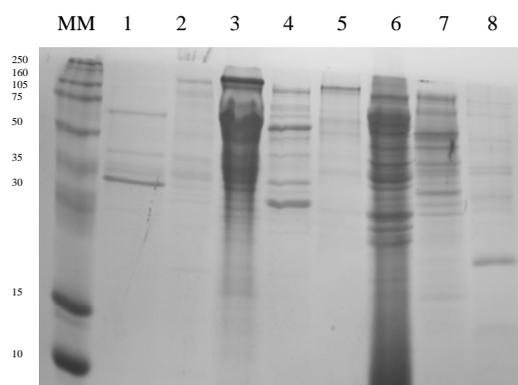
Las actividades específicas exo-PG determinadas en los distintos extractos enzimáticos se exponen en la figura 5.20. Los valores más altos se midieron en el extracto parcialmente purificado mediante DEAE, que presenta una actividad 3,7 veces superior a la de la exo-PG comercial y la del concentrado RA. Al igual que ocurría con la enzima xilanasa, en NC no se detecta actividad exo-PG, a pesar de que la ficha técnica indica que se trata de una preparación pectinolítica.



**Figura 5.20:** Comparación de la actividad específica exo-PG del extracto antes y después de ser purificado por DEAE con la de crudos enzimáticos comerciales (exo-PG comercial, RA: Rapidase, NC: Novoclaizym, NF: Novoferm y VF: Vinoflow).

En la figura 5.20 también se muestra la actividad del extracto sin purificar, que es muy similar a la del concentrado enzimático comercial NF. Finalmente en VF se determina una actividad de 2,52 UA/mg, siendo 7 veces inferior a la obtenida con el extracto parcialmente purificado.

Además de las actividades específicas, se evaluaron las proteínas presentes en los extractos mediante electroforesis SDS-PAGE. Los resultados se muestran en la figura 5.21.



**Figura 5.21: Análisis mediante electroforesis de los diferentes crudos enzimáticos a comparar.** La columna identificada como MM corresponde a los marcadores de peso molecular (kDa). Las muestras se cargaron en el siguiente orden: *exo*-PG parcialmente purificada (línea 1), *xilanas*a parcialmente purificada (línea 2), NC (línea 3), RA (línea 4), NF (línea 5), VF (línea 6), *exo*-PG comercial (línea 7), *xilanas*a comercial (línea 8).

Puede verse como el concentrado enzimático comercial VF (línea 6) presenta un número de bandas elevado, muy superior al obtenido para las enzimas parcialmente purificadas mediante DEAE. Esto indica que contiene una gran cantidad de proteínas diferentes encontrándose, por tanto, las enzimas en estudio muy impuras. Estos resultados se corroboran con los datos de actividad específica *xilanas*a y *exo*-PG obtenidos que, como se comentó anteriormente, fueron bastante bajos.

En el gel también se observa como el crudo enzimático NC (línea 3) presenta un gran número de bandas, aunque ninguna de ellas corresponde a las enzimas *xilanas*a o *exo*-PG ya que no se determinó su actividad.

El producto RA (línea 4), que fue el preparado enzimático comercial que contenía mayores actividades para ambas enzimas, no muestra un gran número de bandas, lo que indica que las enzimas están parcialmente purificadas.

Si se comparan los resultados analizados para la enzima exo-PG parcialmente purificada (línea 1) con los de la comercial (línea 7), se observa que la primera de ellas presenta menos bandas, lo que confirma que en este caso la enzima se encuentra mucho más pura. Finalmente para la enzima xilanasa comercial (línea 8), con la que se analizó una actividad específica muy alta, en el gel se visualizan pocas bandas, lo que justifica su alto grado de pureza.

## 5.5. CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes del trabajo expuesto en el presente capítulo son las siguientes:

- La actividad de la enzima xilanasa se inhibe en contacto con los cationes  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Hg^{2+}$ . La desactivación más relevante es causada por el último de ellos, donde la actividad se reduce en un 94%.
- En relación a la actividad de la enzima xilanasa en función del pH, esta muestra una gran estabilidad en un rango comprendido entre 3 y 9; sin embargo, a pH más altos se produce una ligera disminución de su actividad.
- En relación a la actividad de la xilanasa en función de la temperatura, la enzima presenta una gran estabilidad a 4 y 30°C, produciéndose una desactivación más rápida a 50 y 70°C, calculándose unos tiempos de vida media de 2,75 h y 7,21 min, respectivamente.
- Los iones  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  actúan como activadores de la enzima exo-PG. Sin embargo, esta se inhibe en contacto con  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Hg^{2+}$ . La desactivación más acusada se produce con el catión  $Hg^{2+}$ , reduciéndose la actividad 2,25 veces respecto la del control.
- En lo que se refiere al comportamiento de la exo-PG respecto del pH, la enzima muestra las mayores actividades a pH 4 y 7. Las actividades más bajas se analizan a pH 11, aunque la enzima conserva una actividad residual del 40%.

- En relación a la actividad de la enzima exo-PG frente a la temperatura, esta es bastante estable a 4, 30 y 45°C. Sin embargo a 70°C la enzima se desactiva prácticamente tras 10 min de incubación.
- En relación a los métodos de concentración de la enzima xilanasa, la liofilización y la precipitación con acetona se han manifestado como los más eficaces.
- Para la concentración de la exo-PG, el método más eficiente es el que utiliza etanol a -20°C y a 4°C como agente precipitante. Se consiguen aumentos de actividad de 10,05 y 9,53 veces, respectivamente.
- El extracto enzimático concentrado con etanol proporciona un grado de clarificación ligeramente superior al de crudos enzimáticos comerciales al ser adicionados a mostos de uva blanca.
- Tras la aplicación del método de purificación en columna DEAE a los extractos enzimáticos previamente dializados, se consigue purificar parcialmente las enzimas xilanasa y exo-PG.
- Los extractos parcialmente purificados mediante DEAE presentan mayor actividad específica xilanasa y exo-PG que los crudos enzimáticos comerciales probados. Además, la exo-PG parcialmente purificada muestra un mayor grado de pureza que una pectinasa comercial producida por *Aspergillus niger*.

# 6

## CONCLUSIONES FINALES



## 6.1. CONCLUSIONES FINALES

Las conclusiones más relevantes de este trabajo son:

1. La producción de las enzimas xilanasa, exo-PG y celulasa mediante fermentación en estado sólido sobre orujo de uva está inhibida a las altas concentraciones de azúcares propias de este medio natural. Sin embargo, su síntesis puede estimularse mediante el lavado del orujo y su enriquecimiento con una solución nutritiva –que aporte fuente de nitrógeno y sales minerales adicionales- y una fuente natural de pectina como las cáscaras de naranja.
2. En los reactores de FES diseñados en este trabajo para la producción de las enzimas en estudio (lecho fijo, bandejas y tambor rotatorio), el caudal de aire muestra un efecto positivo sobre la actividad enzimática, incrementándose conforme lo hace el flujo de aire. Sin embargo, hay un caudal de aire máximo, que es diferente según el tipo de reactor, por encima del cual la síntesis de las enzimas no aumenta. En el caso del reactor de lecho fijo este caudal máximo es de 60 mL/min para la xilanasa y de 90 mL/min para la exo-PG y celulasa. Para la aireación completa del reactor de bandejas es necesario emplear un caudal mínimo de 300 mL/min, lo que permite mantener una actividad constante a lo largo de todos los platos. En cuanto al reactor de tambor rotatorio, con un caudal máximo de 120 mL/min y con condiciones estáticas o una agitación de 1 min al día, se obtienen las mayores actividades enzimáticas.
3. La fermentación en cultivo sumergido llevada a cabo en el reactor de tanque agitado proporciona valores de actividad enzimática superiores a los determinados en los reactores de FES utilizados en el presente capítulo. Sin embargo, en el reactor de tanque agitado no se miden actividades enzimáticas reproducibles y los extractos se obtienen en forma más diluida que en los experimentos en FES.

4. Las enzimas obtenidas mediante FES sobre orujo de uva y cáscaras de naranja permanecen estables en un amplio rango de pH, temperaturas y en presencia de distintos cationes.
5. En relación a los métodos de concentración de la enzima xilanasa, la liofilización y la precipitación con acetona se han manifestado como los más eficaces. Para la concentración de la exo-PG, el método más eficiente es el que utiliza etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y a  $4^{\circ}\text{C}$  como agente precipitante.
6. Los resultados obtenidos tras la aplicación de los extractos concentrados en la clarificación de mostos de uva blanca indican que es factible su aplicación en las industrias de zumos y vinos, ya que proporcionan un grado de clarificación ligeramente superior al de crudos enzimáticos comerciales.
7. Tras la aplicación del método de purificación en columna DEAE a los extractos enzimáticos previamente dializados, se consigue separar parcialmente las enzimas xilanasa y exo-PG de otras proteínas presentes en los extractos.



7

RESUMEN EN INGLÉS





---

**Reutilization of grape pomace as solid medium  
of fermentation for the production  
of hydrolytic enzymes of industrial interest**

---

**Faculty of Science. University of Cadiz  
Department of Chemical Engineering, Food Technology  
and Environmental Technologies**

**Ana Belén Díaz Sánchez**



## ABSTRACT

Society demands the development of environmental friendly processes for obtaining utility products more each time. For this reason, numerous works are being made to obtain different chemicals and products of interest by means of the bioconversion of agro-industrial surpluses and residues. In this line, the project reported in this thesis tries to develop a new process with low environmental impact and costs to reuse the main waste of the wine industry: grape pomace. In fact, it has been verified that during the solid state fermentation (SSF) of the fungus *Aspergillus awamori* on grape pomace, pectinases, xylanases and cellulases are secreted. However, grape pomace composition changes according to season, type of grape, collection point, whether conditions, etc, therefore, no reproducible enzyme productivities are achieved when different grape pomaces are used as solid substrates for fermentations. For this reason, the washing of grape pomace, its subsequent supplementation with a nutrient solution and its mixture with orange peels, with a high content of pectin, cellulose and hemicellulose, enhanced the production of the mentioned enzymes and the reproducibility of their synthesis. The goal of this work is to obtain enzyme extracts, by mean of the mixture of these agroindustrial residues fermentation, with a high content of pectinases, xylanases and cellulases. These extracts, previously concentrated and/or purified, can be used in juice and wine industries in the clarification stages. These enzymes mainly constitute the commercial multienzymatic complexes that are traditionally used to facilitate the filtration of juices. Of all those enzymes, pectinases play the most important role in the process.

Given the importance of external variables of fermentation on enzyme production, and since reactors are closely tied to their manipulation, the most suitable configuration of bioreactor and the optimum conditions of operation for the synthesis of the mentioned enzymes by the fungus *Aspergillus awamori* were selected. Four different configurations of bioreactor (three in solid state and one in submerged

culture with the substrate in suspension) were evaluated, studying the influence of aeration and agitation, being the stirred tank bioreactor and the rotating drum, in first and second place, respectively, the ones which provided the highest enzyme activities.

The stability of the exo-polygalacturonase (a type of pectinase) and the xylanase produced by SSF was also evaluated. These enzymes showed high activities in a wide range of pH and temperature and in the presence of different cations.

The extracts obtained, once the best method for their concentration was selected, were used in grape must clarification, providing better yields than other commercial crude enzymes. Moreover, in order to increase their applicability, they were partially purified by anion exchange chromatography on DEAE-cellulose (diethyl aminoetil cellulose) column, showing higher grade of purity than commercial crude enzymes frequently used in wine and fruit juices industries. Therefore, the extracts can be successfully applied in industrial processes that more pure enzymes are required.

According to the results obtained, the proposed process for the grape pomace reutilization constitutes a viable alternative to revalorize agroindustrial residues. In this way, they can be used as substrates of fermentation for the production of hydrolytic enzymes with great commercial applications, favouring also the reduction of their contaminant capacity.

The work carried out during the development of the present project is structured in three independent chapters, which will make easier the methodology description and the discussion of results.

---

## CHAPTER 1

### **Development of solid state fermentations on grape pomace for the production of hydrolytic enzymes**

#### **Abstract**

The aim of this work was to use grape pomace as a substrate of fermentation for the production of xylanase, exo-PG and CMC-ases, which are commonly used together to facilitate clarification processes in wine cellars and juices industries. The production of the studied enzymes by solid state fermentation on whole grape pomace was inhibited at high concentration of reducing sugars. To avoid this, a protocol for the adjustment of the nutrients composition of this residue was proposed. It involves washing the solid substrate to remove excess of reducing sugars and supplementing it with a solution containing mineral salts and extra nitrogen sources. Besides, orange peels, a natural source of pectin, were mixed in a proportion 1:1 (w/w) with grape pomace to induce the production of the studied enzymes. For the mixed substrates fermentation, the maximum xylanase activity reached a value of  $32.69 \pm 3.94$  IU/gds after 6 days of fermentation, while peaks of  $3.77 \pm 0.87$  IU/gds and  $5.35 \pm 0.10$  IU/gds were measured for exo-PG and carboximetilcellulose (CMC-ase) at the days 4 and 10, respectively.

#### **1.1. INTRODUCTION**

In nature, solid organic substrates such as animal and plant residues, wood, crop residues, fruits, etc., undergo complex microbial degradation and transformation by various microbiological processes. In industry, this natural process may be utilized in a controlled way employing pure cultures if a specific end product is desired.<sup>1</sup> Solid

---

<sup>1</sup> Sabu, A.; Pandey, A.; Daud, M.; Szakacs, G. (2005). Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Bioresource Technology*, **96**, 1223-1228.

state fermentation (SSF) simulates the natural growth of microorganisms on a moist insoluble solid support in the absence (or near absence) of free water.<sup>2,3,4</sup>

SSF offers several opportunities to processes with agro-industrial residues, increasing the interest on their applications. For example, the reutilization of agro-industrial wastes for enzymes production using SSF minimizes the pollution and allows obtaining high added-value products using an economical technology. In many industrial processes, enzymes provide a viable alternative to chemical hydrolysis due to its high specificity, besides being environmental friendly.<sup>5,6</sup> Among enzymes, the hydrolytic ones have prevalent applications in textile industry, the production of juices and fruit extracts, the pulp and paper and animal feed industries, etc.<sup>7,8</sup> These enzymes degrade polysaccharides in the plant cellular walls like celluloses, hemicelluloses and pectins.

In most cases, agroindustrial wastes used to produce these enzymes by SSF do not possess all the necessary nutrients for this purpose, or maybe they are available in sub-optimal concentrations. In these cases, the substrate must be supplemented to stimulate or improve the enzyme production by adding extra carbon sources such as maltose, sucrose, citrus pectin, glucose, fructose, glycerol, maltose, lactose, soluble starch or mannitol or extra nitrogen sources such as ammonium sulphate and

---

<sup>2</sup> Mitchell, D.; Berovic, M.; Krieger, N. (2002). Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review*, **8**, 183–225.

<sup>3</sup> Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 81–84.

<sup>4</sup> Sharma, A.; Vivekanand, V.; Singh, R. (2008). Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. *Bioresource Technology*, **99**, 3444–3450.

<sup>5</sup> Bajpai, P. (1997). Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*, **43**, 141–194.

<sup>6</sup> Kuhad, R.; Singh, A.; Eriksson, K. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell wall. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **57**, 47–125.

<sup>7</sup> Rodrigues, E.; Milagres, A.; Pessoa, A. (1999). Xylanase recovery: effect of extraction conditions on the AOT-reversed micellar systems using experimental design. *Process Biochemistry*, **34**, 121–125.

<sup>8</sup> Castilho, L.; Alves, T.; Medronho, R. (1999). Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, **34**, 181–186.

phosphate, yeast extract, peptone, tryptone, malt extract, beef extract, ammonium chloride, sodium nitrate or amino acids.<sup>9,10,11,12,13,14</sup> Supplementation can also be carried out with the adjustment of the initial moisture content of the residue using a solution containing mineral salts such as KCl, MnCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, sodium acetate, etc.<sup>12,15,16,17</sup> or combining the solid with another residue. Thus, mixtures of wheat and orange bagasse or cotton bran with orange pulp has been tested for SSF.<sup>18,19</sup>

Grape pomace is the residue left after juice extraction from the grapes in the wine making industry.<sup>20</sup> Only in Spain, over 250 million kg of this by-product (constituted by seeds, skin and stem) are generated and re-used as animal feed (with low

<sup>9</sup> Mahanta, N.; Gupta, A.; Khare, S. (2008). Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. *Bioresource Technology*, **99**, 4572-4582.

<sup>10</sup> Patil, S.; Dayanand, A. (2006). Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology*, **97**, 2054-2058.

<sup>11</sup> Galiotou-Panayotou, M.; Kapantai, M. (1993). Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin. *Letters in Applied Microbiology*, **17**, 145–148.

<sup>12</sup> Sodhi, H.; Sharma, K.; Gupta, J.; Soni, S. (2005). Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry*, **40**, 525–534.

<sup>13</sup> Khandeparkar, R.; Bhosle, N. (2005). Bleach-enhancing abilities of *Thermomyces lanuginosus* xylanases produced by solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **40**, 3230-3235.

<sup>14</sup> Gao, J.; Weng, H.; Zhu, D.; Yuan, M.; Guan, F.; Xi, Y. (2006). Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology*, **97**, 2054-2058.

<sup>15</sup> Liu, J.; Yuan, X.; Zeng, G.; Shi, J.; Chen, S. (2006). Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 732-742.

<sup>16</sup> Christopher, L.; Bissoon, S.; Singh, S.; Szendefy, J.; Szakacs, G. (2005). Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **40**, 431-435.

<sup>17</sup> Virupakshi, S.; Babu, K.; Gaikwad, S.; Naik, G. (2007). Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *Journal of Food Engineering*, **81**, 54-59.

<sup>18</sup> Martin, N.; Guez, M.; Leite, R.; Da Silva, R.; Gomes, E. (2007). Study of pectinase produced by thermophilic fungi *Rhizomucor* sp. N31 in FES. *Journal of Biotechnology*, **131**, 158.

<sup>19</sup> Neves, E.; Buzon, R.; Lopes, A.; Álvares, M.; da Silva, R.; Gomes, E. (2007). Production and evaluation of exogenous fibrolytic enzymes in presence of the rumen fluid and in vitro digestibility of tropical forage using enzymatic complex. *Journal of Biotechnology*, **131**, 227.

<sup>20</sup> Botella, C.; de Ory, I.; Webb, C.; Cantero, D.; Blandino, A. (2005). Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*, **26**, 100-106.

nutritional value)<sup>21</sup> or nutritive ingredient,<sup>22,23</sup> in the production of citric acid<sup>24</sup> and ethanol by fermentation,<sup>20</sup> in the extraction of anthocyanins,<sup>22,25</sup> etc. This material is under-exploited and most of it is generally disposed in open areas, leading to serious environmental problems. In contrast, the potential utility of this waste for value-added products by SSF is promising. The variety *Palomino Fino*, selected for the work described here, has a high carbohydrate content (8% in the seeds, 13% in the skin), with the fibre representing about 50% of the total mass.<sup>20</sup> The principal component of fibre is lignin (64% of the fibre in the pips and 59% in the skin), other major components are hemicelluloses (18% of the fibre in pips and 31% in skin) and cellulose (17.75% and 6% in pips and skin, respectively) and the minor component of the fibre is pectin, representing only 0.25% of total fibre in pips and 4% in skin.<sup>20,26</sup> Given this composition, it has been used as substrate for the production of hydrolytic enzymes such as xylanase, exo-polygalacturonase (exo-PG, a type of pectinase), CMC-ase (a type of cellulase), etc.<sup>27</sup> However, this composition changes according to season, types of grapes, weather conditions, etc, and, therefore, no reproducible enzymatic productivities are achieved when different grape pomaces are used as solid substrates for fermentations. Taking into account this fact, a protocol for the adjustment of the nutrients composition of grape pomace, in order to enhance the production of some hydrolytic enzymes, is proposed in this chapter. This process involves washing the solid substrate to remove excess of reducing sugars and supplementing it with a solution rich in mineral salts and nitrogen

---

<sup>21</sup> Larwence, A. (1991). Feed value of grape marc. VI. Extraction, fractionation, and quantification of condensed tannins. *Chemical Abstracts*, **116**, 20017c.

<sup>22</sup> Lu, Y.; Yeap, L. (1999). The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*, **65**, 1-8.

<sup>23</sup> Ana, A.; Croitor, N.; Segal, B.; Sas, I. (1995). Bioactive substance concentrate from grape marc. *Chemical Abstracts*, **124**, 28617j.

<sup>24</sup> Hang, Y. (1988). Citric acid and its manufacture with *Aspergillus niger* from grape pomace. US Patent, US 4791058; *Chemical Abstracts*, **110**, 93581t.

<sup>25</sup> Francis, F. (1992). A new group of food colorants. *Trends in Food Science and Technology*, **3**, 27-31

<sup>26</sup> Blanco, P.; Sieiro, C.; Villa, T. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, **175**, 1-9.

<sup>27</sup> Botella, C.; Diaz, A.; de Ory, I.; Webb, C.; Blandino, A. (2007). Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **42**, 98-101.

sources. Besides, orange peels have been selected as a natural source of nutrients to mix with grape pomace, because they are rich in pectin, cellulose and hemicellulose. Moreover, they also constitute a waste abundantly available in Spain.

Citrus peels are the main solid by-product of the citrus processing industry and constitute about 50% of fresh fruit weight.<sup>28</sup> The disposal of the fresh peels is becoming a major problem in many factories. Usually, juice industries dry the residue and give it away as raw material for pectin extraction or it is pelletized for animal feeding, though none of these processes is profitable. As for other food processing wastes, various microbial transformations have been proposed for citrus peels, producing valuable products like biogas, ethanol, citric acid, chemicals, various enzymes, volatile flavouring compounds, fatty acids and microbial biomass.

In order to find a utility of grape pomace, the aim of this work is to use this residue as a solid substrate of fermentation for the production of hydrolytic enzymes. For this purpose, a first step of washing for its high sugar content reduction was necessary. Next, a supplementation step with a nutrient solution and a natural source of pectin-orange peels-was established in order to induce the synthesis of pectinase (exo-PG), xylanase and cellulase (CMC-ase).

## 1.2. MATERIALS AND METHODS

### 1.2.1. Spore production

*A. awamori* 2B.361 U2/1, classified by the Commonwealth Mycological Institute as *Aspergillus niger* complex, was propagated and stored on slants which contained a synthetic medium for fungal growth composed of (g/L): 1 peptone, 0.5 yeast extract,

---

<sup>28</sup> Mamma, D.; Kourtoglou, E.; Christakopoulos, P. (2008). Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, **99**, 2373-2383.

15 agar, 6 xylan and 1 pectin. This medium contains xylan and pectin as sole carbon sources to induce the production of xylanase and exo-polygalacturonase.

Spores stored on synthetic medium slants were washed with 2 ml of 0.9% NaCl. The spore solution (0.2 ml) was spread on the surface of 25 ml synthetic medium in eight petri dishes, and incubated at 30°C for 5 days. After the incubation period, 0.5 ml of 0.9% NaCl solution were added to the petri dishes to collect the cells. The number of spores was counted in an Improved Neubauer Counting Chamber.

### 1.2.2. Solid substrates for fermentations

White grape pomace from the Xerez-Sheres-Sherry area in Spain (*Palomino Fino* variety) was used as natural substrate for the SSF experiments. Different samples of white virgin pomace were collected. The pomace was obtained from a local wine cellar after pressing the above mentioned variety of grape and stored at -20°C until use. For any given series of experiments, sub-samples (250 g) were taken and defrosted to ambient temperature. The solid was dried in an oven (60 °C for 48 h), milled and sieved (56.3% of the total weight of particles was over 1 mm in diameter). Then it was washed several times with distilled water to reduce its high reducing sugars content. After this, the solid was dried again and finally, it was sterilised in an autoclave for 20 min at 120 °C and 1.2 atm.

Orange peels (*Washington Navel* variety) were obtained after juice extraction from oranges collected at a local market. Samples were stored at -20°C. Before their use in SSF experiments, orange peels were defrosted, milled (62.8% of their weight was constituted of particles over 1 mm in diameter) and extensively washed in order to remove all water soluble compounds. Solid was dried at 60°C for 48 h and finally sterilized in an autoclave (20 min, 120°C, 1.2 atm).

When mixtures of grape pomace and orange peels were used, both residues were conditioned separately as it has been previously described, mixed in a 1:1 proportion and sterilised in an autoclave.

### 1.2.3. Solid state fermentations

Fermentations were carried out in static conditions at 30°C. The required amount of spore suspension and the exact amount of moistening agent, to fit the initial moisture content at 70%, were poured into disposable Petri dishes (9 cm diameter). Inoculum concentrations were adjusted to  $4.5 \cdot 10^8$  spores/g solid substrate (grape pomace, orange peels or a mixture of them). After this, 10 g of the sterilized solid substrate were added to each one. Every experiment was developed in duplicate.

As it was pointed out in the introduction, solid substrates were supplemented with added nutrients. To fit the initial moisture content of the solids different solutions were used. All these solutions, called Nutrient Solutions, had the same basic components (g/L): 2.4 urea, 9.8  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5.0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.001  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0008  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.004  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  and 11.5 pectin. Depending on the experiment, pectin was obviated in the formulation of the Nutrient Solution (see Table 1.1). The pH of these solutions was adjusted to 5 by using HCl 0.1 M.

### 1.2.4. Extraction conditions

After fermentation, the content of each Petri dish was spilled in Erlenmeyer flasks containing 50 mL of Tween 80 (0.01%) and then stirred in a rotary shaker (150 rpm, 30 min, 4°C). These extraction conditions were optimized in a previous work.<sup>29</sup>

When a mixture of grape pomace and orange peels was used as solid substrate for

---

<sup>29</sup> Díaz, A.; Caro, I.; de Ory, I.; Blandino, A. (2007). Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme and Microbial Technology*, **41**, 302-306.

fermentations, 70 mL of solvent were added instead. The suspension resulting after the extraction was centrifuged at 10000 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatant obtained –the enzymatic extract- was stored at -20°C until required for analysis.

### 1.2.5. Enzymes assays

The enzymatic activities of xylanase (EC 3.2.1.8), exo-polygalacturonase (EC 3.2.1.67) and CMC-ase (EC 3.2.1.4) in the different extracts obtained were analysed. For the xylanase, the reaction mixture containing 0.1 ml of enzymatic extract and 0.9 ml of xylan suspension (0.5% w/w Birchwood xylan in 0.05M citrate buffer, pH 5.4) was incubated at 50°C for 10 min. The reducing sugars produced were measured by a modification of the dinitrosalicylic acid method (DNS) using D-xylose as the standard.<sup>30</sup> CMC-ase activity was determined by the same procedure described for xylanase, but carboxymethyl-cellulose (Panreac) was used as substrate. Exo-polygalacturonase (Exo-PG) activity was evaluated by adding 0.2 ml of enzymatic extract to 0.8 ml pectin solution (0.5% pectin in 0.1M acetate buffer, pH 5.0). Samples were incubated at 45°C for 10 min and the reducing groups in the enzymatic extract were determined by the DNS method.

All the measurements were made in duplicate and the results expressed as reducing sugars using a calibration curve. A unit of enzyme activity (IU) was defined as the amount of enzyme producing 1  $\mu$ mol of reducing sugars per minute at the specified conditions.

---

<sup>30</sup> Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, **31**, 426–8.

### 1.3. RESULTS AND DISCUSSION

Temporal evolution of pH, reducing sugars concentration and xylanase, exo-PG and CMC-ase activities were analysed. Enzymatic activities were expressed in international units per gram of dried solid (IU/gds). Confidence limits for a probability of 95% were also calculated.

#### 1.3.1. Solid state fermentations on grape pomace

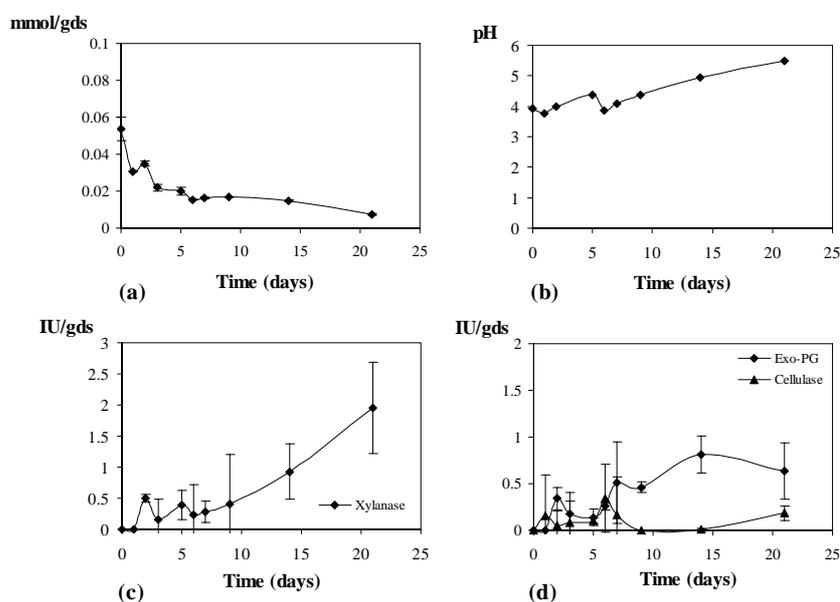
Solid state fermentations were carried out using grape pomace as the sole substrate as it was collected from the wine cellar (whole grape pomace). However, no enzymatic activities were detected in the extracts after 12 days of culture. Along this period, reducing sugars concentration decreased from  $1.009 \pm 0.005$  to  $0.683 \pm 0.012$  mmol/gds, meaning that only a small percentage of sugars (32%) were consumed by the fungus during its growth (data not represented in figures). This situation could suggest that the high concentration of sugars in the medium represses the synthesis of the studied enzymes.<sup>31</sup> For this reason, grape pomace was pretreated by washing it several times with distilled water in order to reduce its high reducing sugars content in subsequent experiments.

Figure 1.1 shows the data for the experiments of washed grape pomace (protocol in 1.2.2), using distilled water as the moistening agent (70% w/w). In this case, initial reducing sugars concentration reached a value of  $0.054 \pm 0.006$  mmol/gds, which is almost 95% lower than its content in whole grape pomace, meaning that the washing step was very effective. As a consequence of the metabolism of the fungus the reducing sugars concentration reached a value of  $0.007 \pm 0.000$  mmol/gds after 21

---

<sup>31</sup> Fang, X.; Yano, S.; Inoue, H.; Sawayama, S. (2008). Lactose enhances cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **106**, 2, 115-120.

days of culture. On the contrary, pH rose slightly during fermentation probably due to the utilisation of organic acids by the fungus as carbon sources when the sugar is limited.<sup>32</sup>



**Figure 1.1:** Temporal evolution of reducing sugars concentration (a), pH (b), xylanase activity (c) and exo-PG and CMC-ase activities (d) by *A. awamori* fermentation on washed grape pomace.

Enzymatic activities measured for the studied enzymes are presented in Figure 1.1 (c) and 1.1 (d). As it can be observed, enzymes activities increased continuously with fermentation while free reducing sugars present in the medium are consumed by the fungus. Maximum xylanase activity reached a value of  $1.96 \pm 0.74$  IU/gds after 21 days of fermentation, while peaks of  $0.82 \pm 0.20$  IU/gds and  $0.34 \pm 0.30$  IU/gds were measured for exo-PG and CMC-ase at the days 14<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup>, respectively.

<sup>32</sup> Poiana, M.; Romeo, F. (2006). Changes in chemical and microbiological parameters of some varieties of Sicily olives during natural fermentation. *Grasas y aceites*, **57**, 402-408.

In this fermentation, the fungal growth was quite poor comparing to the previous experiment with the whole grape pomace. This fact could be explained considering that other water soluble substances rather than sugars (which are also necessary for the metabolism of the fungus such as mineral salts or vitamins) could also be reduced or eliminated with the washing step. In addition, enzymatic activities measured for the three enzymes are quite low when they are compared with the corresponding ones for other agricultural residues. For this reason, another set of experiments was developed by adjusting the initial moisture content of the grape pomace with a nutrient solution (NS) which had been reported in bibliography for conditioning solid supports for fungal growth in SSF.<sup>33</sup> This solution, detailed in 1.2.3, contained a variety of nitrogen sources and metal ion salts, as well as pectin as exo-PG inductor. Maximum enzymes activities measured on this medium are included in the second line of Table 1.1.

In this case, an initial concentration of reducing sugars of  $0.054 \pm 0.006$  mmol/gds was measured and they were practically consumed after three days of fermentation (data not shown, the maximum enzymatic activities are included in Table 1.1). The maximum activity obtained for exo-PG was  $3.18 \pm 0.17$  IU/gds, which is four times higher than the one measured on washed grape pomace. For xylanase and CMC-ase peaks of  $18.67 \pm 0.16$  and  $3.44 \pm 1.5$  IU/gds were reached respectively, meaning that productivities were in both cases almost ten times higher than the ones attained with washed grape pomace. Therefore, the washed substrate must be supplemented to stimulate or improve the enzyme production by adding extra carbon sources such as pectin, extra nitrogen sources and mineral salts. In order to avoid extra pectin addition to washed grape pomace, a natural source of this polysaccharide was tested

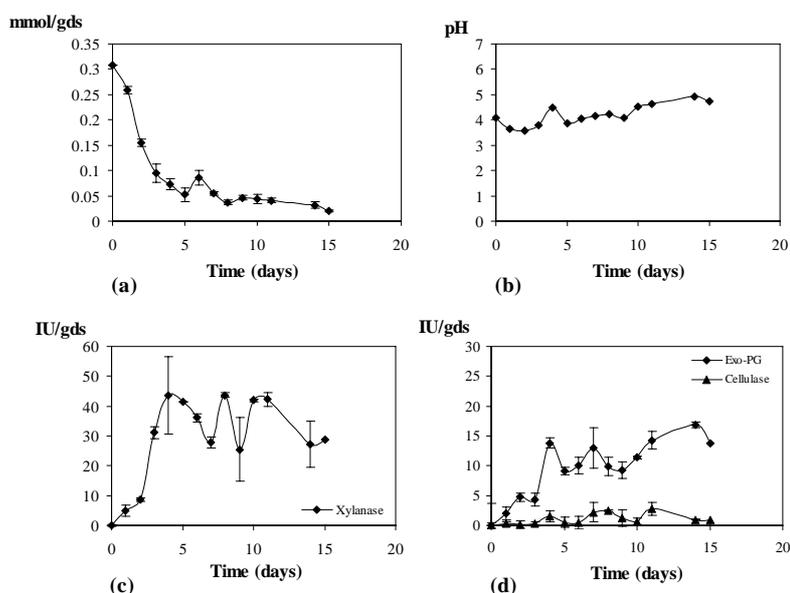
---

<sup>33</sup> Trejo-Hernández, M.; Oriol, E.; López-Canales, A.; Roussos, S.; Viniegra-González, G.; Raimbault, M. (1991). Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. *Micología Neotropical Aplicada*, **4**, 49-62.

from several agroindustrial residues. Due to the composition of orange peels, which contain 14.4% of pectin and 16.2% and 13.8% of cellulose and hemicellulose, respectively, this waste was selected to combine with grape pomace. Previously, orange peels were tested alone as solid substrate for the production of the selected enzymes.

### 1.3.2. Solid state fermentations on orange peels

For these experiments, initial moisture content of orange peels was adjusted with the nutrient solution without pectin. Results resumed in Table 1.1 are detailed in Figure 1.2.



**Figure 1.2:** Temporal evolution of reducing sugars concentration (a), pH (b), xylanase activity (c) and exo-PG and CMC-ase activities (d) by *A. awamori* fermentation on orange peels.

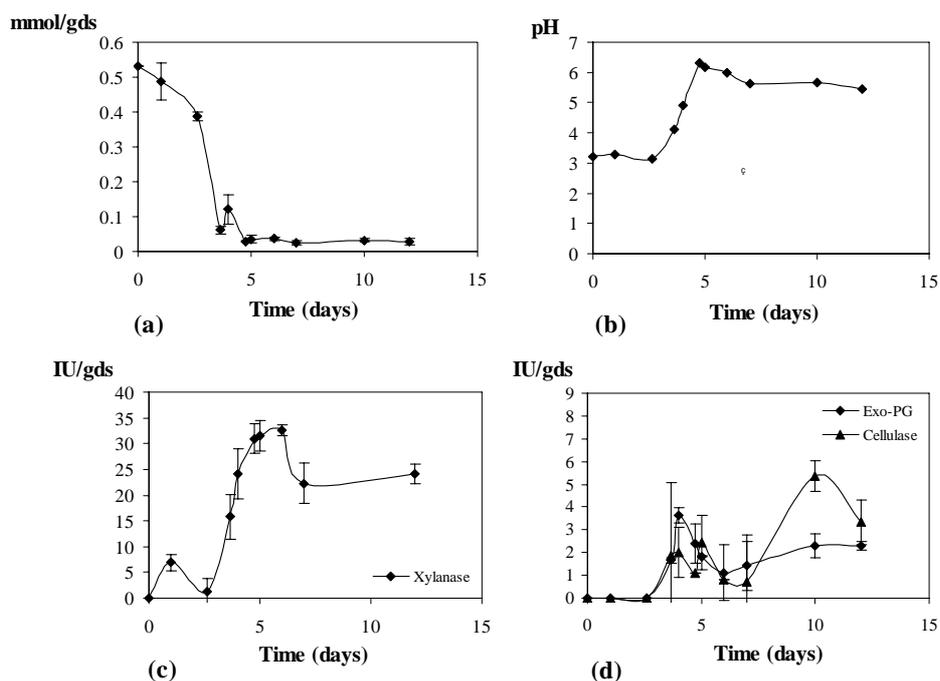
As it can be observed in Figure 1.2 (a), reducing sugars concentration decreased drastically after 5 days of culture. The trends showed by pH and enzymes activities were analogous to the ones registered for grape pomace moistened with NS. A

maximum xylanase activity of  $43.74 \pm 1.78$  IU/gds was measured, which is 2.1 times higher than the corresponding one for grape pomace. For exo-PG a maximum value of  $16.90 \pm 1.40$  IU/gds was measured, which is much higher than the one obtained in previous experiments on grape pomace. CMC-ase production was quite low in comparison to the other two enzymes and it was of the same order of magnitude that the production measured on grape pomace supplemented with NS.

Therefore, orange peels are an excellent support-substrate for xylanase and exo-polygalacturonase production by *A. awamori* under solid-state conditions, even better than grape pomace. However, the main objective of our work was to revalorize grape pomace, which disposal becomes an important problem in Spain and in other wine-producers countries.

### **1.3.3. Solid state fermentations on grape pomace and orange peels mixtures**

Once demonstrated that pectin contained in orange peels induced the synthesis of exo-PG and the other two enzymes were also excreted to the medium, this residue was used to supplement grape pomace in a proportion 1:1 (w/w). The trend of the reducing sugars and the pH (Figure 1.3) was quite similar to the one obtained when grape pomace or orange peels were used by separate.



**Figure 1.3:** Temporal evolution of reducing sugars concentration (a), pH (b), xylanase activity (c) and exo-PG and CMC-ase activities (d) by *A. awamori* fermentation on grape pomace plus orange peels mixture.

Maximums for xylanase, exo-PG and CMC-ase activities measured when the mixture of both residues was used were 16.7, 4.6 and 15.7 times higher, respectively, than the ones analysed with grape pomace moistened with distilled water. Moreover, for xylanase and exo-PG these maximums were reached earlier (Table 1.1).

In conclusion, the addition of orange peels to grape pomace improves the production of the studied enzymes and reduces the time needed for fermentation.

The enzyme activities measured for orange peels alone or mixed with grape pomace are of the same order of magnitude (or even higher in some cases), with those produced by using other agro-industrial wastes. Thus, when *Penicillium decumbens* was grown on a mixture of 90% corn straw and 10% wheat bran moistened with 25 ml of

a mineral solution maximum activities obtained for xylanase and cellulose were 13.59 and 9.05 IU/gds, respectively, after 4 days of culture at 28 °C. Mineral solution was composed of 0.5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.16 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O adjusted to pH 5.5.<sup>34</sup> In the same line, when 2.5 g of dry orange peels (which were subjected to extraction with deionized water in order to remove all water soluble compounds) moistened to 70.5% with Toyama liquid mineral medium were fermented with the fungus *Fusarium oxysporum*, activities of 5.2 ± 0.2 and 33.0 ± 1.0 IU/gds were measured for xylanase and polygalacturonase, respectively.<sup>28</sup> The fermentation of *Fomes sclerodermeus* on 4 g of soy bran moistened with distilled water produced a maximum of 16.5 IU/g of xylanase after 12 days of fermentation. For the polygalacturonase enzyme a maximum value of 28.42 IU/gds was analysed after 15 days.<sup>35</sup> The fungus *Aspergillus foetidus* NCIM 514 produced 5.1 IU/gds of pectinase after 4 days of fermentation at 30°C when it was inoculated on dried deseeded sunflower head. In this case, the initial moisture content of the substrate was also adjusted with a mineral salt solution.<sup>10</sup> When *Bacillus subtilis* was grown on banana wastes, 9.6 IU/gds of cellulose activity were registered after 72 h of culture. In this case, an initial moisture content of 70% was fitted with additional mineral nutrients.<sup>36</sup>

#### 1.4. CONCLUSIONS

The production of the studied enzymes by solid state fermentation on whole grape pomace is inhibited at high concentration of reducing sugars. To avoid this, a protocol for the adjustment of the nutrients composition of grape pomace is proposed in this chapter. This process involves washing the solid substrate to

---

<sup>34</sup> Yang, X.; Chen, H.; Gao, H.; Li, Z. (2001). Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, **78**, 277-280.

<sup>35</sup> Papinutti, V.; Forchiassin, A. (2007). Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *Journal of Food Engineering*, **81**, 54-59.

<sup>36</sup> Krishna, C. (1999). Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technology*, **69**, 231-239.

remove excess of reducing sugars and supplementing it with a solution rich in other nutrients, such as mineral salts and extra nitrogen sources. Besides, orange peels have been selected as a natural source of pectin, cellulose and hemicellulose to mix in a proportion 1:1 (w/w) with grape pomace to induce the production of the studied enzymes. In this last case, the productivities of the studied enzymes increase compared to grape pomace alone and peaks of xylanase and exo-PG were reached earlier.

### 1.5. APPENDIX

Solid substrate	Moistening agent	Maximum enzymes activities (IU/gds)/ day of culture		
		Xylanase	Exo-PG	CMC-ase
Grape pomace	Distilled water	1.96 ± 0.74 (21 <sup>th</sup> day)	0.82 ± 0.20 (14 <sup>th</sup> day)	0.34 ± 0.30 (6 <sup>th</sup> day)
	NS	18.67 ± 0.16 (6 <sup>th</sup> day)	3.18 ± 0.17 (6 <sup>th</sup> day)	3.44 ± 1.50 (8 <sup>th</sup> day)
Orange peels	NS without pectin	43.74 ± 1.78 (8 <sup>th</sup> day)	16.90 ± 1.40 (14 <sup>th</sup> day)	2.79 ± 0.54 (11 <sup>th</sup> day)
Grape pomace and orange peels mixture (1:1)	NS without pectin	32.69 ± 3.94 (6 <sup>th</sup> day)	3.77 ± 0.87 (4 <sup>th</sup> day)	5.35 ± 0.10 (10 <sup>th</sup> day)

*Table 1.1: Maximum activities produced by *Aspergillus awamori* fermentation on grape pomace, orange peels or a mixture 1:1 of both residues, using different moistening agent. NS: nutrient solution.*

## CHAPTER 2

### **Bioreactors design for the production of hydrolytic enzymes by solid state and submerged fermentations**

#### **Abstract**

Previous studies demonstrated that *Aspergillus awamori* on a mixture of grape pomace and orange peels produces pectinases, xylanases and cellulases by solid state fermentation (SSF). In order to evaluate the production of these enzymes in laboratory-scale bioreactors, a packed bed, a tray and a rotating drum fermentor were used. Different air flow rates were tested demonstrating a positive effect of this parameter on enzyme activity. In SSF, the rotating drum was found to be the best bioreactor for the production of the highest enzyme activity level, working in static or with an agitation of 1 min/day, using an aeration of 120 mL/min. A stirred tank bioreactor was also tested to evaluate the enzyme production in submerged fermentation attaining higher yields than in SSF, however, enzymatic extract is obtained in a more diluted form and an additional concentration step should be required in this case.

#### **2.1. INTRODUCTION**

Solid state fermentation (SSF) involves the growth of microorganisms on moist solid substrates in the absence of visible water between the substrate particles.<sup>37</sup> Compared to submerged fermentation (SmF), the solid media used in SSF contain less water but

---

<sup>37</sup> Pandey, A.; Soccol, C.; Rodriguez-Leon, J.; Nigon, P. (2002). Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. Asiatech Publishers, New Delhi.

an important gas phase exists between the particles.<sup>38</sup> This feature is of great importance because of the poor thermal conductivity of the air compared to the water.

There is a wide variety of matrices used in SSF which vary in terms of composition, size, mechanical resistance, porosity and water holding capacity. All these factors can affect the reactor design and the control strategy for the parameters.

As a result of the low water activity in SSF bioreactors, more concentrated products are produced and smaller fermenters are required, simultaneously reducing energy requirements for downstream processing.<sup>39,40</sup> However, this technique shows several disadvantages over SmF, which have discouraged its use for industrial applications.<sup>41</sup> One of the major obstacles is the limited knowledge related to the design and operation of large-scale bioreactors.<sup>42,43</sup> Difficulties in controlling important culture parameters, such as mass transfer and heat removal have not been overcome completely.<sup>44</sup> The low moisture and poor thermal conductivity of the substrate make heat transfer and temperature control difficult in SSF.<sup>45</sup>

---

<sup>38</sup> Durand, A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 2, 113-125.

<sup>39</sup> Robinson, T.; Singh, D.; Nigam, P. (2001). Solid state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**, 284–289.

<sup>40</sup> Robinson, T.; Nigam, P. (2003). Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 197–203

<sup>41</sup> Hölker, U.; Höfer, M.; Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**, 175–186.

<sup>42</sup> Ashley, V.; Mitchell, D.; Howes, T. (1999). Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, **3**, 141–150.

<sup>43</sup> Durand, A.; Chereau, D. (1987). A new pilot reactor for solid-state fermentation: Application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnology and Bioengineering*, **31**, 5, 476-486.

<sup>44</sup> Fujian, X.; Hongzhang, C.; Zuohu, L. (2002). Effects of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **30**, 45–48.

<sup>45</sup> Bhargav, S.; Panda, B.; Ali, M. (2008). Solid-state Fermentation: An Overview. *Chemical and Biochemical Engineering*, **22**, 49–70.

Many bioreactors have been traditionally used in SSF processes. These can be mainly classified in two groups: the ones which show an agitation system and the ones which work in static conditions. The first category comprises the rotating drum, the gas-solid fluidized bed, the rocking drum, the horizontal paddle mixer, etc, while the second one includes the packed-bed and the trays bioreactors. Static beds are required when the substrate bed must remain static throughout the growth phase or when the substrate particles have to be knitted together by the fungal mycelium, such as in the production of fermented foods like Tempeh.<sup>46</sup> On the other hand, the use of mixed bioreactors improves the homogeneity of the bed and ensures an effective heat and mass transfer.<sup>45</sup> Continuous mixing with addition of water is advantageous for simultaneous control of temperature and moisture in large-scale SSF. However, the shear forces caused by rotation and agitation damage or disrupt fungal mycelia and reduce the porosity of the substrates.<sup>44,47,48,49</sup>

A bioreactor system could be designed to improve mass and heat transfer, facilitate the substrate preparation, its sterilization and the biomass one after product recovery, inoculation, loading and unloading of the bioreactor as also product recovery. While trays and drum type fermentors have been studied and used for a long time, much focus has been paid in the last few years on developing packed bed fermenters as they could provide better process economics and a great deal of handling ease.<sup>3,</sup>

,50,51,52,53

---

<sup>46</sup> Mitchell, D.; von Meien, O. (2000). Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the Zymotis packed-bed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**, 2, 127-135.

<sup>47</sup> Oostr, J.; Tramper, J.; Rinzema, A. (2000). Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minutans* spores on oats. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 652–663.

<sup>48</sup> Ramesh, M.; Lonsane, B. (1990). Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus Licheniformis* in a solid-state fermentation system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **33**, 501–505.

<sup>49</sup> Fernandez, M.; Perez-Correa, J.; Solar, I.; Agosin, E. (1996). Automation of a solid-state substrate cultivation pilot reactor. *Bioprocess Engineering*, **16**, 1–4.

<sup>50</sup> Hardin, M.; Howes, T.; Mitchell, D. (2001). Residence time distributions of gas flowing through rotating drum bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **74**, 145–153.

One of the most important parameters to control in a SSF bioreactor is the aeration, which lets the temperature control during the fermentation by adjusting the flow rate during evaporative cooling. This method has proven to be more efficient than convection and conduction.<sup>54,55</sup> It results, however, in large moisture losses and drying of the solid substrate.<sup>56</sup> Therefore, it is essential to combine temperature and moisture control, mainly in large-scale SSF systems.<sup>57</sup>

The aim of this chapter is to evaluate the production of pectinase (exo-PG), xylanase and cellulase (CMC-ase) by *Aspergillus awamori* through SSF, in three configurations of bioreactors, and SmF using a mixture of grape pomace and orange peels as substrate. Moreover, the effect of different air flow rates in the enzyme production was analysed in the SSF bioreactors, together with the agitation speed effect in the rotating drum.

## 2.2. MATERIALS AND METHODS

### 2.2.1. Solid state fermentation (SSF)

Solid state fermentations were carried out in three different bioreactors: a packed bed, a tray and a rotating drum.

---

<sup>51</sup> Lu, M.; Maddox, I.; Brooks, J. (1998). Application of a multi-layer packed-bed reactor to citric acid production in solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, **33**, 117–123.

<sup>52</sup> Carrasco, T.; Valino, E.; Medina, I.; Ravelo, D. (1999). Design and evaluation of a bioreactor for solid state fermentation. *Cuban Journal of Agricultural Science*, **33**, 409–414.

<sup>53</sup> Lillo, M.; Perez-Correa, R.; Agosin, E.; Latrille, E. (2001). Indirect measurement of water content in an aseptic solid substrate cultivation pilot-scale bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **76**, 44–51.

<sup>54</sup> Laukevics, J.; Apsite, A.; Viesturs, U.; Tengerdy, R. (1984). Solid-substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 1465–1474.

<sup>55</sup> Sargantanis, J.; Karim, M.; Murphy, V.; Ryoo, D.; Tengerdy, R. (1993). Effect of operating conditions on solid-substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **42**, 149–158.

<sup>56</sup> Narahara, H.; Koyama, Y.; Yoshida, T.; Atthasampunna, P. (1984). Control of water content in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation Technology*, **62**, 453–459.

<sup>57</sup> Lonsane, B.; Saucedo-Castaneda, G.; Raimbault, M.; Roussos, S.; Viniegra- Gonzalez, G.; Ghildyal, N. (1992). Scale-up strategies for solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **27**, 259–273.

### 2.2.1.1. Inoculum

*Aspergillus awamori* was kept in a synthetic medium for fungal growth composed of (g/L): 1 peptone, 0.5 yeast extract, 15 agar, 6 xylan and 1 pectin at 4°C. After 5 days of incubation at 30°C, the spores were suspended in NaCl (0.9%). The complete protocol to obtain the inoculum was described in Chapter 1 (section 1.2.1).

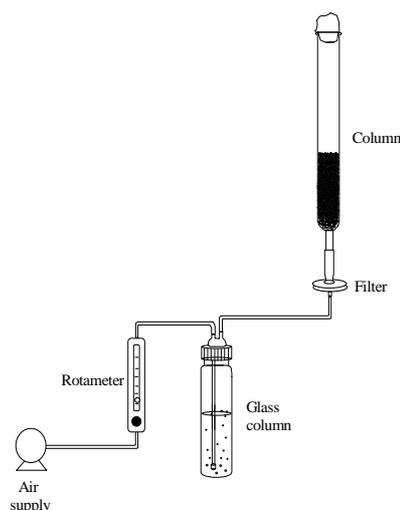
### 2.2.1.2. Media of fermentation

The solid used for the fermentations was a mixture 1:1 (w/w) of washed white grape pomace and orange peels, which provided high enzyme activities in the experiments carried out in petri dish (see section 1.3.3). The preparation of these solids was explained in Chapter 1 (section 1.2.2). They were mixed and sterilised in an autoclave (120°C, 20min).

The initial moisture content of the solid substrate was previously adjusted to 70% (w/w) with a nutrient solution constituted (g/L) of 2.4 urea, 9.8 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5.0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.001 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0008 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.004 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 0.001 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O. The pH of this solution was adjusted at 5.

### 2.2.1.3. Packed bed bioreactor

The fermentor consists of a glass column (Ø 2.5 cm, length 40 cm) connected to a filtered-air supply. The air flow is measured by a rotameter, then it is humidified and finally, it is sterilized by passing through a 0.45 µm cellulose filter (Figure 2.1). The humidifier system is based on a glass column filled with sterilized distilled water.



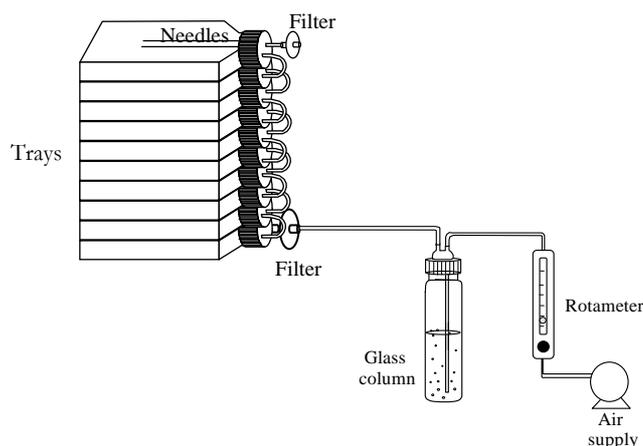
**Figure 2.1: Laboratory-scale packed bed bioreactor.**

The column was filled with 10 g of solid substrate pre-inoculated with  $4.5 \cdot 10^8$  spores/g. The bed reaches a length of 13 cm. The reactor was incubated at 30°C for 5 days.

The effect of aeration in the production of xylanase, exo-PG and CMC-ase was evaluated in the packed bed bioreactor. For this purpose, different air flow rates were tested: 0, 6, 60, 90, 120, 180 and 300 mL/min.

#### 2.2.1.4. Trays bioreactor

A SSF plate-type bioreactor was built with ten sterile 250 mL roux flasks (henceforth referred to as ‘plates’ for convenience) interconnected for water saturated aeration (Figure 2.2). The reactor is connected to a filtered-air supply, entering sterile air into the first plate and leaving the reactor at the tenth plate after passing through the whole reactor. The air flow is measured by a rotameter, then it is humidified and finally, it is sterilized by passing through a 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose filter. The humidifier system used is the one described for the packed bed bioreactor.



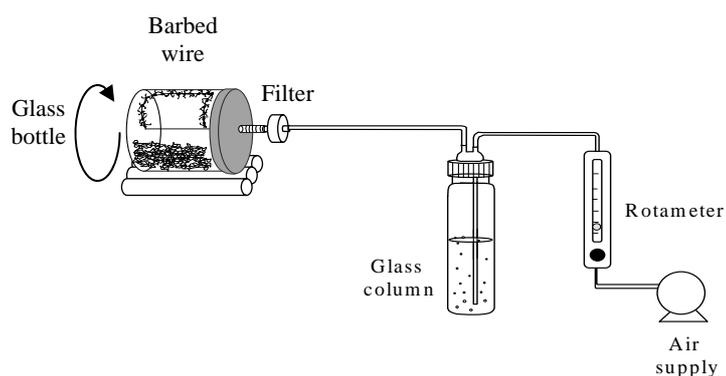
**Figure 2.2: Laboratory-scale trays bioreactor.**

For the fermentations, 10 g of solid substrate pre-inoculated with  $4.5 \cdot 10^8$  spores/g were added to each plate. The system was incubated at 30°C for 5 days.

The effect of aeration in the production of xylanase, exo-PG and CMC-ase was evaluated in the trays bioreactor. For this purpose, different air flow rates were tested: 9, 120, 200 and 300 mL/min.

#### 2.2.1.5. Rotating drum

The fermentor consists on a 250 mL glass roller bottle ( $\varnothing$  7 cm) connected to a filtered-air supply. Air flow is measured by a rotameter, then it is humidified and finally, it is sterilized by passing through a 0.45  $\mu$ m cellulose filter (Figure 2.3). The humidifier system used is the one described for the packed bed bioreactor. The air is introduced in the bottle through a needle, which is assembled to a barbed wire to remove the solid stuck in the bottle.



**Figure 2.3: Laboratory-scale rotating drum bioreactor.**

For the experiments carried out in agitation, the bottle is placed in a roller system composed of 5 cylinders which rotate continuously. In this way, the mixture of the media of fermentation is produced as consequence of the movement of the bottle.

For the fermentations, 10 g of pre-inoculated solid substrate with  $4.5 \cdot 10^8$  spores/g were added to the bottle. The bed reached a length of 2.5 cm leaving enough space to obtain good agitation. The system was incubated at 30°C for 5 days.

The effects of aeration and agitation in the production of xylanase, exo-PG and CMC-ase were evaluated in the rotating drum. For this purpose, the air flow rates of 0, 9, 120 and 200 mL/min were tested in static and with different kind of agitation: constant and intermittent (one agitation of 1 min/day and 2 agitations of 10 min/day).

#### *2.2.1.6. Extraction conditions*

After the fermentation, the media was spilled in an Erlenmeyer flask containing 70 mL of Tween 80 (0.01%) and then stirred in a rotary shaker at 150 rpm for 30 min at

4°C. For the trays bioreactor, the content of each plate was extracted independently obtaining 10 different extracts. The conditions of extraction were optimized in a previous work.<sup>29</sup>

The suspension resulting after the extraction was centrifuged at 10000 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatant obtained –the enzymatic extract- was stored at -20°C until required for analysis.

In each sample, the concentration of reducing sugars, the pH and xylanase, exo-PG and CMC-ase activities were evaluated.

#### *2.2.1.7. Enzyme assays*

Enzyme activities were analysed by using the methodology described in Chapter 1 (section 1.2.5). They were expressed in activity units per gram of dry solid (IU/gds). A unit of enzyme activity (IU) was defined as the amount of enzyme producing 1 µmol of reducing sugars per minute at the conditions used in the enzyme test.

### **2.2.2. Submerged fermentation (SmF)**

#### *2.2.2.1. Media of fermentation*

The solid used for the fermentation was a mixture 1:1 (w/w) of washed white grape pomace and orange peels suspended in a nutrient solution, which pH was adjusted at 3. The composition of this solution was (g/L): 2.4 urea, 9.8 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5.0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.001 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0008 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.004 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 0.001 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O.

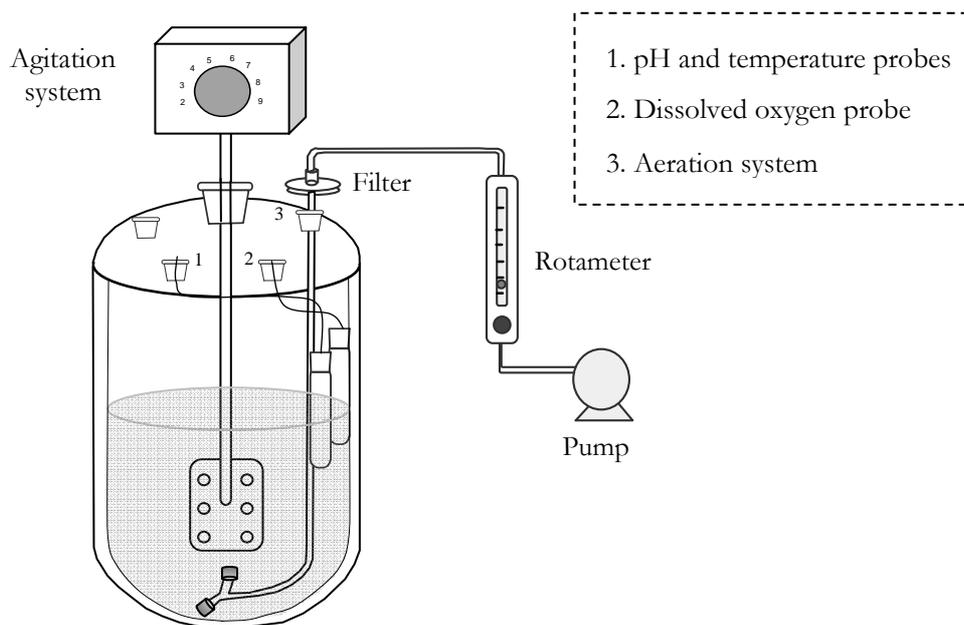
A proportion solid-solution of 20 g/L was used in the fermentation. The solid and the solution were sterilized separately in the autoclave.

#### *2.2.2.2. Inoculum*

A volume of 100 mL of a solution composed of (g/L) 2.4 urea, 9.8 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5.0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.001 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0008 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.004 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1 peptone, 0.5 yeast extract, 3.5 xylan, 3.5 pectin (xylanase and pectinase inducers) and 50 glucose was spilled in a 500 mL erlenmeyer flask, being inoculated with 3·10<sup>7</sup> spores. The flask was incubated in a rotary shaker at 30°C and 200 rpm for 5 days. After this time, the pellets obtained were filtered through a nylal cloth and were used to inoculate the fermentor.

#### *2.2.2.3. Stirred tank batch reactor*

The reactor consists on a 5 L vessel (2.5 L volume work), which has probes for pH, dissolved oxygen and temperature control. The pH was maintained at 3 by the addition of HCl 1 M after taking the sample. The vessel is equipped with a water jacket to maintain the temperature at 30°C and it is connected to a filtered-air supply. The flow rate was set at 1 vvm, introducing the air through two diffusers situated in the lowest part of a stainless steel tube. The agitation of the media was provided by a stainless steel paddle stirrer, maintaining the rotation speed constant at 120 rpm. The reactor was sterilized with water steam stream for 30 min.



*Figure 2.4: Laboratory-scale stirred tank bioreactor.*

Fermentations were carried out for 8 days, withdrawing samples every day, which were centrifuged (10000 rpm, 4°C) for 10 min to remove the pellets and the solids. In each sample, the concentration of reducing sugars, the pH and xylanase, exo-PG and CMC-ase activities were evaluated. The enzyme assay used was the same one described for SSF extracts.

## 2.3. RESULTS AND DISCUSSION

### 2.3.1. Solid state fermentation

The concentration of reducing sugars, pH and xylanase, exo-PG and CMC-ase activities were analysed in the extracts obtained from the bioreactors in the different conditions evaluated. Different air flow rates were tested in order to identify the best

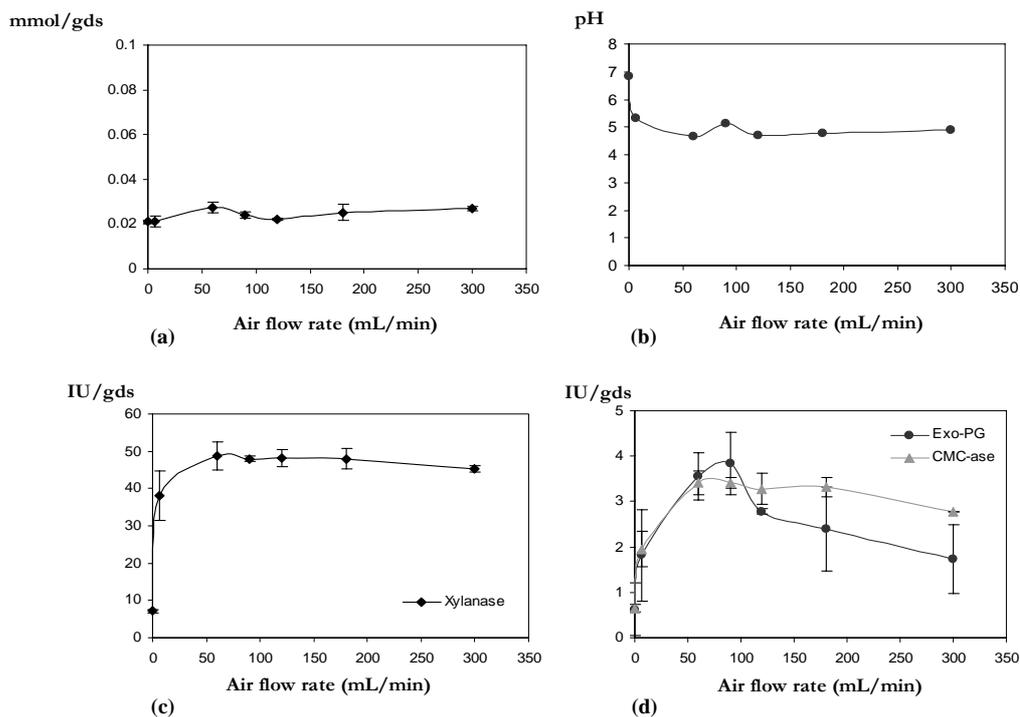
aeration for the production of the highest enzyme activities in the bioreactors described above. The effect of type of agitation was also evaluated in the rotating drum fermentor. As every experiment was made in duplicate, confidence limits for a probability of 95% were also calculated.

#### *2.3.1.1. Packed bed*

The concentration of reducing sugars obtained after the utilization of different air flow rates was very similar (Figure 2.5 (a)). An important consumption was produced with all the flow rates tested. Thus, good growth was obtained in all the conditions, even when forced aeration was not used.

The pH analysed with all the flow rates was very similar (between 4.66 and 5.31), with the exception of the experiment carried out without aeration, obtaining a value of 6.82 (Figure 2.5 (b)).

Enzyme activities are shown in Figure 2.5, observing a significant effect of the aeration on the production of the studied enzymes. An increase on the flow rate from 0 to 60 mL/min resulted in increases of xylanase on 41.55 IU/gds. The positive effect of aeration on xylanase production was up to 60 mL/min, above this flow rate the activity was kept practically constant. A similar situation was observed with exo-PG and CMC-ase (Figure 2.5 (d)). The enzyme activities increased with air flow rate, however, above 90 mL/min they decreased slightly. The highest exo-PG and CMC-ase activities obtained were 6.2 and 5.3 times higher, respectively, than the ones analysed without force aeration.



**Figure 2.5: Results obtained after SSF in the packed bed using different air flow rate: reducing sugars concentration (a), pH (b), xylanase activity (c) and exo-PG and cellulase activities (d).**

The effect of aeration on enzyme activity observed could be explained considering that increases in aeration rate decrease the temperature of the culture medium and, consequently, it reduces the enzymatic denaturalization.<sup>58</sup> However, with an additional air supply it's difficult to maintain the level of medium moisture, which affects the enzyme production.<sup>59</sup> In fact, the production of xylanase and exo-PG by *Aspergillus awamori* through SSF on grape pomace is lower using initial moisture contents below 65%.<sup>27</sup> Lower moisture levels lead to reduced diffusion of the nutrients in the solid substrate, lower degree of swelling and higher water tension.

<sup>58</sup> Linde, G.; Magagnin, G.; Vieira, J.; Bertolin, T.; Barros, N. (2007). Column bioreactor use for optimization of pectinase production in solid substrate cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*, **38**, 557-562.

<sup>59</sup> Milagres, A.; Santos, E.; Piovan, T.; Roberto, I. (2004). Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. *Process Biochemistry*, **39**, 11, 1387-1391.

When force aeration was not used, reducing sugars consumption was detected but high enzyme activities were not registered. In these conditions, it's more difficult the heat and CO<sub>2</sub> removal, affecting the fungus growth and, in consequence, the enzyme production.

Similar results were obtained for Milagres et al., who established an important effect of the air flow rate on xylanase production using a packed bed fermentor.<sup>59</sup> The highest enzyme activity was attained with an intermediate flow rate, however, with higher aerations the activity decreased. In these conditions, the reduction of the initial moisture content from 80% to 50% after 48 h resulted in lower xylanase production.

#### *2.3.1.2. Trays bioreactor*

The evolution of the reducing sugars through the column was different depending on the air flow rate used (Figure 2.6 (a)). The flow rates of 9 mL/min and 200 mL/min didn't provide aeration to all the trays because a high concentration of reducing sugars was detected in the last plates. Whereas the flow rate of 9 mL/min was very low to aerate the column of trays efficiently, with 200 mL/min the pipes were blocked after the condensation of water evaporated from the substrate.

The concentration of reducing sugars analysed with 120 and 300 mL/min was very low in all the trays, around 0.020 mmol/gds, which showed that fungus growth had been produced in the whole column.

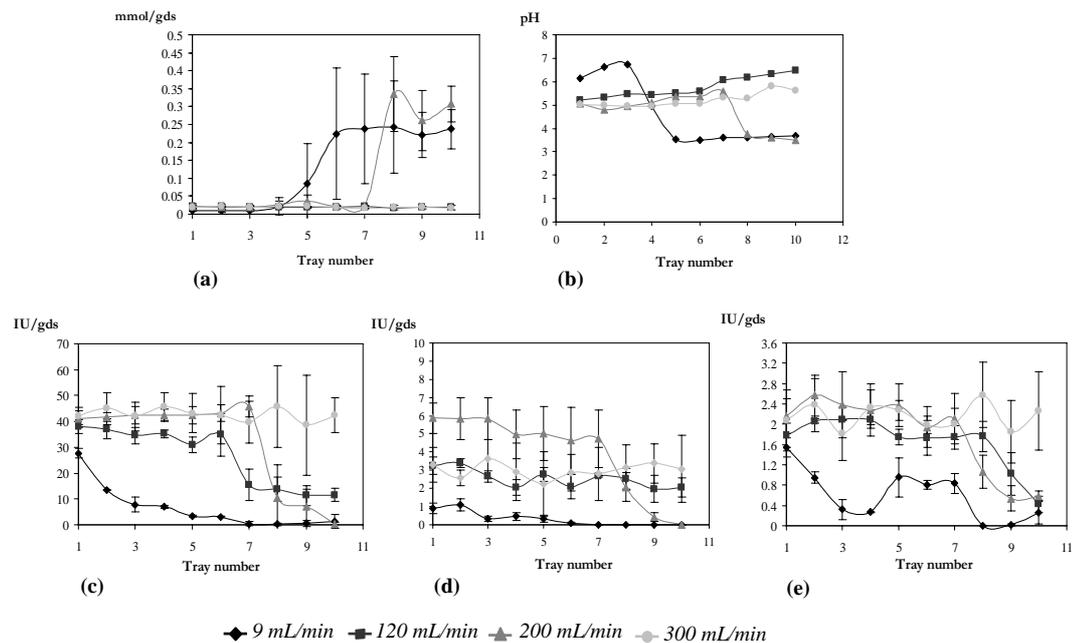
A similar situation was observed for the pH (Figure 2.6 (b)). In the experiments carried out at 9 and 200 mL/min, the last plates showed a value below 3.7, which is the typical pH of the substrate before the fermentation. This fact confirms that growth had not been produced in all the plates with 9 and 200 mL/min.

Xylanase activity was not detected in the last plates when the flow rates of 9, 120 and 200 mL/min were used (Figure 2.6 (c)). These results were expected for the aeration of 9 and 200 mL/min, since a high concentration of reducing sugars were measured in those trays. For the flow rate of 120 mL/min, the blockage of the pipes with the evaporated water from the solid was also observed in the last plates. The fact of measuring a low concentration of reducing sugars pointed out that it was produced after the fungus started growing; however, it had not started the production of xylanase.

The maximum xylanase activity ( $45.73 \pm 9.93$  IU/gds) was analysed using an air flow rate of 300 mL/min, keeping practically constant through the column. The same situation was observed with CMC-ase, being necessary to apply a flow rate of 300 mL/min to obtain enzyme activity in all the plates (Figure 2.6 (e)). Moreover, this aeration provided the maximum activity of  $2.58 \pm 0.64$  IU/gds.

The highest exo-PG activities were attained with 200 mL/min, however, activity wasn't observed in all the plates for the same reason described for the other enzymes (Figure 2.6 (d)). The application of air flow rates of 120 or 300 mL/min led to the production of exo-PG activity in all the trays. Thus, the blockage of the pipe observed with 120 mL/min was produced after the fungus growth and the release of exo-PG. The highest exo-PG activity of  $3.62 \pm 1.06$  IU/gds was measured with 300 mL/min.

In conclusion, aeration showed an important effect on enzyme production. In this way, an increase on the air flow rate from 9 to 300 mL/min resulted in increases of maximum xylanase, exo-PG and CMC-ase activities on 1.7, 3.2 and 1.7 times, respectively.



**Figure 2.6:** Results obtained after SSF in the trays bioreactor using different air flow rate: reducing sugars concentration (a), pH (b), xylanase activity (c), exo-PG activity (d) and cellulase activity (e).

There isn't much information in the literature in relation to the production of these enzymes using a tray bioreactor. Rosales et al. compared different fermentor configurations for the production of laccase, attaining the highest activities with a tray bioreactor. This fact was explained for the authors considering that the absence of agitation didn't cause mechanical stress to the fungus.<sup>60</sup>

### 2.3.1.3. Rotating drum

The concentration of reducing sugars analysed in all the extracts was very low, around 0.020 mmol/gds, with the exception of the experiments carried out without

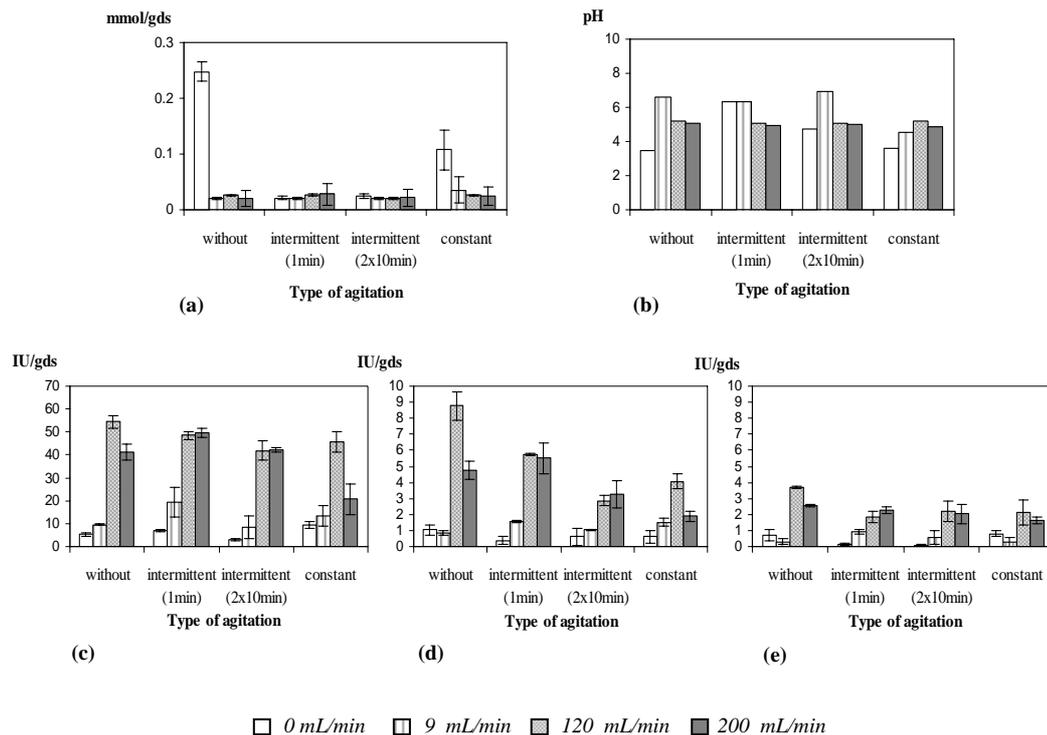
<sup>60</sup> Rosales, E.; Rodríguez, S.; Sanromán, M. (2007). Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1286–1290.

force aeration in static and with constant agitation (Figure 2.7 (a)). In these situations, reducing sugars were not consumed because the fungus didn't grow properly. When the media was not agitated neither aerated it could be explained considering that there wasn't enough oxygen to obtain good growth. In relation to the experiment carried out without aeration in constant agitation, the mycelium and the substrate particles were agglomerated. In these conditions, the heat, mass and oxygen transfers were greatly reduced, affecting the fungus growth.

The pH values of the extracts agreed with the results of the reducing sugars (Figure 2.7 (b)). The experiments carried out without force aeration, in static and with constant agitation, showed a pH of 3.5, which is the typical value of the substrate before the fermentation. This fact confirms that good growth had not been produced in these conditions.

In Figure 2.7 (c) it can be observed that the air flow rate influenced xylanase production with the highest activities observed with aeration rates of 120 and 200 mL/min. On the other hand, the effect of agitation on xylanase production depended on the air flow rate used. When force aeration wasn't applied, the xylanase activities measured were very low and similar with all the types of agitation used. In these conditions the fungus was not provided with enough oxygen to grow properly and produce enzymes. The maximum xylanase activity at 9 mL/min ( $19.52 \pm 6.39$  IU/gds) was attained with an intermittent agitation of 1 min/day and the lowest ones when the media of fermentation was mixed more often. At low flow rates, a soft aeration could improve O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> transfer; however, a more frequent agitation could damage fungal cultures as a consequence of the shear forces during mixing. A similar effect was observed with 120 mL/min, analysing the lowest xylanase activity when the system was agitated twice a day and continuously. However, this flow rate provided enough oxygen for the metabolism of the fungus and, in consequence, for

xylanase production because it wasn't necessary to agitate the system to reach the maximum activity of  $54.42 \pm 2.88$  IU/gds. This value is 10 times higher than the one obtained in the same conditions without force aeration. Moreover, it was of the same order of magnitude that the maximum attained with the flow rate of 200 mL/min. Thus, a flow rate of 120 mL/min was enough to produce the highest xylanase activity.



**Figure 2.7: Results obtained after SSF in the rotating drum at different air flow rate using different type of agitation: reducing sugars concentration (a), pH (b), xylanase activity (c), exo-PG activity (d) and cellulase activity (e).**

The type of agitation didn't show an important effect on exo-PG and CMC-ase production with 0 and 9 mL/min, moreover, low activities were measured under these conditions of aeration. As it happened for xylanase, the maximum exo-PG and CMC-ase activities ( $8.77 \pm 0.88$  and  $3.69 \pm 0.05$  IU/gds, respectively) were attained using a flow rate of 120 mL/min. This aeration provided enough oxygen for the

metabolism of the fungus and, in consequence, for the enzyme production being unnecessary the agitation of the system. The application of a higher flow rate didn't increase exo-PG and CMC-ase production. The highest exo-PG and CMC-ase activities, obtained with 200 mL/min were analysed when the system was not agitated or it was done 1 min/day. A more frequent agitation could damage fungal cultures as a consequence of the shear forces during mixing.

The production of enzymes using a rotating drum has been reported by other authors. For example, Kalogeris et al. used a laboratory-scale rotating drum to study the effect of air flow in cellulases and hemicellulases production.<sup>61,62</sup> The results revealed that high aeration favoured both biomass and enzyme production. However, there was a maximum air flow rate above which the enzyme recovery didn't enhance. This fact could be explained considering the difficulty of maintaining the substrate moisture content at high flow rates.

#### 2.3.1.4. Comparison of the SSF bioreactors

The maximum enzyme activities were attained with the rotating drum in static conditions using an air flow rate of 120 mL/min. Although this reactor was designed to work in agitation, the best results were reached in static or with low agitation (1min/day). The slight improvement of the enzyme production with this reactor could be explained because of the effective aeration of the media. On the other hand, the aeration in the packed bed reactor could have been less efficient because of the compaction of the bed, creating air channelling, shrinkage, etc, which affect heat and mass transfer and, in consequence, the enzyme production. This problem was

---

<sup>61</sup> Kalogeris, E.; Fountoukides, G.; Kekos, D.; Macris, B. (1999). Design of a solid-state bioreactor for thermophilic microorganisms. *Bioresource Technology*, **67**, 313–315.

<sup>62</sup> Kalogeris, E.; Iniotaki, F.; Topakas, E.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris, B. (2003). Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Bioresource Technology*, **86**, 3, 207-213.

avoided in the trays bioreactor using a narrow bed, making easier the aeration between particles. However, in spite of the first plate of the trays bioreactor should behave as the rotating drum in static (using the same air flow rate), the first one provided lower activities. With regard to this fact, it's important to point out that the material of the two reactors (plastic or glass), its thickness and its shape necessary affect the heat transfer and, consequently, the enzyme production.

Another fact to consider is that the necessary air flow rate to reach the highest enzyme activities depends on the type of reactor used and the enzyme of interest.

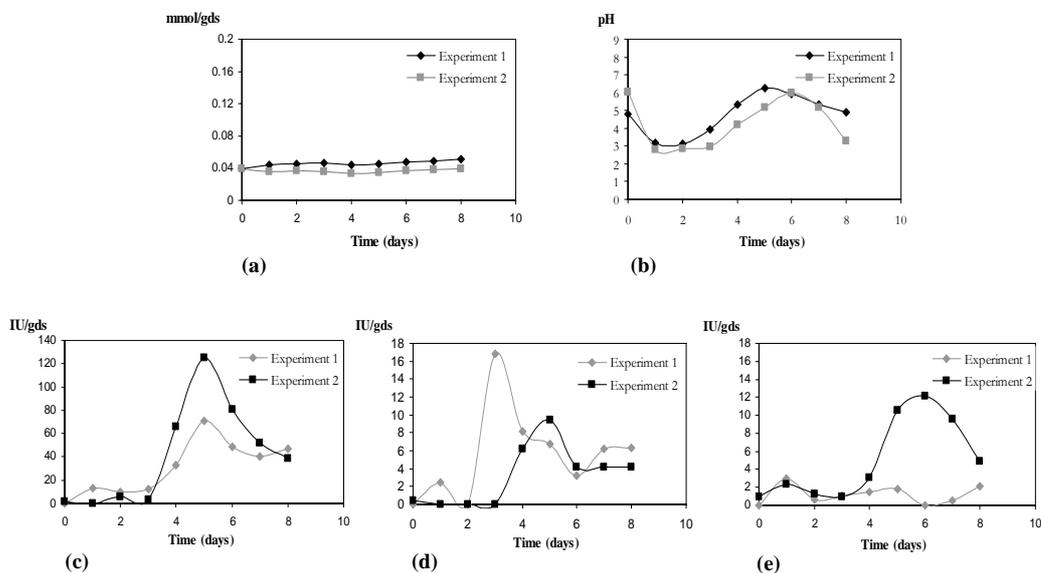
In conclusion, good results were achieved in terms on enzyme activity with the three types of SSF bioreactors evaluated (packed bed, tray and rotating drum) using the adequate aeration rate, standing out the ones registered for xylanase. So, anyone could be borne in mind for the scale up of the process, considering others factors such as the heat removal, the moisture maintenance, the agitation, etc.

### **2.3.2. Submerged fermentation**

Two sets of experiments were carried out in the stirred tank bioreactor in the same conditions of fermentation, measuring temporal evolution of pH, reducing sugars concentration and xylanase, exo-PG and CMC-ase activities.

Results obtained in the stirred tank bioreactor are included in Figure 2.8. The concentration of reducing sugars was very low and it was kept practically constant during the fermentation, obtaining the highest value the 8<sup>th</sup> day (between 0.039 and 0.051 mmol/gds) (Figure 2.8 (a)). In relation to the pH, the values were measured just before the addition of HCl (see Material and Methods). At the beginning of the fermentation the pH was below 4, however, after the 3<sup>rd</sup> day it started increasing

(Figure 2.8 (b)). This fact could be explained considering the utilisation of organic acids by the fungus as carbon sources when the sugar is limited.<sup>32</sup> The last days, a slightly decrease of the pH was produced.



**Figure 2.8:** Temporal evolution of reducing sugars (a), pH (b) and enzyme activity (xylanase (c), exo-PG (d) and CMC-ase (e)) in the stirred tank bioreactor with the two solids in suspension.

Xylanase production increased as long as the time of fermentation went on (Figure 2.8 (c)). The maximum value was measured at the 5<sup>th</sup> day, analysing an activity between 70.52 and 125.47 IU/gds.

Several papers have been published in relation to the production of xylanase by SmF. For example, Siedenberget al. evaluated the production of xylanase in a 1.5 L stirred tank bioreactor, similar to the one described in the present work.<sup>63</sup> The fermentations were carried out at 25°C, 1 vvm and pH control at 4.5. In this case, the addition of

<sup>63</sup> Siedenberget al. (1997). Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on complex medium in stirred tank and airlift tower loop reactors. *Journal of Biotechnology*, **56**, 205–216.

xylan was necessary to induce the enzyme production, measuring a maximum activity of 30 U/g of dried biomass with 400 rpm after 170 h of fermentation.

The highest exo-PG activity measured was situated within the interval 9.46-16.77 IU/gds, analysed between the 3<sup>rd</sup> and the 5<sup>th</sup> day of culture (Figure 2.8 (d)).

Oncu et al. used a reactor similar to the one described in this work to study the production of pectinases.<sup>64</sup> These authors analysed the highest activities after 48 h of fermentation when the pH was not controlled, the dissolved oxygen concentration was of 50% and the stirring rate of 200 rpm.

The CMC-ase evolution was different in the two set of experiments. So, whereas the activity was kept practically constant in the first set, between 0.53 and 3.01 IU/gds, in the second one attained a maximum of 12.17 IU/gds after 6 days of incubation (Figure 2.8 (e)). As for the experiments carried out in SSF, the lowest values were measured for this enzyme.

The maximum enzyme activities reached in the stirred tank batch reactor with the conditions of operation used were higher than the ones analysed in the SSF ones.

This fact could be explained considering that the removal of the metabolic heat generated during growth was easier in the aqueous solution than in the solid. Although the transfer of oxygen is higher in SSF, the diffusion of solutes and substrates is lower, and this fact interferes with microbial growth.<sup>65</sup> Moreover, during SSF pH was not controlled, measuring in some cases values close to 7.

---

<sup>64</sup> Oncu, S.; Unluturk, S.; Tari, C.; Gogus, N.(2006).Various factors affecting the pellet morphology, broth reology and pectinase enzyme production in submerged fermentation of *Aspergillus sojae*. 13th World Congress of Food Science & Technology.

<sup>65</sup> Graminha, E.; Gonçalves, R.D.; Pirota, R.; Balsalobre, M.; Da Silva, R.; Gomes, E. (2007). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, **144**, 1, 1-22.

However, SmF shows as disadvantage that the enzymatic extract, which is directly obtained from the bioreactor, is quite diluted and an additional concentration step is required. So, for example, the maximum xylanase activity reached with the stirred tank bioreactor was 1.96 IU/mL, whereas the one measured with the rotating drum in static at 120 mL/min had a value of 6.47 IU/mL. Moreover, reproducible enzyme activities were not obtained in the stirred tank bioreactor.

It's necessary to point out that to choose a model of fermentation (SSF or SmF), other parameters which affect the global productivity should be borne in mind such as costs and time of operation, reactor volume, effluents volumes, etc.

## 2.4. CONCLUSIONS

Three laboratory-scale bioreactors for SSF and one for SmF were designed and operated for the production of hydrolytic enzymes. In the SSF reactors used, the air flow rate shows a positive effect on enzyme production, which enhances when the aeration increases. However, there is a maximum air flow rate above which enzyme recovery doesn't improve. This maximum is different depending on the reactor. In the packed bed, the maximum air flow rate is 60 mL/min for xylanase, whereas it has a value of 90 mL/min for exo-PG and CMC-ase. In the trays bioreactor, it's necessary to apply an aeration of 300 mL/min to obtain activity of the studied enzymes in all the plates. The highest enzyme production is analysed with the rotating drum at 120 mL/min in static conditions or with an agitation of 1 min/day.

The stirred tank bioreactor produces higher enzyme yields than the ones measured in SSF fermentors, however, enzymatic extract is more diluted and an additional concentration step should be required in this case. Moreover, reproducible enzyme activities aren't obtained using the stirred tank reactor.



---

## CHAPTER 3

### **Characterization, concentration and partial purification of xylanase and exo-PG produced by solid state fermentation**

#### **Abstract**

The characterization and partial purification of xylanase and exo-poligalacturonase (exo-PG) produced by solid state fermentation (SSF) on a mixture of grape pomace and orange peels was carried out. The xylanase was very stable in a wide range of pH, retaining more than 100% of its activity between pH 3.0 and 9.0. On the other hand, a pH 4 turned out to be the optimum for the exo-PG. Both enzymes were strongly inhibited by  $\text{Hg}^{2+}$ , however, the exo-PG activity increased with  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  in a 83 and 77%, respectively. Both enzymes were concentrated by precipitation with ethanol or acetone and by lyophilisation. On the contrary, ammonium sulphate precipitation turned out to be the worst concentration method. The concentrated extract provided a better grade of clarification than commercial crude enzymes commonly used in wine cellars in filtration and clarification stages. The studied enzymes were partially purified from the fermentation broth by DEAE-cellulose (diethyl aminoethyl cellulose) column, showing more purity than commercial crude enzymes.

#### **3.1. INTRODUCTION**

Xylanases and polygalacturonases are hydrolytic enzymes which have a great application.<sup>66</sup> For example, xylanases are commercially used in pulp, paper, food and animal feed industries while polygalacturonases are useful in industrial applications

---

<sup>66</sup> Díaz, A.; Caro, I.; de Ory, I.; Blandino, A: (2005). Recovery of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation of grape pomace with *Aspergillus awamori*. *Chemical Engineering Transactions*, 911-916.

such as processing aids for extraction, clarification and deproteinization of fruit juices, for maceration of fruits and vegetables and in the production of oligogalacturonides as functional food components.<sup>27,67,68</sup>

Since applications of these enzymes in various fields are widening, it is important to understand their nature and properties for efficient and effective uses. For the past few years, vigorous research has been carried out in the isolation and characterization of xylanases and pectinases. Stability studies provide valuable information about structure and function of enzymes. Enhancing the stability and maintaining the desired level of activity over a long period are two important points to consider for the selection and design of enzymes.<sup>69</sup> The stability of the enzymes is affected by both physical (pH and temperature) and chemical parameters (inhibitors or activators).

One of the most important applications of xylanases is the bleaching of pulp and paper in the kraft process.<sup>70,71,72</sup> Since it is carried out in the alkaline range, xylanases resistant to these conditions are required. Many xylanases from a vast array of organisms have been characterised and evaluated and only a few are optimally active either at elevated temperature or alkaline conditions.<sup>73,74,75</sup>

---

<sup>67</sup> Tengerdy, R.; Szakacs, G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 169–179.

<sup>68</sup> Lang, C.; Dornenburg, H. (2000). Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Applied and Microbiological Biotechnology*, **53**, 366–375.

<sup>69</sup> Sathyanarayana, N.; Gummadi, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases-a review. *Process Biochemistry*, **38**, **7**, 987-996.

<sup>70</sup> Gessesse, A.; Gashe, B. (1997). Production of alkaline xylanase by an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from an alkaline soda lake. *Journal of Applied Microbiology*, **83**, 402–406.

<sup>71</sup> Senior, D.; Hamilton, J.; Bernier, R.; Manoir, J. (1992). Reduction in chlorine use during bleaching of kraft pulp following xylanase treatment. *Tappi Journal*, **75**, 125–130.

<sup>72</sup> Viikari, L.; Kantelinen, A.; Sundquist, J.; Linko, M. (1994). Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiology Review*, **13**, 335–350.

<sup>73</sup> Mamo, G.; Hatti-Kaul, R.; Mattiasson, B. (2006). A thermostable alkaline active endo-1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7: Purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 1492–1498.

On the other hand, pectinases are applied in fruit juice industries. So, for example, in apple juice manufacturing enzyme clarification may be carried out at 15°C for 12 h or at 50°C for 1 h.<sup>76</sup> Thus, the higher temperature is limited by the temperature tolerance of the enzyme mixture.

The role of pectinases is very important in must clarification. The presence of the cell wall components of the grapes slow down the decantation and may retain aromatic compounds.<sup>77,78</sup> These components, mainly pectin, depend on the grape variety, maturity and the technology used in the must production.<sup>77,79</sup> Pectin makes the setting of particles and the clarification very slow. For this reason, pectinases are the enzymes with the most important technological effects in the process. They enable the increase of the free run juice volume by decreasing its viscosity and improve the clarification of the juice and the wine filtration. In association with cellulases, glucanases and hemicellulases, pectinases speed up the natural process of winemaking and improve the quality of the wine.<sup>80</sup>

Before using the enzyme extracts obtained by SSF in an industrial process, sometimes it is necessary to establish an adequate protocol for their concentration in

---

<sup>74</sup> Dhillon, A.; Gupta, J.; Jauhari, B.; Khanna, S. (2000). A cellulase-poor, thermostable, alkali-tolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. *Bioresource Technology*, **73**, 273–277.

<sup>75</sup> Yang, V.; Zhuang, Z.; Elegir, G.; Jeffries, T. (1995). Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from Kraft pulp. *Journal of Industrial Microbiology*, **15**, 434–441.

<sup>76</sup> Ortega, N.; de Diego, S.; Perez-Mateos, M.; Busto, M. (2004). Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, **88**, 2, 209–217.

<sup>77</sup> Roldan, A.; Palacios, V.; Peñate, X.; Benitez, T.; Perez, L. (2006). Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of *Palomino fino* grapes in the sherry region. *Journal of Food Engineering*, **75**, 375–382.

<sup>78</sup> Pretorius, I. (2000). Tailoring wine yeasts for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, **16**, 675–729.

<sup>79</sup> Visser, J.; Voragen, A. (1996). Pectins and pectinases. *Progress in biotechnology*, **14**, Amsterdam: Elsevier science.

<sup>80</sup> Rhem, H.; Reed, G. (1996). Enzymes, biomass, food and feed. *Biotechnology*, **9**, Weinheim, Germany: VCH.

order to reduce the volume and facilitate their applicability on different processes.<sup>81</sup> With this purpose, the methods of precipitation and lyophilisation are commonly reported in literature. Protein precipitation is produced by adding salts, such as ammonium sulphate, or organic solvents (acetone, ethanol, etc.) which decrease the solubility of the proteins.<sup>82,83,84</sup> Lyophilisation consists on water elimination of a substance with its previous freezing, reducing the pressure to allow its sublimation directly from the solid to the gas phase. With this technique, it's possible to dry a sample at low temperatures without damaging it.

In the present chapter, the characterization of the xylanase and exo-PG produced by solid state fermentation on a mixture 1:1 of grape pomace and orange peels was carried out, evaluating pH, temperature and cations effects on enzyme activity.

Enzyme concentration by precipitation, using different agents such as ethanol, acetone, or ammonium sulphate, was compared with lyophilisation technique. The efficiency of the concentrated extract in must clarification was evaluated by comparing with commercial crude enzymes. Since some industrial processes require purified enzymes, one of the aims of the present work is the purification of xylanase and exo-PG by anion exchange chromatography on DEAE-cellulose (diethyl aminoetil cellulose) column.

---

<sup>81</sup> Díaz, A.; Bolívar, J.; de Melo, S.; Caro, I.; de Ory, I.; Blandino, A. (2008). Comparison of different methods of enzyme concentration for the obtention of enzymatic extracts with high pectinase activity. 18<sup>th</sup> International congress of chemical and process engineering. Summaries 5, 1989.

<sup>82</sup> Wang, N. Enzyme purification by acetone precipitation biochemical engineering laboratory. Department of Chemical & Biomolecular Engineering. University of Maryland.

<sup>83</sup> Farag, A.; Hassan, A. (2004). Purification, characterization and immobilization of keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, 2, 85-93.

<sup>84</sup> Fernández-Lahore, H.; Fraile, E.; Cascone, O. (1998). Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. *Journal of Biotechnology*, **62**, 83-93.

## **3.2. MATERIALS AND METHODS**

### **3.2.1. Spore production**

*Aspergillus awamori* was used as inoculum for the fermentations. The procedure to obtain the spores was described in Chapter 1 (section 1.2.1).

### **3.2.2. Solid substrate for fermentation**

The solid used for the fermentation was a mixture 1:1 (w/w) of washed white grape pomace and orange peels. The preparation of these solids was explained in Chapter 1 (section 1.2.2).

After the preparation of both solids, they were mixed and sterilised in an autoclave (120°C, 20min).

### **3.2.3. Solid state fermentation**

Solid state fermentations were carried out in a rotating drum bioreactor which consists on a 250 mL glass roller bottle (Ø 7 cm) connected to a filtered-air supply. Air flow is measured by a rotameter, then it is humidified and finally, it is sterilized by passing through a 0.45 µm cellulose filter. The air is introduced in the bottle through a needle, which is assembled to a barbed wire to remove the solid stuck in the bottle.

This configuration of bioreactor was selected because it provided the highest xylanase and exo-PG activities in a previous work (see Chapter 2).

For the fermentations, 10 g of solid substrate pre-inoculated with  $4.5 \cdot 10^8$  spores/g were added to the bottle. Initial moisture content of the solid substrate was previously adjusted to 70% (w/w) with a nutrient solution constituted (g/L) of 2.4 urea, 9.8  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5.0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.001  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0008  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.004  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and 0.001  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . The pH of this solution was adjusted at 5.

The system was incubated in static at 30°C for 5 days and aerated at an average flow rate of 120 mL/min.

#### **3.2.4. Enzymes extraction**

After the fermentation, 70 mL of Tween 80 (0.01%) were mixed with the fermented media, being stirred in a rotary shaker (150 rpm, 30 min, 4°C). These conditions of extraction were optimized in a previous work.<sup>29</sup> The suspension resulting after the extraction was centrifuged at 10000 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatant obtained –the enzymatic extract- was stored at -20°C.

#### **3.2.5. Enzymes assays**

Xylanase and exo-PG activities were assayed by using the methodology described in Chapter 1 (section 1.2.5). All the measurements were made in duplicate and the results were expressed as reducing sugars using a calibration curve. The enzyme activities were expressed in activity units per gram of dry solid (IU/gds). A unit of enzyme activity (IU) was defined as the amount of enzyme producing 1  $\mu\text{mol}$  of reducing sugars per minute at the conditions used in the enzyme test.

### 3.2.6. Protein determination

The total protein content of the samples was determined according to the method described by Lowry, using bovine serum as protein standard.<sup>85</sup>

### 3.2.7. Effect of cations on enzyme activity

The enzyme extracts were incubated with different cations for 5 min at 50 °C, for xylanase and 45°C for exo-PG. Residual activity was determined using the standard assay procedure and expressed as IU/mL.

The concentration of the extract was necessary for exo-PG experiments because the activity of the enzyme was not high enough to see the effect of different cations. For this purpose, 4 mL of crude enzyme were added to glass tubes and lyophilised for 24 h, dissolving the solid obtained in 0.4 mL of acetate buffer 0.1M at pH 5.

For this experiment, the following salts were used in a concentration 0.1 M: CaCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, BaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub> and FeSO<sub>4</sub>.

The degree of inhibition or activation of the enzyme activity was observed by comparing with a control sample, which contained distilled water instead of salt solution.

---

<sup>85</sup> Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, J. (1951). Protein measurement with the folin 16 phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.

### **3.2.8. pH stability of the enzymes**

The influence of pH on enzyme activity was determined by incubating the enzyme extracts with different buffer systems: acetate 0.2 M (pH 3.0-5.0), citrate 0.2 M (pH 6.0), tris-HCl 0.2 M (7.0, 8.0) and glycine 0.2 M (9.0-11.0).

The pH stability of xylanase was evaluated by mixing 0.25 mL of crude enzyme with 0.25 mL of buffer solution, incubating the mixture at 30°C for 30 min. Afterwards, aliquots of the mixtures were taken to measure the residual activity with respect to a control, which contained 0.25 mL of crude enzyme and 0.25 mL of citrate 0.05 M at pH 5.4.

Since the exo-PG activity in the extract was not high and a significant influence of pH was not expected, the extract was concentrated by lyophilisation. For this process, 4 mL of crude enzyme were added to glass tubes (two per buffer) and lyophilised for 24 h, dissolving the solid obtained in 0.4 mL of the corresponding buffer. The mixture was incubated at 30°C for 30 min. After this time, the residual activity was measured directly in the tubes respect to a control, made by solving the lyophilised solid in 0.4 mL of acetate buffer 0.1 M at pH 5.

All the experiments were done in duplicate to calculate the confidence limit at 95%.

### **3.2.9. Thermal stability of the enzymes**

Thermostability of the enzymes was investigated by incubating the crude enzyme at different temperatures from 4 to 70°C (4, 30 and 70°C). Moreover, 50°C was evaluated for xylanase and 45°C for exo-PG.

Due to the fact that microbial growth could be produced after the incubation of the extracts at 4°C for a long time, sodium azide at 0.02% was added.

After an appropriate incubation time, aliquots of the mixtures were taken to measure the residual activity using the standard assay procedure and expressed as IU/mL.

The results of this experiment were used to study the thermal inactivation kinetics of xylanase and exo-PG. For this purpose, it was necessary to represent the semilogarithmic plot of the residual activity divided by the initial one versus time. The inactivation rate constant ( $k$ ) at each temperature was calculated from the slope, using this value to estimate the apparent half life ( $t_{1/2}$ ), which is the time where the residual activity reaches 50%.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (1)$$

The Arrhenius equation was used to calculate the inactivation energy ( $E_d$ ).<sup>86</sup>

$$\ln k = \ln(k_0) - \left(\frac{E_d}{R}\right) \frac{1}{T} \quad (2)$$

R (ideal gas constant) = 8.314 J/mol·K

The values of  $E_d$  and  $k_0$  were estimated from the slope and the intercept of the plot of  $\ln(k)$  versus  $1/T$  respectively.

### 3.2.10. Concentration of the enzymes

The methods of precipitation and lyophilisation were tested to concentrate the extracts obtained by SSF.

---

<sup>86</sup> Shuler, M.; Kargi, F. (2002). Bioprocess Engineering Basic Concepts 2nd ed. Prentice Hall, 77-78.

The enzymes in the crude extract were precipitated by adding ethanol, acetone and a saturated ammonium sulphate solution at two different temperatures in the volume ratios indicated in table 3.1. For each experiment, 18 mL of extract were used.

Precipitating agent	Temperature	Precipitating agent /protein extract volume ratio
Ammonium sulphate	4°C	0.5/1
	Room temperature	
Ethanol	-20°C	2/1
	4°C	
Acetone	-20°C	6/1
	4°C	

**Table 3.1: Conditions used for enzyme precipitation.**

The precipitations were carried out in 100 mL centrifuge tubes, incubating the solutions overnight at the studied temperatures. After that, the mixtures were centrifuged at 11000 rpm and 4°C for 30 min. The supernatants were discarded and the pellets were resuspended with 0.9 mL of acetate buffer (0.1M, pH 5) for enzyme activity determination.

Lyophilisation was also used to concentrate the enzymes. With this technique it's possible to dry a sample at low temperatures without damaging it. For the development of this process, 18 mL of crude extract were lyophilised for 24 h. As a result a pellet was obtained, being resuspended in 0.9 mL of acetate buffer (0.1M, pH 5), the same volume used in the precipitation method, for enzyme activity determination.

### 3.2.11. Must clarification procedure

The solid obtained after the crude enzyme precipitation with ethanol at  $-20^{\circ}\text{C}$  (henceforth referred to as 'EE' for convenience) was used for must clarification. In order to evaluate the efficiency of the concentrated extract in the process, it was compared with commercial crude enzymes frequently used in wine industry: Enovin Clar (*Agrovin*) and Enozym Vintage (*Agrovin*) (henceforth referred to as 'EC' and 'EV' for convenience).

In volumetric cylinders, 450 mL of white must of the variety *Palomino Fino* were added. The corresponding crude enzyme (10 mg) was dissolved in 50 mL of must and poured in the volumetric cylinder. The mixture was agitated thoroughly and incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  in static to let the must decantation. After 19 and 40 h of incubation, the turbidity of samples taken from the middle of the volumetric cylinder was determined by using a turbidimeter 2100AN (Hach), which expresses the results in NTU (nephelometric turbidity units). A sample which only contained must was used as control.

All the experiments were done in duplicate to calculate the confidence limit at 95%.

### 3.2.12. Enzyme purification

The crude extract obtained after SSF (20 mL) was dialysed against Tris-HCl 50 mM (3L) at pH 7 for 3 hours. After that it was centrifuged at 10000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 min. The supernatant was loaded onto a DEAE-cellulose (diethyl aminoetil cellulose) column (with a bed volume of 2 mL), which was equilibrated with the same buffer. The column was placed in a wheel for 30 min to provide a homogeneous distribution of the extract. The enzymes were eluted by stepwise increases in NaCl (50-500 mM),

collecting the different fractions (0.7 mL) for enzyme activity and protein determination. The purity of the fractions with xylanase and exo-PG activities, was compared with the one of the commercial crude enzymes Rapidase AR 2000, Novoclairzym, Novoferm and Vinoflow (referred to as 'RA', 'NC', 'NF' and 'VF' for convenience), which are commonly applied in juice and must industries. These products don't contain purified enzymes, but they are constituted of a mixture of them, mainly pectinases and hemicellulases.

The purest crude enzymes are the ones with the highest specific activity (given in IU/mg), which is calculated by dividing the enzyme activity (IU/mL) by the protein content (mg/mL).

Different solutions in a concentration 1mg/mL were prepared by solving each commercial crude enzyme in acetate buffer (0.1M, pH 5). The specific xylanase and exo-PG activities of these solutions were compared with the ones measured in the extracts partially purified by DEAE. The specific activity of the partial purified exo-PG was also compared with a commercial pectinase produced by *Aspergillus niger*. All the experiments were done in duplicate to calculate the confidence limit at 95%.

### **3.2.13. SDS-PAGE profiling**

The protein pattern obtained after SDS-PAGE of the fractions partially purified by DEAE and the commercial crude enzymes were compared.

SDS-PAGE was done according to the procedure reported by Laemmli using 15% resolving gel constituted of 6.25 mL of separation buffer 2x (45.4 g of Tris base at

pH 8.8, 1 g of SDS and 500 mL of distilled water), 6.2 mL of acrilamide (30%), 37.5 mL de TEMED (10%) and 75  $\mu\text{L}$  de APS (12.5%).<sup>87</sup>

The stacking gel was constituted of stacking buffer 2x (151.5 g of Tris base at pH 6.8, 1 g of SDS and 500 mL of distilled water), 1 mL of acrilamide (30%), 1.5 mL of distilled water, 25  $\mu\text{L}$  of TEMED (10%) and 25  $\mu\text{L}$  of APS (12.5%).

Protein bands were visualized after staining with Coomassie brilliant blue R250 for two hours and destaining overnight using a solution of water, methanol and acetic acid in a proportion 8:2:1. The molecular weight of the protein bands were identified by making comparison with molecular weight standard markers.

### 3.3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.3.1. Effect of cations on enzyme activity

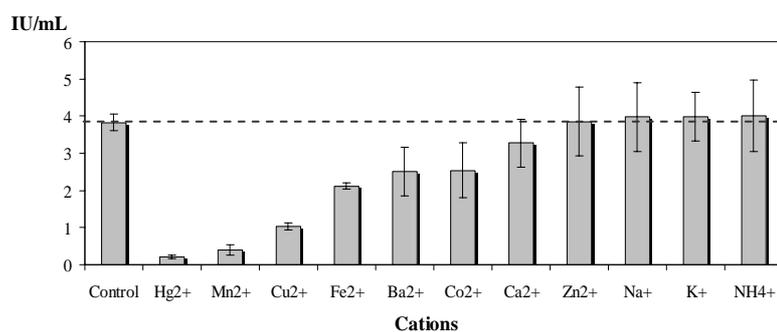
As it can be observed in Figure 3.1, xylanase activity practically wasn't affected in the presence of  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{NH}_4^+$ .

Xylanase activity decreased in presence of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$ . However the most important inhibition was produced with  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , reducing the activity of the control in 94%, 90 and 73%, respectively. The effect of  $\text{Hg}^{2+}$  could be explained with the reaction between the sulphydryl groups and the  $\text{Hg}^{2+}$  ions, suggesting that there was an important cysteine residue in or close to the active site

---

<sup>87</sup> Laemmli, U. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of 19 bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

of the enzyme.<sup>88,89</sup> This hypothesis would have to be confirmed. In relation to the xylanase inhibition caused by  $Mn^{2+}$ , it's very frequent to find it in other xylanases described in the literature, although several exceptions have been found.<sup>90,91</sup> So, for example, Düsterhöft et al. studied the effect of different cations in two xylanases produced by the thermophilic fungus *Humicola insolens*.<sup>92</sup> Both enzymes were inhibited with  $Mn^{2+}$  and  $Hg^{2+}$  in a concentration 1 mM. The most important effect was produced in the presence of  $Hg^{2+}$ , which decreased their activities by 1.96 and 6.66 fold.



**Figure 3.1: Effect of cations on xylanase activity.**

The effect of different cations on exo-PG activity is shown in Figure 3.2. This activity was enhanced with  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Fe^{2+}$ , measuring values 28%, 77% and 83% higher, respectively, than the one of the control. This effect could be explained with

<sup>88</sup> Heck, J.; de Barros, S.; Hertz, P.; Záchia, M. (2006). Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, **32**, 3, 179-184.

<sup>89</sup> Chivero, E.; Mutukumira, A.; Zvauya, R. (2001). Partial purification and characterisation of a xylanase enzyme produced by a micro-organism isolated from selected indigenous fruits of Zimbabwe. *Food Chemistry*, **72**, 179–185.

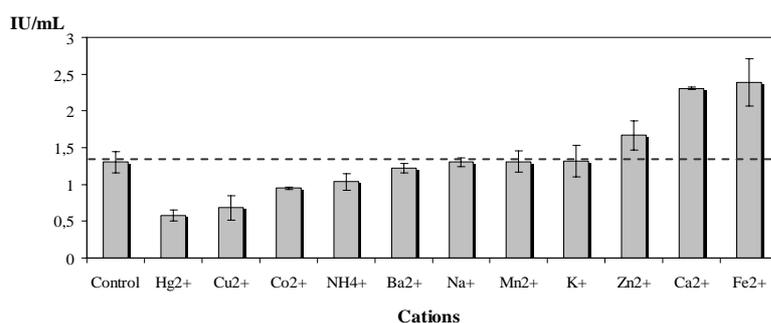
<sup>90</sup> Saha, B.; (2002). Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry*, **37**, 1279–1284

<sup>91</sup> Lama, L.; Calandrelli, V.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B. (2004). Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. *Research in Microbiology*, **155**, 283–289.

<sup>92</sup> Düsterhöft, E.; Linssen, V.; Voragen, A.; Beldman, G. (1997). Purification, characterization, and properties of two xylanases from *Humicola insolens*. *Enzyme and Microbial Technology*, **20**, 6, 437-445.

the interaction between these cations and the enzyme, causing its conformational change and increasing the activity.

Exo-PG was not practically affected by  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{K}^+$ . On the other hand, the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  decreased the control activity in 72.9 and 52.3% respectively; however,  $\text{Hg}^{2+}$  caused the most important effect, reducing the control activity by 2.25 fold.



**Figure 3.2:** Effect of cations on exo-PG activity.

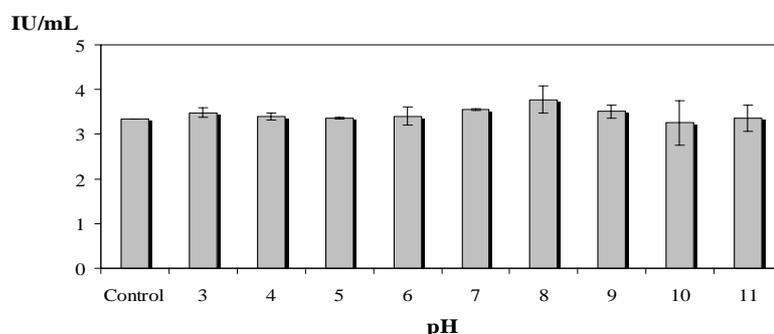
In general, the exo-PG described in this work is quite stable in the presence of the most of the cations tested, unlike other works described in the literature. For example, Celestino et al. reported that pectinase activity was inhibited by many different cations such as  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  in a concentration 12.5 mM.<sup>93</sup>

### 3.3.2. pH stability of the enzymes

Xylanase retained more than 100% of its activity between pH 3.0 and 9.0 (Figure 3.3), although the maximum was obtained at pH 8.0 ( $3.78 \pm 0.50$  IU/gds). The

<sup>93</sup> Celestino, M.; Freitas, M.; Medrano, J.; Souza, V.; Ferreira, X. (2006). Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. *Journal of Biotechnology*, **123**, 1, 33-42.

stability was slightly reduced at high pH, attaining the lowest activity at pH 10 ( $3.25 \pm 0.51$  IU/mL). However, this value was only a 3% lower than the control.



**Figure 3.3: Effect of pH on xylanase activity.**

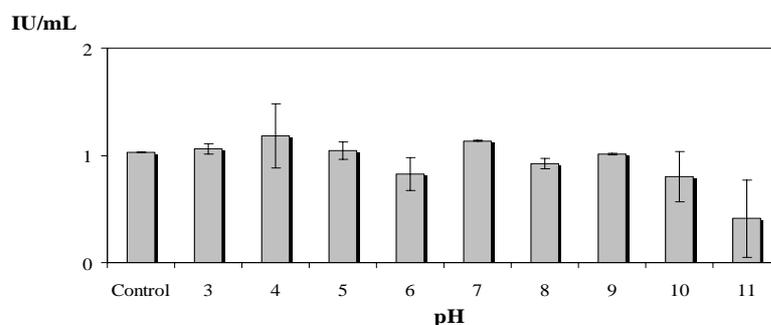
Among the xylanases obtained from different microbial sources, most are inhibited at high pH. For example, the xylanase isolated from *Penicillium capsulatum* was only active in the acidic pH range, with a rapid decline in activity above pH 5.<sup>94</sup> The xylanase produced by *Bacillus thermoalkalophilus* was stable in the pH range 4-6, but the activity was progressively decreasing at pH values below 4 and above 6.

Exo-PG showed the highest activities in the pH range 3.0-5.0, with optimum values of  $1.18 \pm 0.30$  and  $1.14 \pm 0.01$  IU/gds measured at pH 4 and 7, respectively (Figure 3.4). The lowest activities were obtained at pH 11, however, in these conditions the enzyme retained a residual activity of 40%. These results are in agreement with the effect described by Jyothi et al.<sup>95</sup> According to these authors, the active conformation of exo-PG is favored by a pH between 3.5 and 4.5 and alterations are produced in the secondary and tertiary structures at pH from 5.0 to 7.0. These results are

<sup>94</sup> Ryan, S.; Nolan, K.; Thompson, R.; Gubitz, G.; Savage, A.; Tuohy, M. (2003). Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**, 6, 775-785.

<sup>95</sup> Jyothi, T.; Singh, S.; Rao, A. (2005). The contribution of ionic interactions to the conformational stability and function of polygalacturonase from *A. niger*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **36**, 310-317.

attributed to its residues that have ionizable side-chains, increasing the net negative charge on the molecule in the neutral-alkaline pH range and leading to repulsion between the strands, resulting in a destabilization of the hydrogen-bond structure of the enzyme.<sup>96</sup>



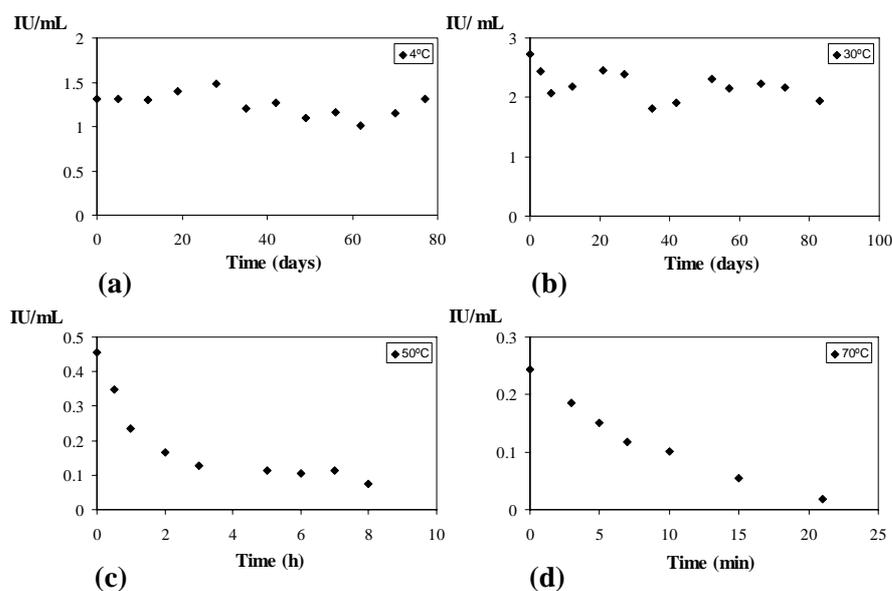
**Figure 3.4: Effect of pH on exo-PG activity.**

In general, the enzyme was active over a broad pH range, displaying over 80% of its activity in the pH range of 3.0-9.0.

### 3.3.3. Thermal stability of the enzymes

Xylanase was capable of retaining practically full activity at 4 and 30°C for 80 days (Figure 3.5).

<sup>96</sup> Silva, D.; Silva, E.; Ribeiro, R.; Da Silva, R.; Ferreira, V.; Gomes, E. (2007). Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **42**, 8, 1237-1243.



**Figure 3.5:** Thermal inactivation of xylanase at different temperatures: 4°C (a), 30°C (b), 50°C (c) and 70°C (d).

The enzyme was very thermostable even at 50°C, with half-life for deactivation of 2.75 h (Table 3.1). However, a rapid loss of activity was observed at 70°C, decreasing the initial activity down to 92.4% in 21 min. In these conditions the half-life for deactivation was of 7.21 min.

The value of  $E_d$  estimated from the slope of the plot of  $\ln(k)$  versus  $1/T$  was 137.25 kJ/mol.

Temperature	Xylanase		Exo-PG	
	k (min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub>	k (min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub>
4°C	2·10 <sup>-6</sup>	240.58 days	8·10 <sup>-6</sup>	60.17 days
30°C	3·10 <sup>-6</sup>	160.45 days	1·10 <sup>-5</sup>	48.14 days
50°C for xylanase 45°C for exo-PG	4.2·10 <sup>-2</sup>	2.75 h	1.1·10 <sup>-3</sup>	10.50 h
70°C	9.62·10 <sup>-2</sup>	7.21 min	3.376·10 <sup>-1</sup>	2.05 min

**Table 3.1: Kinetic parameters of thermal inactivation for xylanase and exo-PG enzymes.**

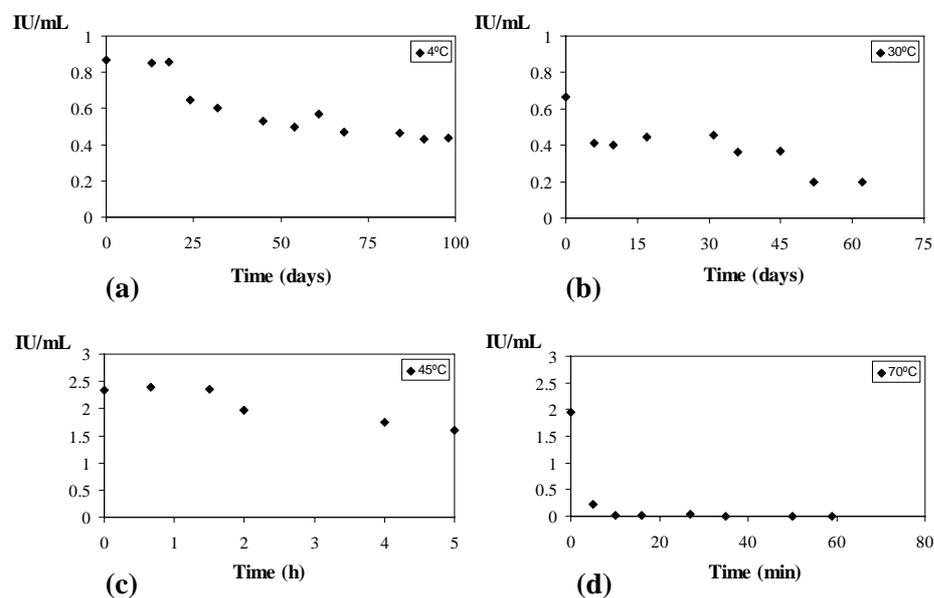
The results obtained for xylanase were in agreement with the studies carried out by several authors. For example, Ryan et al. reported that *Penicillium capsulatum* xylanase maintained its initial activity after being incubated at 30°C for two weeks.<sup>97</sup> At high temperatures, a rapid deactivation was observed. So, the enzyme was completely deactivated in 3 min at 70°C. This xylanase was more stable than the one studied in this chapter at 50°C because it maintained a residual activity of 48% after 24 h of incubation. Another xylanase with low stability at high temperatures was the one isolated from *Pycnoporus cinnabarinus*, which was inactivated at 70°C in 15 min.<sup>98</sup>

Exo-PG was very stable up to 45°C, which revealed a half-life of 10.5 h at this temperature (Table 3.1). The best results were obtained at 4 and 30°C, since the enzyme retained more than 69% of its activity after 31 days of incubation (Figure 3.6). However, a rapid loss was observed at 70°C, in which the enzyme showed a

<sup>97</sup> Ryan, S.; Nolan, K.; Thompson, R.; Gubitz, G.; Savage, A.; Tuohy, M. (2003). Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**, 775–785.

<sup>98</sup> Sigoillot, C.; Lomascolo, A.; Record, E.; Robert, J.; Asther, M.; Sigoillot, J. (2002). Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 6, 876–883.

half-life for deactivation of 2.05 min. The value of  $E_d$  estimated from the slope of the plot of  $\ln(k)$  versus  $1/T$  was 128.91 kJ/mol.



**Figure 3.6: Thermal inactivation of exo-PG at different temperatures: 4°C (a), 30°C (b), 45°C (c) and 70°C (d).**

According to several studies, the optimum temperature of exo-PG is over a range of 30 and 50°C.<sup>76</sup> Above this value a decline is detected. For example, the purified pectinase produced by *A. indicus* showed an optimum temperature of 50°C for its activity.<sup>99</sup> The enzyme was stable at 37°C for 2 days and at 50°C for 60 min.

<sup>99</sup> Angayarkanni, J.; Palaniswamy, M.; Murugesan, S.; Swaminathan, K. (2002). Improvement of tea leaves fermentation with *Aspergillus* spp. Pectinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **94**, 4, 299-303.

### 3.3.4. Concentration of the enzymes

Table 3.2 shows the increase in enzyme activity and the efficiency of the process after the application of precipitation and lyophilisation methods to concentrate the extracts obtained by SSF.

Concentration method		Increment of activity		Efficiency of the process	
		Xylanase	Exo-PG	Xylanase	Exo-PG
Ammonium sulphate	4°C	0.05 ± 0.04	0	0.23	0
	Room T	0.06 ± 0.01	0	0.30	0
Ethanol	-20°C	7.28 ± 0.27	10.05 ± 2.86	39.18	50.23
	4°C	7.83 ± 0.41	9.53 ± 0.92	30.11	47.64
Acetone	-20°C	6.38 ± 0.03	5.99 ± 1.77	31.88	29.94
	4°C	9.85 ± 0.49	5.67 ± 0.49	49.26	28.33
Lyophilisation		10.90 ± 1.87	7.17 ± 0.85	66.21	35.83

**Table 3.2: Results obtained after the utilization of different methods for xylanase and pectinase concentration.**

Lyophilisation was the most efficient method to concentrate xylanase, increasing the activity  $10.90 \pm 1.87$  times the one measured in the initial extract. The efficiency of the process was of 66.21%. The best results by precipitation were obtained with acetone at 4°C. With this organic solvent, the activity increased  $9.85 \pm 0.49$  times and the efficiency of the process was of 49.26%. This technique has been used by other authors for protein concentration obtaining good results.<sup>100,101</sup>

<sup>100</sup> Ruiz, M.; Di Pietro, A.; Isabel, M.; Roncero, G. (1997). Purification and characterization of an acidic endo-L-1,4-xylanase from the tomato vascular pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters*, **148**, 75-82.

<sup>101</sup> Tsujibo, H.; Sakamoto, T.; Nishino, N.; Hasegawa, T.; Inamori, Y. (1990). Purification and properties of three types of xylanases produced by an alkalophilic actinomycete. *Journal of Applied Bacteriology*, **69**, 398-405.

If lyophilisation and acetone precipitation were compared, the first technique is more efficient although the use of acetone at 4°C would be more profitable. Acetone is a cheap solvent, which contains a few impurities that could deactivate the enzymes.<sup>82</sup> Moreover, lyophilisation shows the disadvantage of being an expensive technique, which needs a long drying time (around 24 h). Thus, the use of lyophilisation is justified when it provides yields much higher than other methods.

Ammonium sulphate precipitation was the worst method for xylanase concentration, with which no significant enzyme recovery was measured.

As it can be deduced from the results shown in Table 3.2, ethanol precipitation at -20°C was the best method to concentrate exo-PG, increasing the activity  $10.05 \pm 2.86$  times the one measured in the initial extract. The efficiency of this process was of 50.23%. A similar value was determined with ethanol at 4°C with an activity increase of  $9.53 \pm 0.92$  and an efficiency of 47.64%. The enzyme retained more activity when it was precipitated using ethanol than acetone. These results are in agreement with the ones obtained by Rashmi et al, who concentrated an extracellular pectinase produced by *Aspergillus niger* by precipitation with ethanol, recovering more activity than with acetone.<sup>102</sup>

On the contrary, ammonium sulphate precipitation turned out to be the worst concentration method, rendering no increment of pectinase activity at all.

Lyophilisation was not a bad method to concentrate the exo-PG, with which the enzyme activity increased  $7.17 \pm 0.85$  times the one measured in the initial extract.

---

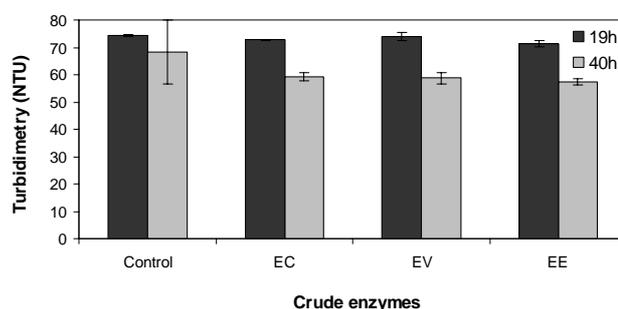
<sup>102</sup> Rashmi, R.; Siddalinga, K.; Sneha, G.; Shabana, S.; Syama, A.; Radhika, V. (2008). Partial purification and biochemical characterization of extracellular pectinase from *Aspergillus niger* isolated from groundnut seeds. *Journal of Applied Biosciences*, **9**, 378 - 384.

Regarding to the temperature factor, no significant differences were observed neither in the increment of activity or the efficiency of the process at the two different temperatures used in the concentration methods.

### 3.3.5. Applicability of the concentrated extract in must clarification

Figure 3.7 shows the must turbidimetry after 19 and 40 hours of incubation of the enzymes. In order to evaluate the grade of clarification reached with the crude enzymes tested, the initial turbidimetry was measured obtaining a value of 2702 NTU (nephelometric turbidity units).

The turbidimetry of the enzyme treated must measured after 19 hours of incubation was slightly lower than the one of the control. The fact to obtain a notable decrease also in the control turbidimetry is explained with the sedimentation of big particles in suspension contained in must.



**Figure 3.7:** Turbidimetry of the must after 19 and 40 hours of incubation with crude enzymes (EE: enzyme extract concentrated by ethanol precipitation, EC: commercial crude enzyme 'Enovin Clar' and EV: commercial crude enzyme 'Enozym Vintage').

The major clarification was attained with EE (extract concentrated by ethanol precipitation). Bigger differences were observed after 40 hours of incubation. Using EE, the turbidimetry of the must was a 15.9% lower than the one measured in the

control. Moreover, it provided a better grade of clarification than EC and EV, which turbidimetries were a 3.1 and 2.1% higher respectively than the one analysed with EE. The initial turbidimetry of the must decreased in a 97.5% with the addition of EE after 40 h of incubation.

The fact to measure the highest grade of clarification with EE could be explained with the presence of other enzymes such as xylanases, which help pectinases in the clarification process. In spite of the commercial crude enzymes also contain different enzymes (esterases, polygalacturonases, pectin lyases, etc), their exact nature and ratios is not specified; which may be crucial in obtaining optimal performance in winemaking.<sup>103</sup>

In the literature, it is described how an improvement in must clarification is obtained when a correct balance of exogenous activities are added to complement the poor endogenous enzyme activities of the grape. For example, the use of a macerating enzyme preparation having a blend of activities (pectinases, cellulases, hemicellulases) from *Trichoderma* and *Aspergillus* improved the clarification process.<sup>103</sup>

### 3.3.6. Purification of the enzymes

Xylanase and exo-PG were partially purified from the culture supernatant after SSF by DEAE-cellulose column, being the results summarized in Table 3.3.

---

<sup>103</sup> Harman, G.; Kubicek, C. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Enzymes, biological control and commercial applications, 2, London: Taylor and Francis.

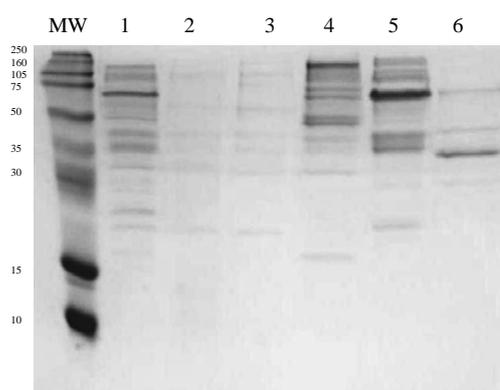
Purification step		Volume (mL)	Xylanase activity (IU/mL)	Exo-PG activity (IU/mL)	Total protein (mg)	Specific xylanase activity (IU/mg)	Specific exo-PG activity (IU/mg)
Culture supernatant		20 mL	$6.71 \pm 0.32$	$0.64 \pm 0.03$	$1.45 \pm 0.21$	4.63	0.44
DEAE	Fraction rich in xylanase	0.7 mL	$5.61 \pm 1.22$	-----	$0.22 \pm 0.05$	25.5	-----
	Fraction rich in exo-PG	0.7 mL	-----	$1.25 \pm 0.70$	$0.08 \pm 0.06$	-----	15.63

**Table 3.3: Summary of xylanase and exo-PG purification.**

Xylanase activity was detected in the fraction of 50 mM NaCl, which showed a specific activity 5.51 times higher than the one analysed in the culture supernatant, thus, the xylanase was partially purified. However, xylanase activity per mL in the fraction obtained from the DEAE didn't increase ( $5.61 \pm 1.22$  IU/mL in the NaCl elution *vs*  $6.71 \pm 0.32$  IU/mL in the initial extract), thus, the enzyme was not concentrated. This fact is explained considering the presence of, at least, two different xylanases. One of them would be detected in the flow through, solution that contained the molecules not retained in the column, because it shows a net positive charge at the work pH (pH 7). On the other hand, the other was retained in the DEAE and eluted after the addition of the solution 50 mM NaCl. This distinguishable behaviour of the enzymes could be explained considering that they show different isoelectric points.

Exo-PG was eluted in the fraction of 500 mM NaCl. As it can be observed in Table 3.3, the enzyme was concentrated after the column step, increasing the activity from  $0.64 \pm 0.03$  IU/mL to  $1.25 \pm 0.70$  IU/mL. Moreover, the partial purification of the enzyme was produced, obtaining a fraction with a specific activity 35.5 times higher than the one analysed in the culture supernatant.

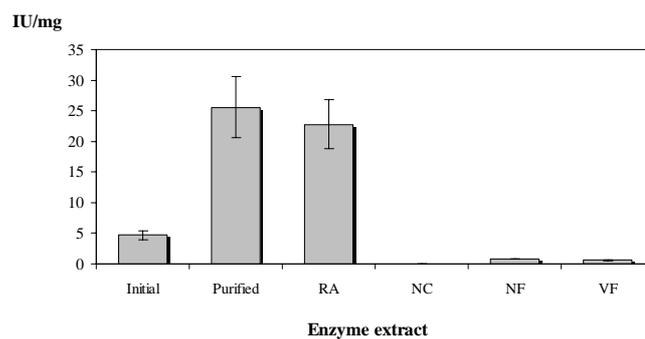
The protein pattern of the culture supernatant without purification is shown in line 1 of the electrophoresis gel (Figure 3.8). If it is compared with the protein pattern of the elutions where xylanase and Exo-PG were obtained (lines 3 and 6 respectively), it can be observed that the culture supernatant showed more bands. This fact confirms that the fractions eluted from the DEAE column contained less proteins, thus, xylanase and exo-PG were more pure.



**Figure 3.8: Electrophoresis analysis of the different fractions obtained from DEAE.** MW lane indicates molecular weights markers as specified at the left of the picture. The samples were loaded as follow: culture supernatant (lane 1), flow through (lane 2), 50 mM NaCl elution (line 3), 150 mM NaCl elution (line 4), 250 mM NaCl elution (line 5) and 500 mM NaCl elution (line 6).

### 3.3.7. Comparison of the purified enzymes with commercial crude enzymes

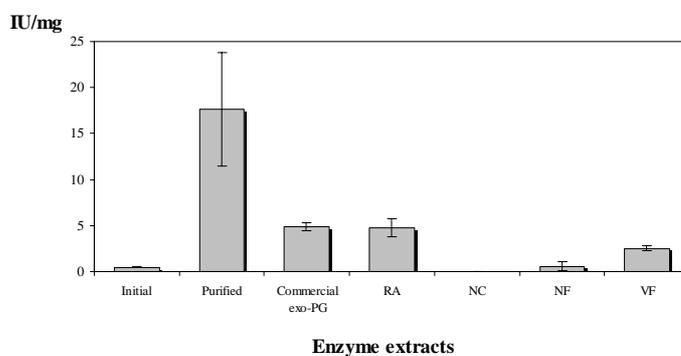
The fraction with xylanase activity obtained after the purification step by DEAE showed higher specific xylanase activity than the commercial crude enzymes tested (Figure 3.9). Its value was 29.2 and 41.5 times higher than the ones measured in NF and VF, respectively. The difference was less significant if the activity of the purified extract was compared with the one analysed in the must treated with RA. Xylanase activity wasn't detected in the commercial crude enzyme NC. As it can be observed in Figure 3.9, even the extract before the purification step showed a higher specific activity than NF and VF (5.3 and 7.6 times, respectively).



**Figure 3.9:** Comparison of the specific xylanase activity of the extract before and after the purification step by DEAE with the ones of commercial crude enzymes (RA: Rapidase, NC: Novoclairezim, NF: Novoferm and VF: Vinoflow).

The highest specific exo-PG activity was measured in the partial purified extract by DEAE (Figure 3.10), which enhanced 3.7 times the one of the purest crude enzymes tested (commercial exo-PG and RA). The difference was more significant when NF and VF were used, which showed specific activities 31.2 and 6.9 times lower, respectively, than the exo-PG partially purified by DEAE.

As it happened with xylanase, exo-PG activity was not detected in NC.



**Figure 3.10:** Comparison of the specific exo-PG activity of the extract before and after the purification step by DEAE with the ones of commercial crude enzymes (commercial exo-PG produced by *Aspergillus niger*, RA: Rapidase, NC: Novoclairezim, NF: Novoferm and VF: Vinoflow).

### **3.4. CONCLUSIONS**

The enzymes described in the present work remain stable in high pH range, at low and intermediate temperatures and in the presence of different cations. For this reason, they could have a potential application in waste treatment centres, in food paper and textile industries, etc. Moreover, the results obtained after the application of the concentrated extract in must clarification suggest its application in juice and wine industries. The direct use of the enzyme extract in the clarification process should be considered because of the low production cost induced by the use of agricultural wastes as substrate and the absence of the purification step. If more pure enzymes are required, the xylanase and exo-PG partially purified by DEAE could be used, since they showed higher specific activities than commercial crude enzymes.