

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



INSTITUTO DE PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS Y QUÍMICOS



***Producción de alfa-amilasa fúngica en cultivos sumergidos
empleando subproductos agroindustriales***

PABLO ARIEL ANSELMI

Tesis para optar al título de Licenciado en Biotecnología

Director: Dr. Mauricio Braia

2017

Agradecimientos

Dedico mi tesina a todas las personas que formaron parte de esta larga etapa. A partir de ahora comienza otra más emocionante y llena de nuevos objetivos.

A la Universidad Nacional de Rosario, por darme la oportunidad de estudiar, y al IPROBYQ por otorgarme las instalaciones para desarrollar este trabajo.

A mi familia, en especial a mis viejos que siempre estuvieron presentes, brindándome su apoyo constante y facilitarme todo sin dudarlos. ¡Ustedes son mis héroes!

A Agos, por bancarme siempre, por su compañía incondicional y por animarme y alentarme en los momentos difíciles. ¡Te amo!

A Diana, por abrirme las puertas del Instituto, por dejar que forme parte de Procesos Biotecnológicos y por posibilitar mi viaje a Galicia. ¡Gracias!

A Mauricio, por su acompañamiento absoluto a lo largo de esta tesina, por su dedicación y por la experiencia y conocimientos transmitidos. ¡Muchas gracias!

A mis compañeros de mesada, a mis grandes amigos de la facultad que me han brindado su apoyo a la hora de rendir exámenes y a la banda del 555 por numerosos días de pintas y papas cheddar. ¡Salud!

Y por último a Harry, que me acompañó fielmente en cada una de aquellas largas semanas de estudio. ¡Lo logramos Negro!

Índice

Índice	I
Abreviaturas y Lenguaje Especial	III
Resumen	IV
1 Introducción	1
1.1 Enzimas e Industria	1
1.2 La enzima α -Amy	4
1.2.1 Características	4
1.2.2 Expresión del gen de α -Amy en <i>Aspergillus oryzae</i>	7
1.2.3 Aplicaciones industriales	8
1.2.4 Producción de α -Amy	8
1.3 El hongo <i>Aspergillus oryzae</i>	9
1.3.1 Descripción	9
1.3.2 <i>Aspergillus</i> como productor de enzimas. Estrategias de fermentación	11
1.3.2.1 Fermentación sumergida de hongos filamentosos	13
1.3.3 Residuos agroindustriales	15
1.3.3.1 El glicerol	16
1.3.3.2 El afrechillo de trigo (ADT)	16
2 Objetivos	19
3 Materiales y Métodos	20
3.1 Materiales	20
3.1.1 Microorganismo y medio de cultivo	20
3.1.2 Reactivos y Soluciones	21
3.1.3 Equipamiento	23
3.2 Métodos	25
3.2.1 Desarrollo del hongo <i>Aspergillus oryzae</i> en medio sólido	25
3.2.2 Fermentación en batch en medio líquido mínimo a pH 6,0 con diferentes fuentes de carbono	25
3.2.3 Fermentación a pH 6,0 con distintas concentraciones de glicerol	26
3.2.4 Fermentación a pH 3,0 y pH 6,0 con distintas concentraciones de glicerol	26
3.2.5 Curva de crecimiento de <i>A. oryzae</i> a pH 6,0 con 20 g/L de glicerol	26
3.2.6 Curva de crecimiento de <i>A. oryzae</i> a pH 3,0 con distintas concentraciones de glicerol	27

3.2.7 Fermentación con cambio de pH y temperatura	27
3.2.8 Efecto de la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y otras fuentes de nitrógeno sobre la producción de α -Amy	29
3.2.9 Fermentación con glicerol crudo	29
3.2.10 Fermentación con glicerol y afrechillo de trigo	30
3.2.10 Método de medición de actividad catalítica de α -Amy.....	31
3.2.11 Método de medición de la concentración de glicerol	32
3.2.12 Método para medir proteínas totales	33
3.2.13 Electroforesis SDS-PAGE	34
3.2.14 Espectrometría de masas (LC-MS).....	34
3.2.15 Manejo de los datos experimentales	35
4 Resultados y Discusión	36
4.1 Desarrollo del hongo <i>Aspergillus oryzae</i> en medio sólido	36
4.2 Fermentación en batch en medio líquido mínimo a pH 6,0 con diferentes fuentes de carbono.....	36
4.3 Fermentación a pH 6,0 con distintas concentraciones de glicerol.....	39
4.4 Fermentación a pH 3,0 y pH 6,0 con distintas concentraciones de glicerol	40
4.5 Curva de crecimiento de <i>A. oryzae</i> a pH 6,0 con 20 g/L de glicerol	41
4.6 Curva de crecimiento de <i>A. oryzae</i> a pH 3,0 con distintas concentraciones de glicerol	42
4.7 Fermentación con cambio de pH y temperatura	45
4.7.1 Medidas de actividad enzimática y biomasa	45
4.7.2 Espectrometría de masa (LC-MS)	46
4.8 Efecto de la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y otras fuentes de nitrógeno sobre la producción de α -Amy	47
4.9 Fermentación en batch en medio líquido mínimo con glicerol crudo	48
4.10 Fermentación con glicerol y afrechillo de trigo.....	49
4.10.1 Ensayos de actividad enzimática	49
4.10.2 Geles de electroforesis	51
5 Conclusiones	53
6 Referencias bibliográficas.....	55

Abreviaturas y Lenguaje Especial

α -Amy

Alfa-Amilasa

Abs

Absorbancia

ADT

Afrechillo de trigo

Buffer

Solución tampón

BCA

Ácido bicinconínico

DO

Densidad óptica

Pellet

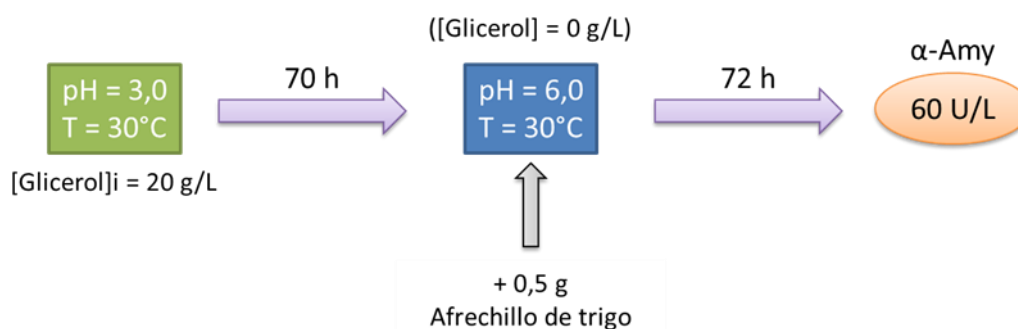
Agregado esférico de micelio

Resumen

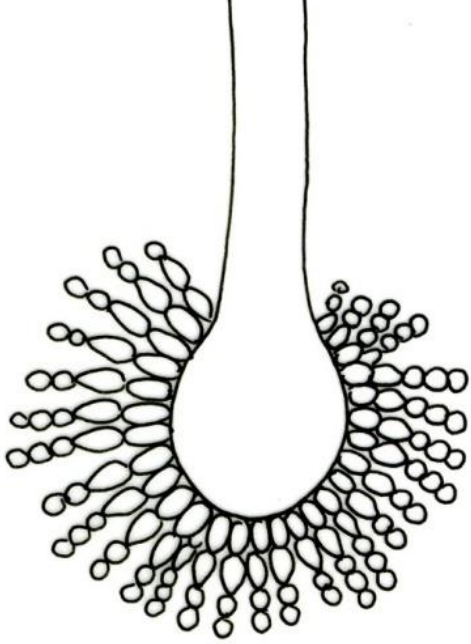
La alfa-amilasa (α -Amy) es una de las enzimas más empleadas en la industria y su aplicación se encuentra directamente relacionada con su capacidad de degradar almidón. Se utiliza en la producción de alimentos, bebidas, vestimenta y biocombustibles, entre otros.

Una empresa dedicada a la producción de inoculantes biológicos, radicada en la ciudad de Pergamino, se contactó con nuestro Instituto para desarrollar en conjunto un proceso industrial de producción de esta enzima. En base a la vasta experiencia que posee el grupo en producir enzimas fúngicas empleando residuos o subproductos agroindustriales, este trabajo de tesina se orientó a la producción de α -Amy de *Aspergillus oryzae* por fermentación en cultivos sumergidos, empleando glicerol y afrechillo de trigo como fuente carbono.

La mayor producción de α -Amy se obtuvo aplicando la siguiente estrategia de fermentación en lote:



La enzima α -Amy se secreta al medio acompañada de proteínas contaminantes con actividad proteolítica por ende, las actividades a futuro tendrán como objetivo recuperar y estabilizar α -Amy.



INTRODUCCIÓN

1 Introducción

1.1 Enzimas e Industria

La era de la enzimología industrial comenzó en 1907 cuando Otto Rohm obtuvo una patente para el uso de un extracto de enzimas pancreáticas para el procesamiento de cuero [1]. En 1913, introdujo al mercado un detergente a base de enzimas denominado Burnus[®], comercializado en forma de pastilla y que poseía como principal componente extracto de páncreas. Desde entonces, las enzimas han ganado terreno en distintas áreas de la industria: más de 500 productos son elaborados empleando enzimas y más de 150 industrias utilizan enzimas [2].

El mercado global de enzimas se calcula en 6.000 millones de dólares y se espera que crezca para el 2020 con una tasa anual del 6,8 % y alcance cifras superiores a 11.000 millones de dólares. Este mercado está gobernado por aquellas enzimas empleadas en la industria alimenticia, particularmente la elaboración de panificados y bebidas (con un 40 % de participación en el mercado). La tabla I.I resume la demanda global de enzimas para la industria alimenticia, estimada desde el año 2000 hasta el 2020 [2].

Tabla I.I: Demanda global (en millones de dólares) de enzimas de aplicación en la industria alimenticia, desde el año 2000 al 2020.

Año	2000	2005	2010	2015	2020
Demanda mundial	520	760	1220	1770	2520
Panificación	140	250	420	625	900
Lácteos	180	260	360	465	610
Otros	200	250	404	680	1010

El 75 % de la demanda mundial de enzimas industriales es satisfecha por tres grandes empresas (figura 1.1): Novozymes (Dinamarca), DuPont (EEUU) y DSM (Holanda); seguidas por las compañías alemanas BASF y AB Enzymes, la danesa Christian Hansen y las japonesas Amano y Shin-Nihon [2].

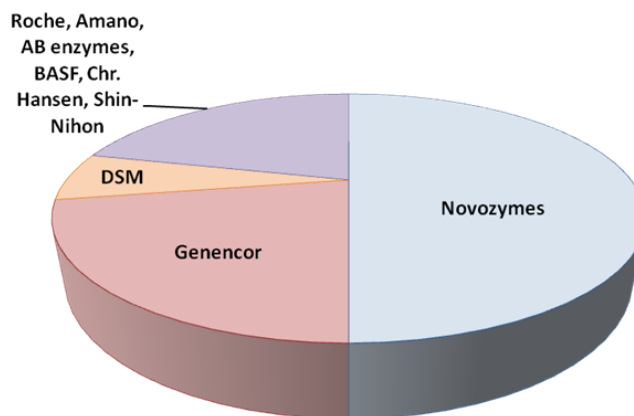


Figura 1.1: Empresas líderes en la producción de enzimas.

En la Argentina existen pequeñas empresas de capital nacional que utilizan biotecnología para la producción de enzimas: GENEg, MILAR, Tudela y Biokeen, enfocadas principalmente en la fabricación de bioinsumos para la industria alimenticia [3]. Por otro lado, los datos de importación del último año, según posición arancelaria, indican que se ingresaron 3,7 millones de kilos de enzimas con un valor CIF de 32 millones de dólares, según información de Aduana, de producto puro, el cual en sus diferentes formulaciones para distintos usos adquiere un volumen de entre dos a tres veces más que el de la materia prima. Algunos usos industriales de las enzimas se muestran en la tabla I.II [4, 5]:

Tabla I.II: Aplicaciones industriales de las enzimas.

Industria	Aplicaciones
Alimenticia	<ul style="list-style-type: none"> • Panificación • Maceración • Clarificación de zumos y bebidas • Degradación de polisacáridos para favorecer la fermentación
Textil	<ul style="list-style-type: none"> • Ablandamiento de cuero • Degradación de fibras de celulosa • Desgomado
Papelera	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación de fibras de lignina • Blanqueo del papel
Cosmética	<ul style="list-style-type: none"> • Tinturas para el cabello • Cremas para la piel
Farmacéutica	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de drogas • Componentes de formulaciones

Además, las enzimas son muy utilizadas como catalizadores en la síntesis de distintos compuestos [6, 7] sobre todo en la industria alimenticia y farmacéutica. Las ventajas que ofrecen las enzimas por sobre los catalizadores químicos son:

- la velocidad de reacción es mayor, incluso a temperatura ambiente y presión atmosférica.
- la especificidad de la reacción es mayor evitando la formación de subproductos que disminuyen el rendimiento y la pureza del producto final e incluso pueden ser tóxicos.
- los procesos industriales que incluyen reacciones catalizadas por enzimas son más amigables con el medio ambiente.

Las enzimas pueden actuar en la acilación de compuestos polihidroxilados como los esteroides y los alcaloides, en la separación de enantiómeros y en la reducción, oxidación y oxigenación de enlaces [8].

La figura 1.2 presenta algunas de las enzimas más empleadas y sus aplicaciones industriales.



Figura 1.2: Uso de enzimas en la industria.

Entre las enzimas industriales más utilizadas se encuentran las amilasas, un grupo de enzimas hidrolíticas que catalizan la ruptura del enlace glicosídico de moléculas de almidón,

amilopectina, amilosa y glucógeno para dar azúcares libres como glucosa, dextrina y maltosa [9]. En la naturaleza, estas enzimas pueden encontrarse en la saliva y el páncreas de los seres humanos y otros mamíferos, y en microorganismos como bacterias del género *Bacillus* y *Micrococcus* y hongos del género *Aspergillus* y *Candida* [10, 11].

Existen dos tipos de amilasas, que se clasifican de acuerdo a los enlaces que hidrolizan: internos (endoamilasas) o extremos del polisacárido (exoamilasas). Al mismo tiempo, pueden clasificarse de acuerdo al anómero del azúcar que se forme luego de la hidrólisis. Dentro del grupo de las amilasas se pueden destacar [12]:

- *alfa-amilasa*: hidroliza los enlaces glicosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ internos.
- *beta-amilasa*: hidroliza los enlaces glicosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ desde el extremo no reductor.
- *glucoamilasa*: hidroliza los enlaces glicosídicos $\alpha(1\rightarrow6)$ y el último enlace $\alpha(1\rightarrow4)$ del extremo no reductor de la amilosa y la amilopectina.

La α -Amy microbiana es la enzima industrial más demandada y es empleada en la producción de alimentos y bebidas, vestimenta y biocombustibles, entre otros [12].

1.2 La enzima α -Amy

1.2.1 Características

La enzima α -Amy de *Aspergillus oryzae* (EC 3.2.1.1), también llamada Taka-amilasa A, es una hidrolasa perteneciente a la familia 13 de glicosilhidrolasas [13] que cataliza la degradación de moléculas de amilosa y amilopectina, rompiendo enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ internos de dichas moléculas, para dar una mezcla de dextrinas, oligosacáridos, maltosa, maltotriosa [14].

La amilosa y la amilopectina son polisacáridos formados por monómeros de glucosa y que en su conjunto conforman el almidón, la principal biomolécula de reserva de energía luego de la celulosa. La figura 1.3 muestra la estructura de ambos polisacáridos [15].

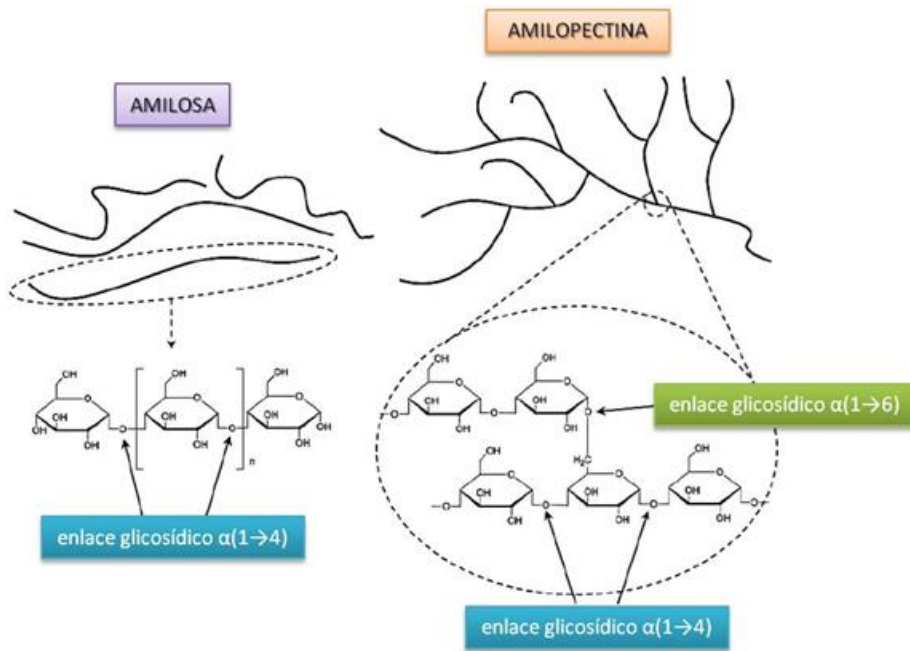


Figura 1.3: Estructura química de las moléculas de amilosa y amilopectina en el almidón.

La amilosa es un polímero lineal formado por más de 6.000 unidades de glucosa unidas por enlace glicosídico $\alpha(1\rightarrow4)$; mientras que la amilopectina es un polímero ramificado formado por alrededor de 2 millones de unidades de glucosa unidas por enlace glicosídico $\alpha(1\rightarrow4)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$ en las ramificaciones. La proporción de estas moléculas en el almidón depende de la fuente de almidón [16].

Como se puede observar en la figura 1.4, la degradación completa de la molécula de almidón en azúcares simples como glucosa y/o maltosa, ocurre por la acción conjunta de enzimas con actividad amilolítica.

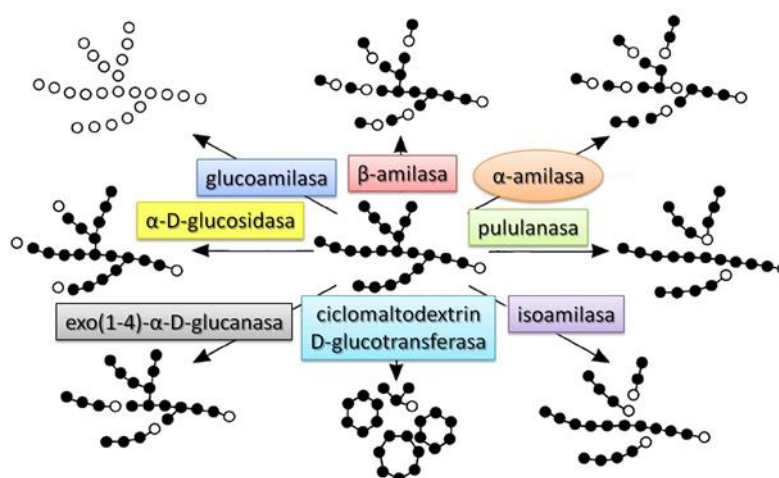


Figura 1.4: Degradación enzimática del almidón. Los círculos blancos y negros representan a los azúcares reductores y no reductores, respectivamente [17].

La α -Amy es una proteína monomérica formada por 478 aminoácidos, ampliamente estudiada por cristalografía de rayos X [18, 19]. Su estructura tridimensional se muestra en la figura 1.5.

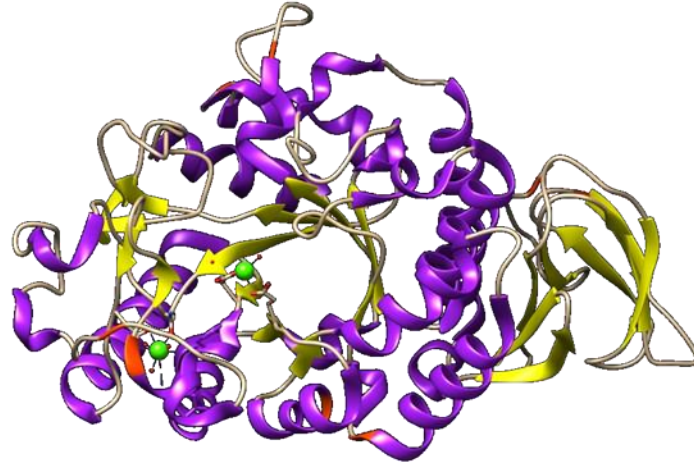


Figura 1.5: Estructura tridimensional de α -Amy de *A. oryzae*. En rojo se muestran los residuos de Cys involucrados en la formación de puentes disulfuro. [DOI: 10.2210/pdb6taa/pdb]

La molécula está plegada en dos dominios principales: uno amino terminal (dividido en dos subdominios A y B) y uno carboxilo terminal denominado dominio C. El dominio A (que se extiende desde el residuo 1 al 121 y del 177 al 380) está plegado en una estructura supersecundaria de barril $(\beta/\alpha)_8$, donde ocho α -hélices rodean a ocho láminas β , en su mayoría paralelas, que conforman el barril. El dominio B (que se extiende desde el residuo 122 al 176) se encuentra entre la tercera lámina β y la tercera α -hélice del dominio A y contiene tres láminas β antiparalelas y una región de menor regularidad estructural. El dominio C (que se extiende desde el residuo 384 al 478) se pliega en ocho láminas β en sándwich antiparalelo y se encuentra unido al dominio amino terminal a través de una cadena polipeptídica compuesta principalmente por residuos hidrofóbicos [18-20].

Hacia el extremo carboxilo terminal del barril $(\beta/\alpha)_8$ del dominio A se localiza una gran hendidura donde se halla el sitio activo de la enzima y los dos sitios de unión a Ca^{2+} , esenciales para la integridad estructural del mismo y para la regulación de la actividad catalítica de α -Amy [21].

La estructura tridimensional de la proteína se halla estabilizada por cuatro puentes disulfuro que ligan los residuos de cisteína 30-38, 150-164, 240-283 y 440-475. Además, la cadena de oligosacárido de esta glicoproteína se encuentra covalentemente unida al residuo

de asparagina 198 [18].

Las propiedades fisicoquímicas de α -Amy de *A. oryzae* se muestran en la tabla I.III.

Tabla I.III: Propiedades fisicoquímicas de α -Amy*.

PM (Da)	54.000
pI	4,2
pH estabilidad	4,0 – 10,0
pH óptimo	5,0 – 6,0
T estabilidad (°C)	20,0 – 60,0
T óptima (°C)	50,0

*Estos valores pueden variar dependiendo de la cepa.

1.2.2 Expresión del gen de α -Amy en *Aspergillus oryzae*

Las cepas de *A. oryzae* poseen dos o tres genes de alfa-amilasa. La cepa RIB 40, cuyo genoma es el único secuenciado completamente, posee tres genes: *amyA* localizado en el cromosoma 2, *amyB* localizado en el cromosoma 5 y *amyC* localizado en el cromosoma 3 [22]. La expresión de estos genes se activa en presencia de almidón y maltosa y se inhibe en presencia de azúcares simples como la glucosa [23, 24].

Se ha reportado la existencia de un represor y un activador de la expresión de estos genes (y de todos los genes del sistema amilolítico) denominados CreA y AmyR, respectivamente. AmyR activa la expresión de estos genes en respuesta a la presencia de isomaltosa, un producto de la hidrólisis de almidón [25, 26]; mientras que creA es un factor de regulación negativa que media la represión por catabolito [27]. Además, en *A. oryzae* (y también en *A. nidulans*) existe un factor de transcripción denominado AoCP, formado por las subunidades AoHapB, AoHapC y AoHapE, que aumenta la expresión del gen de α -Amy [28]. Estas proteínas pertenecen a la familia de proteínas de unión a CCAAT que se encargan de aumentar la expresión de genes eucariotas de una gran variedad de especies de acuerdo a cambios en factores ambientales [29].

1.2.3 Aplicaciones industriales

La α -Amy es una de las enzimas más empleadas en la industria y su aplicación se encuentra directamente relacionada con su capacidad de degradar moléculas de almidón.

En la industria alimenticia, particularmente durante la elaboración de panificados, se la utiliza para suplementar la harina con el objetivo de mejorar las propiedades organolépticas del producto. Por un lado, al degradar el almidón, disminuye la viscosidad de la masa y, al aparecer azúcares fermentables, favorece el aumento del volumen y mejora la estructura de la miga. Además, aumenta la vida útil del panificado ya que el almidón está involucrado en el fenómeno de envejecimiento del producto [8]. También se la utiliza en la elaboración de jarabe de alta fructosa, en combinación con otras enzimas como la glucosa isomerasa y la glucoamilasa [30].

En la industria de biocombustibles, α -Amy se aplica durante la producción de bioetanol para degradar el almidón que se emplea como materia prima. Además, puede aplicarse en la industria textil, papelera, durante la elaboración de alimento animal para mejorar la digestibilidad y como componente de detergentes [31].

1.2.4 Producción de α -Amy

Los procesos de producción de amilasas se centran en la producción de α -Amy y están basados en la fermentación de microorganismos que naturalmente producen la enzima o microorganismos recombinantes [31]. Se han desarrollados procesos de fermentación tanto en estado sólido como sumergido, en lote alimentado o continuo [32, 33, 34].

Entre los microorganismos más utilizados, se encuentran cepas mejoradas de los productores naturales *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* [35]. Estos microorganismos producen α -Amy termoestables con gran potencialidad en la industria. También se emplean cepas mejoradas de hongos productores de amilasas como *Penicillium roquefortii* y *Penicillium expansum*; aunque se destaca el uso de hongos filamentosos *A. niger* y *A. oryzae*. La fermentación de hongos puede llevarse a cabo en medio líquido o sólido, incluso empleando desechos agroindustriales como soporte y fuente de nutrientes. Por otro lado, se emplean microorganismos recombinantes para la expresión de amilasas provenientes de bacterias extremófilas, como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pichia*

pastoris [36].

1.3 El hongo *Aspergillus oryzae*

1.3.1 Descripción

Aspergillus oryzae es un hongo filamentoso perteneciente a la familia de los ascomicetos, aislado por primera vez en 1876 por H. Ahlburg a partir de koji, arroz fermentado que sirve como materia prima para la elaboración de una amplia variedad de alimentos: miso, salsa de soja, sake [37]. Su clasificación taxonómica se muestra en la tabla I.IV.

Tabla I.IV: Clasificación taxonómica de *Aspergillus oryzae*.

Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi
Subreino	Dikarya
Filo	Ascomycota
Subfilo	Pezizomycotina
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Aspergillaceae
Género	<i>Aspergillus</i>
Especie	<i>A. oryzae</i>

Taxonómicamente, este hongo se encuentra íntimamente relacionado con *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. sojae*, con la particularidad que *A. oryzae* (y también *A. sojae*) no produce micotoxinas y por ende, se lo considera un microorganismo GRAS (*Generally Recognized as Safe*).

La morfología macroscópica de *A. oryzae* varía dependiendo del medio en el que se encuentre: generalmente evidencia una colonia de color anverso verde, amarillo-verduzco o amarillento, con reverso incoloro, de aspecto algodonoso, superficie lisa y aproximadamente 60 mm de diámetro a la semana de incubación (figura 1.6).

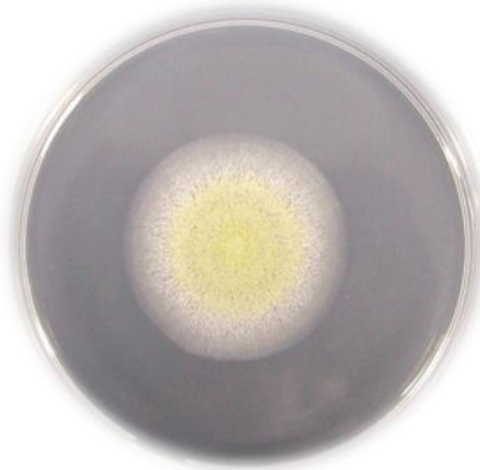


Figura 1.6: Colonia de *A. oryzae* en medio PDA. Copyright© Laboratory of Microbiology - Graduate School of Agricultural and Life Sciences - The University of Tokyo.

La morfología microscópica evidencia conidióforos vesiculares globosos con masa de esporas en forma de columna o radiada y pared áspera o con pequeñas espículas. La figura 1.7 muestra un conidióforo de *A. oryzae*.

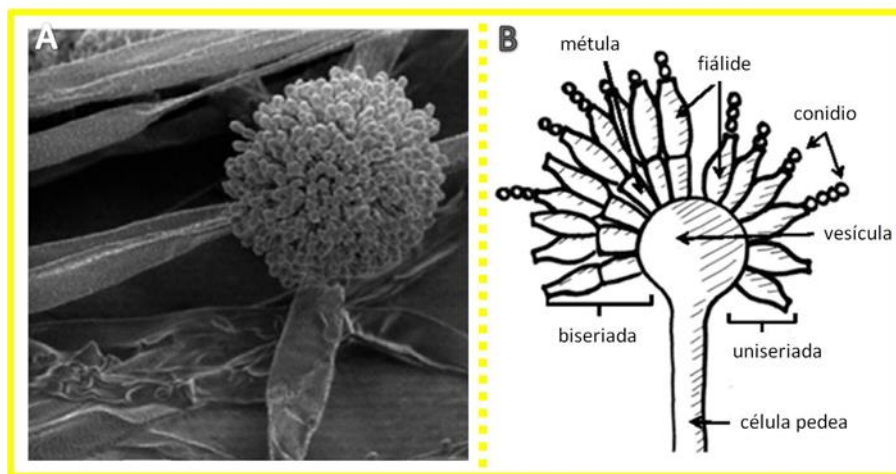


Figura 1.7: Conidióforo de *A. oryzae*. (A) Microscopía electrónica de barrido [38]; (B) Esquema del conidióforo mostrando las distintas partes [39].

Las cabezas conidiales son biseriadas (en algunas cabezas, las fiálides nacen directamente de la superficie de la vesícula y en otras nacen de métulas) y los conidios de *A. oryzae* presentan una forma esférica a ligeramente ovalada, con un diámetro de 5 a 8 μm y poseen superficie lisa o finamente rugosa [40].

1.3.2 *Aspergillus* como productor de enzimas. Estrategias de fermentación

Los hongos filamentosos son muy empleados para la producción de todo tipo de enzimas de interés comercial y metabolitos secundarios como ácido itacónico, lovastatina y taumatina [41, 42]. Particularmente, se destaca el uso de hongos como *A. niger* y *A. oryzae*, los cuales presentan las siguientes ventajas [43]:

- son considerados microorganismos GRAS.
- pueden crecer en un amplio rango de condiciones: temperatura de 10 a 50°C; pH de 2 a 11; osmolaridad hasta 34% de concentración de sales.
- poseen maquinarias de secreción de proteínas efectivas que permiten obtener proteínas en altas concentraciones.
- pueden llevar a cabo modificaciones post-traduccionales.
- pueden crecer en medio sólido con actividad de agua inferior a 0,4.

En contraposición, los genomas de *A. niger*, *A. oryzae* han sido recientemente secuenciados y los estudios de transcriptoma, metabolómica y proteómica se encuentran en su fase temprana. Además, no existen herramientas de biología molecular tan desarrolladas como para *E. coli* o *P. pastoris*. Esto se debe a que los hongos filamentosos presentan una morfología multicelular, una gruesa pared celular y, principalmente, no se han encontrado elementos de ADN extracromosomales replicativos [44, 45]. A pesar de ello, la producción industrial de amilasas (y otras enzimas como la quimosina) se lleva a cabo empleando cepas mejoradas o recombinantes de hongos del género *Aspergillus*.

En la actualidad, se emplean técnicas tradicionales de biología molecular y plásmidos sintéticos para mejorar la producción de la enzima de interés. Algunas de ellas son electroporación, transformación de protoplastos, transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, mutagénesis inducida o dirigida [46, 47]. Para obtener alta eficiencia de transformación, el plásmido debe integrarse al cromosoma: es común encontrar clones poseyendo de una a diez copias del plásmido y se han obtenido clones con más de 50 copias integradas [47-49]. Además, en los últimos años, se han desarrollado herramientas de ingeniería genética basadas en el sistema CRISPR-Cas9 que permitirían modificar genéticamente hongos filamentosos de manera simple y versátil [50].

Alternativamente, los hongos filamentosos se emplean también para producir enzimas homólogas de interés industrial [51-53]. El secretoma de *A. oryzae* está compuesto por una gran variedad de enzimas hidrolíticas con potencial aplicación industrial, involucradas en la degradación de almidón, proteínas y componentes de la pared celular [54]. La vía de secreción de estas enzimas (figura 1.8) se inicia cuando, durante su síntesis, ingresan al retículo endoplasmático donde sufren distintas modificaciones: glicosilación, fosforilación, formación de puentes disulfuro. Luego, las proteínas viajan por transporte vesicular hacia el aparato de Golgi donde se realizan modificaciones adicionales. Finalmente, las proteínas se empaquetan en vesículas de secreción y se transportan a la membrana plasmática para ser secretadas [55].

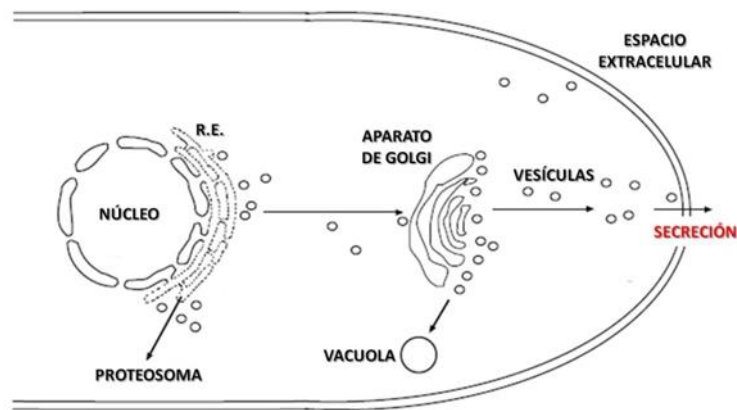


Figura 1.8: Vía de secreción de enzimas en hongos filamentosos [49].

La producción de enzimas homólogas de hongos filamentosos está directamente relacionada con la velocidad de crecimiento del mismo; por lo tanto, todas las variables que afecten el desarrollo del hongo afectarán también la producción de la enzima de interés [56, 57]. La gran versatilidad de estos microorganismos permite aplicar diferentes estrategias de fermentación: en estado sólido (FES) empleando diversos residuos agroindustriales [58] y fermentación en medio líquido (SmF, del inglés *Submerged Fermentation*) en lote, lote alimentado o continuo [59, 60]. La tabla I.V compara algunas de las principales características de la FES y la SmF [61].

Tabla I.V: Comparación entre FES y SmF.

Fermentación en estado sólido (FES)	Fermentación en medio líquido (SmF)
No hay agua libre y el contenido de agua del sustrato es bajo.	El agua es el principal componente del medio.
Existe un gradiente de concentración de los nutrientes.	No existe un gradiente. Los nutrientes se encuentran distribuidos de manera homogénea.
El sistema consiste en 3 fases: sólido, líquido y gas, siendo ésta última la fase continua.	El sistema consiste en una única fase continua, la líquida.
El inóculo es grande, superior al 10 %.	El inóculo es inferior al 10 %.
Al finalizar la fermentación, la concentración del producto es alta.	Al finalizar la fermentación, la concentración del producto es baja.
El mezclado es difícil y el crecimiento del microorganismo se ve restringido por la difusión de los nutrientes.	El mezclado es fácil y el crecimiento no se encuentra restringido.
Los parámetros del proceso de fermentación son difíciles de controlar.	Los parámetros del proceso de fermentación pueden ser medidos y controlados en línea fácilmente.
La difusión del calor metabólico es difícil.	El control de la temperatura es fácil.
Materias primas de bajo costo.	Materias primas más costosas.

En la actualidad, la mayoría de las enzimas de uso industrial se producen por fermentación sumergida.

1.3.2.1 Fermentación sumergida de hongos filamentosos

En medio líquido, los hongos filamentosos pueden crecer como elementos hifales dispersos o como agregados macroscópicos compuestos únicamente por micelio denominados *pellets* (figura 1.9) [62].

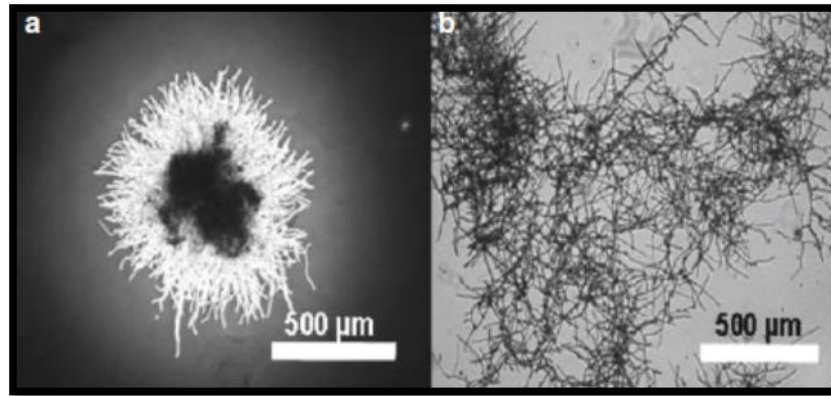


Figura 1.9: Características morfológicas de *A. niger*. **(A)** pellet a pH 5,5 luego de 32 horas de incubación; **(B)** elementos hifales dispersos a pH 3,0 luego de 24 horas de incubación.

En muchos casos, el crecimiento disperso del hongo es preferible ya que los procesos difusivos por los cuales se intercambian nutrientes y metabolitos con el medio no se encuentran restringidos. Sin embargo, esta condición aumenta la viscosidad del medio y en consecuencia, dificulta la homogenización del sistema y la transferencia de masa. Además, puede conllevar a problemas técnicos asociados a la obstrucción de cañerías en biorreactores. El desarrollo en forma de *pellets* remedia estos inconvenientes pero dificulta la transferencia de masa hacia el interior del *pellet* (de oxígeno y sustrato) y hacia el exterior del mismo (de metabolitos secundarios y primarios, incluida la enzima de interés).

Entre los factores que determinan la morfología del hongo en medio líquido, se pueden enumerar el tamaño y tipo de inóculo (esporas o vegetativo), la velocidad de agitación, la concentración y naturaleza de las fuentes de nitrógeno y carbono, el pH, la temperatura y concentración de oxígeno disuelto [63, 64], aunque estos efectos son muy dependientes de la especie estudiada. La tabla I.VI muestra la influencia de estas variables sobre la formación de *pellets*.

Tabla I.VI: Variables que afectan el tamaño y estructura de los *pellets*.

Variables	Efecto
inóculo	↓ concentración de esporas, ↑ tamaño
f fuente de carbono	↑ concentración, ↑ tamaño
f fuente de nitrógeno	no concluyente
pO₂	↑ pO ₂ , ↑ tamaño
pH	3,0 ≤ pH ≤ 3,5 → elementos hifales dispersos 4,0 ≤ pH ≤ 5,0 → elementos dispersos + <i>pellets</i> pH ≥ 6,0 → <i>pellets</i>
temperatura	no concluyente
velocidad de agitación	↑ velocidad, ↓ tamaño

La condición más favorable es aquella en la que los *pellets* presenten el menor tamaño.

1.3.3 Residuos agroindustriales

En la región existen muchas empresas que generan residuos o subproductos de origen biológico asociados a sus actividades agroindustriales. Particularmente, se destacan empresas productoras de aceite, biodiesel y harina de trigo, las cuales acumulan grandes cantidades de cascarilla de soja, glicerol y afrechillo de trigo, respectivamente. En consecuencia, resulta importante disponer correctamente de estos desechos o aún mejor, reutilizarlos para evitar el costo adicional de su disposición y una disminución en la rentabilidad del proceso. Actualmente, la cascarilla de soja y el afrechillo de trigo se emplean en la producción de alimento para ganado y el glicerol se refina y se vende para su aplicación en diferentes procesos.

En esta tesina se propone emplear el glicerol y el afrechillo de trigo para el desarrollo del hongo *Aspergillus oryzae* y la producción de α -Amy. Este trabajo se encuentra enmarcado en una línea de investigación enfocada al desarrollo de una plataforma de producción de enzimas fúngicas empleando desechos agroindustriales. El objetivo se planteó

de acuerdo a la posibilidad de firmar un convenio de I+D con la empresa Fitoquímica S.A. (dedicada a la producción de inoculantes biológicos) la cual desea producir y comercializar α -Amy.

1.3.3.1 El glicerol

El glicerol es un alcohol de tres carbonos que se sintetiza durante la producción de biodiesel en la etapa de transesterificación (figura 1.10). Cada 10 kg de biodiesel, se produce 1 kg de glicerol.

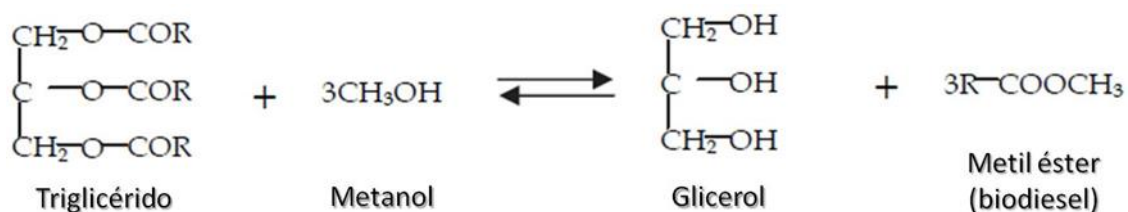


Figura 1.10: Reacción de transesterificación para la síntesis de biodiesel [65].

En la provincia de Santa Fe se produce el 79 % del biodiesel del país (más de 3 millones de toneladas anuales) y se destacan empresas como LDC Argentina S.A. con una capacidad de producción de 610 mil toneladas anuales y Renova S.A., Patagonia Bioenergía S.A. y T6 Industrial S.A. con capacidad de 480 mil toneladas cada una [66].

Actualmente, este subproducto se emplea en la industria farmacéutica y cosmética como solvente, lubricante y humectante; en la alimenticia como solvente y conservante y en la producción de bioplásticos como plastificante [67].

En este trabajo, el glicerol se empleó como fuente de carbono de bajo costo.

1.3.3.2 El afrechillo de trigo (ADT)

Durante la producción de harina de trigo, se emplea el 75 % del total del trigo molido, siendo el principal subproducto (en volumen) el ADT (figura 1.11), el cual se utiliza en la producción de alimento animal y como suplemento alimenticio para las vacas de ordeño [68].



Figura 1.11: Afrechillo de trigo.

El afrechillo de trigo está compuesto, básicamente, por el pericarpio del grano luego de la extracción del almidón (harina). La cantidad de almidón remanente en este desecho depende de las tecnologías utilizadas en el proceso de obtención de las harinas. La composición de este subproducto se detalla en la tabla I.VII.

Tabla I.VII: Composición porcentual del afrechillo de trigo [68]

Materia Seca	87,0
Proteína Bruta	14,0 - 16,0
FDN (Fibra detergente neutro)	41,0
Grasa	4,6
Cenizas	5,2
Almidón	16,0 - 22,0
Calcio	0,3
Fósforo	1,0

Según datos presentados por la Federación Argentina de la Industria Molinera, durante el año 2017, en la provincia de Santa Fe se molieron 511.713 toneladas de trigo. Los datos a nivel nacional indican una producción de 1.455.902 toneladas de desecho en 2016 [69]. La figura 1.12 muestra las provincias que mayor cantidad de trigo muelen en la Argentina.

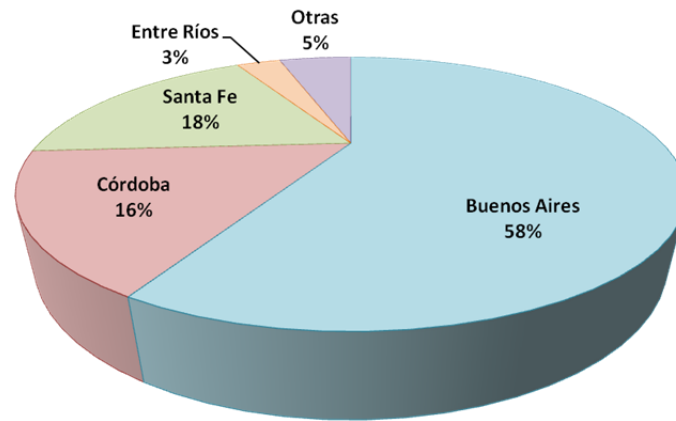
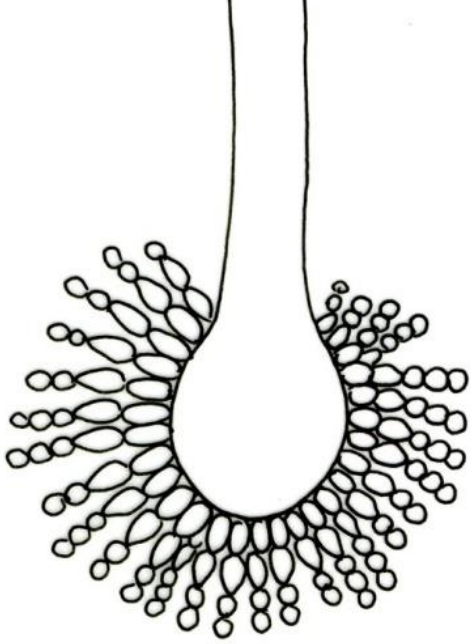


Figura 1.12: Porcentaje de trigo molido por provincia en el año 2016.

En esta tesina, el afrechillo de trigo se empleó como “sustrato de liberación lenta”, con la intención de evitar la represión por catabolito debida a las altas concentraciones de azúcares simples.



OBJETIVOS

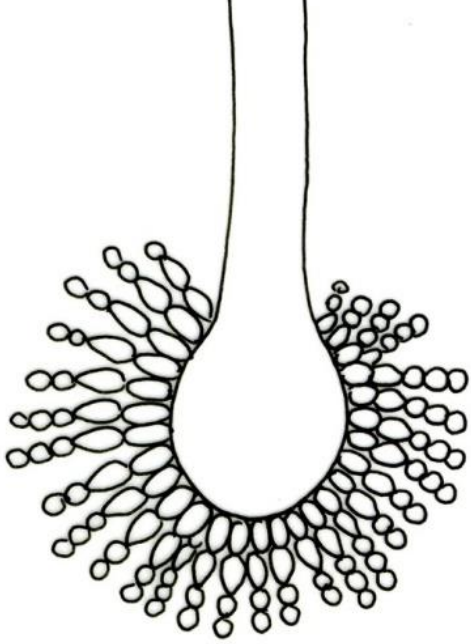
2 Objetivos

2.1 Objetivo General

El objetivo de esta tesina fue producir la enzima α -Amy por fermentación del hongo *Aspergillus oryzae* empleando glicerol como única fuente de carbono.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudiar el desarrollo del hongo *Aspergillus oryzae* cepa NRRL 695 en medio líquido mínimo usando glicerol refinado como única fuente de carbono.
- Analizar el efecto de las variables experimentales sobre el crecimiento del hongo: pH, tiempo, temperatura, fuente de nitrógeno.
- Determinar las condiciones óptimas para la producción de α -Amy: pH, temperatura, tiempo, concentración de glicerol.
- Evaluar la producción de α -Amy empleando subproductos agroindustriales: glicerol crudo y afrechillo de trigo, como fuentes de carbono.



MATERIALES Y MÉTODOS

3 Materiales y Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Microorganismo y medio de cultivo

- *Aspergillus oryzae*: cepa NRRL 695 gentilmente cedida por el National Center for Agricultural Utilization Research (ARS), USDA, USA.
- Medio de cultivo para propagación: medio de cultivo sólido papa agar glucosado (adquirido en Laboratorios Britania S.A.) preparado por pesada directa de la droga sólida (39 gramos por litro de agua destilada) y esterilizado a 121 °C durante 20 minutos en autoclave. Luego, se lo dejó enfriar hasta solidificación completa del medio antes de usar.
- Medio de cultivo para fermentación: medio de cultivo líquido mínimo, desarrollado a partir de la bibliografía [56, 60, 70, 71], preparado por pesada directa de las sales y posterior disolución en agua destilada para obtener las concentraciones mostradas en la tabla III.I.

Tabla III.I: Composición del medio cultivo.

Sal	Concentración (g/L)
KH_2PO_4	20,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,0
NaCl	1,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,0

El pH final del medio se ajustó con NaOH 4 N o HCl de acuerdo a lo requerido. Todas las drogas son de calidad analítica, adquiridas a Reagents S.A. (línea Cicarelli). Luego, se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos en autoclave.

- Elementos trazas: El medio de cultivo se suplementó con una solución de

elementos traza 1000 X, preparada por pesada directa de las sales y posterior disolución con agua destilada en dos pasos: primero, se preparó la solución 1 conteniendo EDTA y $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y se llevó a pH 5,5 con KOH sólido. Luego, se preparó la solución 2 conteniendo varias sales de metales y se mezcló con la solución 1. Las concentraciones de cada sal en la mezcla final se muestran en la tabla III.II.

Tabla III.II: Composición de la solución de elementos traza.

Sal	Concentración (g/L)
EDTA	50,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	15,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	2,0
H_3BO_3	10,0
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	5,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1,5
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,0

El pH se ajustó a 6,0 por agregado de KOH sólido y la solución de elementos traza se esterilizó usando un filtro Sartorius MiniSart[®] NML con un tamaño de poro igual a 0,2 μm . Todas las drogas son de calidad analítica.

3.1.2 Reactivos y Soluciones

- Alfa-amilasa (α -Amy) de *Aspergillus oryzae*: marca Sigma-Aldrich y empleada sin previa purificación. Droga sólida en forma de polvo liofilizado con actividad enzimática de 48 U/mg del sólido y 243 U/mg de proteína. La solución madre de α -Amy, de concentración 10 g/L, se preparó por pesada directa de la droga sólida y posterior disolución en *buffer* KH_2PO_4 50 mM pH 6,0. Las mismas fueron fraccionadas y congeladas a -20 °C hasta su empleo.
- Glicerol refinado: reactivo líquido adquirido a Reagents S.A. (línea Cicarelli) con

valoración de 98,0 % p/v y una densidad igual a 1,26 g/cm³. Las soluciones se prepararon por pesada directa del reactivo y dilución con agua destilada a la concentración final de trabajo. Luego, se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos en autoclave.

- Glicerol crudo (sin refinar): gentilmente cedido por Unitec Bio S.A. Las soluciones se prepararon del mismo modo que para el glicerol refinado.
- Fuentes de carbono varias: drogas sólidas de diversos azúcares (almidón, maltosa, glucosa y dextrina) de calidad analítica. Las soluciones madre de concentración 40 % p/v se prepararon por pesada directa de la droga y posterior disolución en agua destilada. Se esterilizaron usando un filtro Sartorius MiniSart[®] NML con un tamaño de poro igual a 0,2 µm. El almidón se usó en su forma sólida; agregándose directamente al medio mínimo antes de la esterilización en autoclave.
- Afrechillo de trigo: cedido gentilmente por Molinos OS S.A., con valoración de entre 16,0 y 22,0 % p/p de almidón. El material fue mortereado y tamizado empleando un tamiz de ensayo MACOTEST (malla ASTM número 20 con una abertura de 840 micrones). Las partículas fueron esterilizadas junto al medio de cultivo o en forma separada según el experimento ensayado, en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
- *Buffer* fosfato monobásico de potasio: solución de KH₂PO₄ 50 mM pH 6,0 preparada por pesada directa de la droga sólida (marca Cicarelli) y disolución en agua destilada. Posteriormente, se ajustó el pH con una solución de NaOH 4 N y se llevó a volumen final con agua destilada.
- 2-cloro-p-nitrofenil-α-D-maltotriósido (CNP-G3): sustrato cromogénico para la medición de actividad catalítica de α-Amy provisto en el kit Amilasa 405AA de Laboratorios Wiener para determinación de amilasa en suero, plasma u orina.
- Kit para la determinación de la concentración de glicerol: kit colorimétrico TG Color GPO/PAP AA de Laboratorios Wiener para la determinación de triglicéridos en suero o plasma, provisto de un estándar de glicerol 0,2 g/L, Reactivo A

conteniendo una mezcla de enzimas y 4-aminofenazona (4-AF) y Reactivo B conteniendo clorofenol 0,4 mmol/L pH 7,5. El reactivo de trabajo se obtuvo mezclando los Reactivos A y B.

- Soluciones para electroforesis SDS-PAGE: todas las soluciones se prepararon de acuerdo a las indicaciones del Manual de Instrucciones provisto por Bio Rad para los equipos Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell.

3.1.3 Equipamiento

- Espectrofotómetro Jasco V-530: equipo de doble haz con lámparas de deuterio y de tungsteno que permiten trabajar en un rango de longitudes de onda de 190-1100 nm. El monocromador posee un ancho de banda de 2 nm y una exactitud de $\pm 0,3$ nm. La velocidad de barrido abarca un rango de 40-8000 nm.min⁻¹. El rango fotométrico varía desde -2,000 a 3,000 Abs (0 a 200 %T).
- Espectrofotómetro BOECO S-20: equipo de simple haz con una lámpara de tungsteno que permite trabajar en un rango de longitudes de onda de 320-1100 nm. El monocromador posee un ancho de banda de 8 nm y una exactitud de ± 2 nm. El rango fotométrico varía desde -0,300 a 1,999 Abs (0 a 199,9 %T).
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO: equipo de simple haz con lámpara de xenón que permite trabajar en un rango de longitudes de onda de 200-1000 nm. El monocromador posee un ancho de banda menor a 2,5 nm y una exactitud de ± 2 nm. El rango fotométrico varía de 0 a 2,500 Abs, con un desvío estándar menor a 0,003 Abs. Este equipo también cuenta con un incubador que permite trabajar en un rango de temperaturas de 4-45 °C sobre la temperatura ambiente y un agitador lineal con una amplitud de 1, 3 y 15 mm. Permite trabajar tanto con cubetas como con microplacas de 96 pocillos.
- Agitador orbital BOECO OS-20: equipo suplementado con la plataforma UP-12, con una amplitud de agitación de 20 mm y un rango de velocidades de 50-250 rpm.
- Estufa de cultivo San Jor SL70C: equipo con un rango de temperatura de 20-70 °C

provisto con termorregulador electrónico que permite trabajar con una exactitud de $\pm 0,1$ °C.

- Balanza analítica OHAUS Pioneer™: equipo con una capacidad de 201 g, repetibilidad (desviación típica) de 0,1 mg y sensibilidad de 0,0001 g.
- Otros: campana de flujo laminar pbi brand MiniFlo 2; ultracentrífuga refrigerada Sigma 3-18K; centrífuga Presvac EPF-12; estufa de secado BIOELEC RG 41.1; equipo de electroforesis Bio Rad Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell; balanza granataria OHAUS CS 200; pHmetro HANNA HI 2211; micropipetas BOECO de volumen variable.

3.2 Métodos

3.2.1 Desarrollo del hongo *Aspergillus oryzae* en medio sólido

La cepa *A. oryzae* NRRL 695 se propagó en medio sólido papa agar glucosado durante 7 días a 30 °C. Luego, se agregaron 15 mL de glicerol 20 % p/v y los conidios se resuspendieron con agitación constante durante 10 minutos. Finalmente, la suspensión de conidios se alicuotó en crioviales y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La concentración de conidios se determinó mediante recuento de viables en placa de Petri con medio papa agar glucosado, suplementado con 0,04 % p/v de CaCO₃ y 0,04 % p/v de MgSO₄·7 H₂O. Se realizaron diluciones seriadas 1/10, se sembraron 100 µL de cada una y se incubaron durante 5 días a 30 °C. Finalmente, se escogieron aquellas placas en las que eran posibles contar hasta 30 colonias fúngicas, un número estadísticamente representativo. Las diluciones fueron sembradas por duplicado.

Para determinar la cantidad de conidios se aplicó la siguiente fórmula:

$$N = n * 10^x * 10 \quad \text{ecuación 3.1}$$

Donde N representa el número de colonias fúngicas/mL, n es el número de colonias desarrolladas en la placa elegida para el recuento, x es la inversa de la dilución correspondiente a la placa donde se realizó el recuento y 10 es el factor de dilución.

3.2.2 Fermentación en batch en medio líquido mínimo a pH 6,0 con diferentes fuentes de carbono

La cepa *A. oryzae* NRRL 695 se fermentó durante 90 horas en medio líquido mínimo pH 6,0 en presencia de diferentes fuentes de carbono, con el objetivo de determinar cuál era la más conveniente para llevar a cabo los experimentos de fermentación posteriores. Las fuentes de carbono seleccionadas fueron almidón, dextrina, glicerol, maltosa y glucosa, y se ensayaron a una concentración de 20 g/L.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL del medio inoculado con 9×10^6 conidios. Los sistemas se incubaron a 30 °C con agitación orbital de 150 rpm. El pH se corrigió a 6,0 con NaOH 4 N cuando fue necesario.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a filtrar el cultivo con papel de filtro marca BOECO (grado 3W) y se determinó la actividad catalítica de α -Amy en el filtrado y la cantidad de proteínas totales mediante el Método de BCA (detallados en los ítem 3.2.10 y 3.2.12, respectivamente). Finalmente, se evaluó la pureza de la enzima en el filtrado por electroforesis SDS-PAGE.

3.2.3 Fermentación a pH 6,0 con distintas concentraciones de glicerol

La cepa *A. oryzae* NRRL 695 se fermentó en medio líquido mínimo en presencia de diferentes concentraciones de glicerol: 2, 5 y 10 g/L. La fermentación se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que se describieron en el ítem 3.2.2.

Se tomaron alícuotas a distintos tiempos (49, 96 y 168 horas) para determinar la actividad catalítica de α -Amy. El pH se corrigió a 6,0 con NaOH 4 N cuando fue necesario.

3.2.4 Fermentación a pH 3,0 y pH 6,0 con distintas concentraciones de glicerol

La cepa *A. oryzae* NRRL 695 se fermentó en medio líquido mínimo en presencia de diferentes concentraciones de glicerol: 1, 2, 5, 10 y 20 g/L. Además, se trabajó a dos pHs distintos (3,0 y 6,0).

La fermentación se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que se describieron en el ítem 3.2.2, donde además se determinó la cantidad de biomasa formada por medidas de peso seco: el papel de filtro conteniendo la biomasa se incubó durante 96 horas en una estufa de secado a 70 °C hasta pesada constante. La cantidad de biomasa formada se expresó como gramos de peso seco por litro de cultivo.

Una vez transcurridas las 96 horas de incubación, se procedió a filtrarlo y a determinar la actividad catalítica de α -Amy y la cantidad de biomasa formada. La pureza de la enzima en el filtrado se evaluó por electroforesis SDS-PAGE.

Todas las experiencias se llevaron a cabo por duplicado.

3.2.5 Curva de crecimiento de *A. oryzae* a pH 6,0 con 20 g/L de glicerol

La cepa *A. oryzae* NRRL 695 se fermentó durante 97 horas en medio líquido mínimo a pH 6,0 y con 20 g/L de glicerol como única fuente de carbono.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en botellas de vidrio de 125 mL conteniendo 10 mL del medio inoculado con $1,5 \times 10^6$ de conidios. Se prepararon 6 sistemas idénticos entre sí, que se inocularon al mismo tiempo y se incubaron a 30 °C con agitación orbital de 150 rpm. El pH se corrigió con NaOH 4 N cuando fue necesario.

Cada día hasta el final de la experiencia, se filtró un sistema y se determinó la cantidad de biomasa formada por medidas de peso seco, y en el filtrado, la concentración de glicerol y la actividad catalítica de α -Amy. Cada sistema procesado se consideró como un punto en la curva de crecimiento del hongo. La pureza de la enzima en el filtrado se evaluó por electroforesis SDS-PAGE.

Todas las experiencias se llevaron a cabo por triplicado.

3.2.6 Curva de crecimiento de *A. oryzae* a pH 3,0 con distintas concentraciones de glicerol

Se llevaron a cabo fermentaciones en medio líquido mínimo a pH 3,0 en presencia de diferentes concentraciones de glicerol: 1, 2, 5, 10 y 20 g/L.

Los sistemas se prepararon en una microplaca de 96 pocillos, trabajando con un volumen final de 200 μ L inoculado con $3,6 \times 10^4$ conidios. Se incubaron a 30 °C con agitación lineal de amplitud 3 mm durante 96 hs. Cada 17 minutos, se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm y se graficó vs el tiempo para obtener la curva de crecimiento en cada condición.

Además, se determinó la velocidad de crecimiento como la pendiente de la recta obtenida al ajustar linealmente los puntos de la región central de la curva.

Todas las experiencias se llevaron a cabo por quintuplicado.

3.2.7 Fermentación con cambio de pH y temperatura

Se ensayaron 3 sistemas por duplicado, cuya estrategia se diagrama en la figura 3.1. En los tres casos, la fermentación de la cepa *A. oryzae* NRRL 695 se llevó a cabo en medio líquido mínimo con una concentración de glicerol igual a 20 g/L y a una temperatura inicial de 30 °C.

Se utilizaron Erlenmeyers de 250 mL con 50 mL del medio inoculado con 9×10^6 de conidios y se incubaron con agitación orbital de 150 rpm.

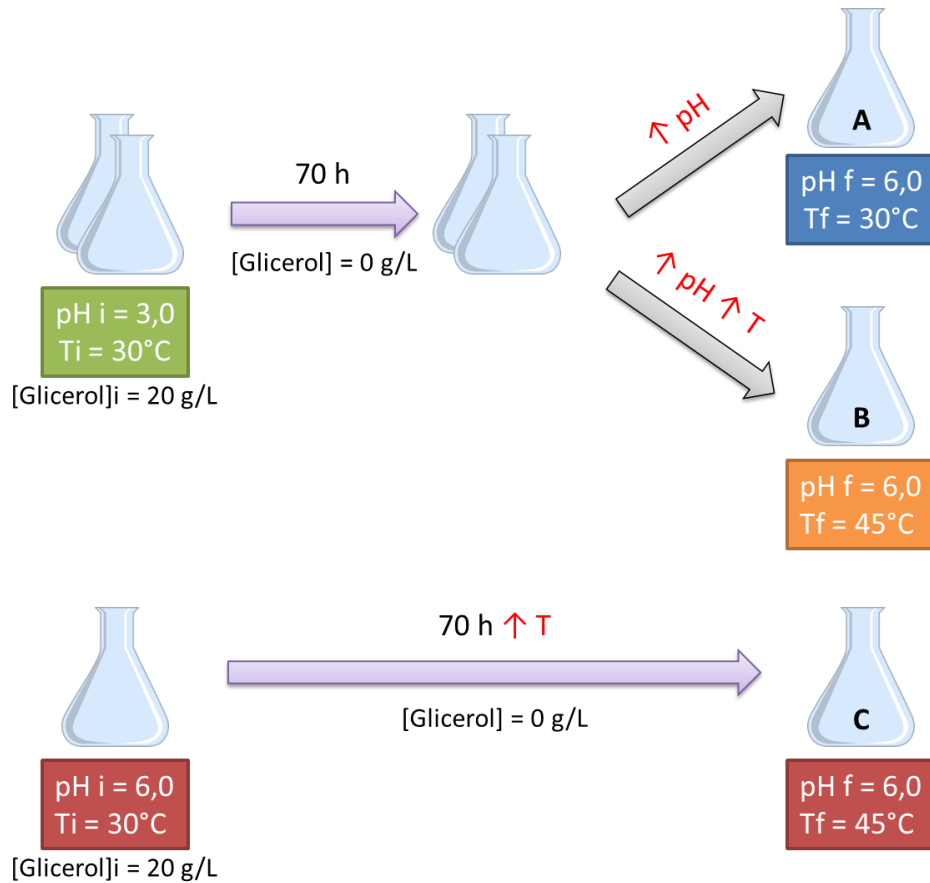


Figura 3.1: Esquema de trabajo aplicado para estudiar el cambio de pH y temperatura durante la fermentación.

El sistema "A" comenzó con un valor de pH igual a 3,0 y a las 70 horas se lo subió a 6,0 manteniendo la temperatura de incubación (30°C) constante. El sistema "B" siguió el mismo protocolo inicial que el "A", pero a las 70 horas se le subió la temperatura de incubación a 45°C y el pH a 6,0. Por último, el sistema "C" comenzó a pH 6,0, manteniéndolo constante durante todo el experimento y a las 70 horas se varió la temperatura de incubación a 45°C .

Al transcurrir las 96 horas de trabajo, se procedió a filtrar los sistemas y a determinar la actividad catalítica de α -Amy y la cantidad de biomasa formada por medidas de peso seco, como se describió en el ítem 3.2.4.

Posteriormente los filtrados de los sistemas "A" y "C" se ultrafiltraron con tubos concentradores marca Sartorius vivaspin[®] 20 y se lo sembró en un gel SDS-PAGE. Las bandas de interés fueron analizadas mediante espectrometría de masa, como se detalla en el ítem 3.2.14.

3.2.8 Efecto de la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y otras fuentes de nitrógeno sobre la producción de α -Amy

Se llevó a cabo la fermentación en medio líquido mínimo a pH 3,0 aplicando el mismo protocolo que se detalló en el ítem 3.2.7 para el “sistema A”: a las 70 horas de incubación se subió el pH a 6,0, manteniendo la temperatura a 30 °C. Se utilizaron peptona y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno y se evaluaron distintas concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ según muestra la tabla III.III.

Tabla III.III: Fuentes de nitrógeno ensayadas en medio líquido mínimo

Sistema	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Peptona (g/L)	Extracto de levadura (g/L)
A	1,0	-	-
B	5,0	-	-
C	-	5,0	-
D	-	-	5,0

Al transcurrir las 96 horas de trabajo, se procedió a filtrar los sistemas y a determinar la cantidad de biomasa formada por medidas de peso seco y la actividad catalítica de α -Amy.

Todas las experiencias se llevaron a cabo por duplicado.

3.2.9 Fermentación con glicerol crudo

Se llevó a cabo la fermentación en medio líquido mínimo a pH 3,0 aplicando el mismo protocolo que se detalló en el ítem 3.2.7 para el sistema “A”. En este experimento se utilizó glicerol crudo y glicerol refinado a una concentración de 10 g/L cada uno.

Al transcurrir las 96 horas de trabajo, se procedió a filtrar los sistemas y a determinar la cantidad de biomasa formada por medidas de peso seco y la actividad catalítica de α -Amy.

Se calculó el rendimiento ($Y_{p/x}$) como el cociente entre la actividad enzimática (U/L) y la cantidad de biomasa formada (g/L).

Las experiencias se realizaron por duplicado.

3.2.10 Fermentación con glicerol y afrechillo de trigo

Se ensayaron 6 sistemas por duplicado, como se muestra en la tabla III.IV. En todos ellos, la fermentación de la cepa *A. oryzae* NRRL 695 se llevó a cabo en Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio líquido mínimo inoculado con 9×10^6 conidios. La agitación orbital fue de 150 rpm y se trabajó a temperatura constante de 30 °C.

Tabla III.IV: Sistemas ensayados con glicerol y afrechillo de trigo.

Sistema	Glicerol (g/L)	ADT (g)		Equivalente de Almidón (g/L)	pH	
		Inicial	Adicionado		Inicial	Final
G	20	-	-	-	3,0	6,0
2A	20	-	0,5	1,6 - 2,2	3,0	6,0
5A	20	-	1,25	4,0 - 5,5	3,0	6,0
10A	20	-	2,5	8,0 – 11,0	3,0	6,0
Ai3	-	2,5	-	8,0 – 11,0	3,0	6,0
Ai6	-	2,5	-	8,0 – 11,0	6,0	6,0

Los primeros 4 sistemas siguieron la estrategia descrita en el ítem 3.2.7 para el sistema "A". A los sistemas "2A", "5A" y "10A" junto al cambio de pH, se le adicionó una cantidad suficiente de afrechillo de trigo (ADT) para lograr la concentración equivalente de almidón descrita en la tabla. Al sistema "G" no se le adicionó ADT y fue utilizado como referencia para evaluar qué sistema produjo la mayor cantidad de α -Amy. En la figura 3.2 se esquematiza el experimento descrito.

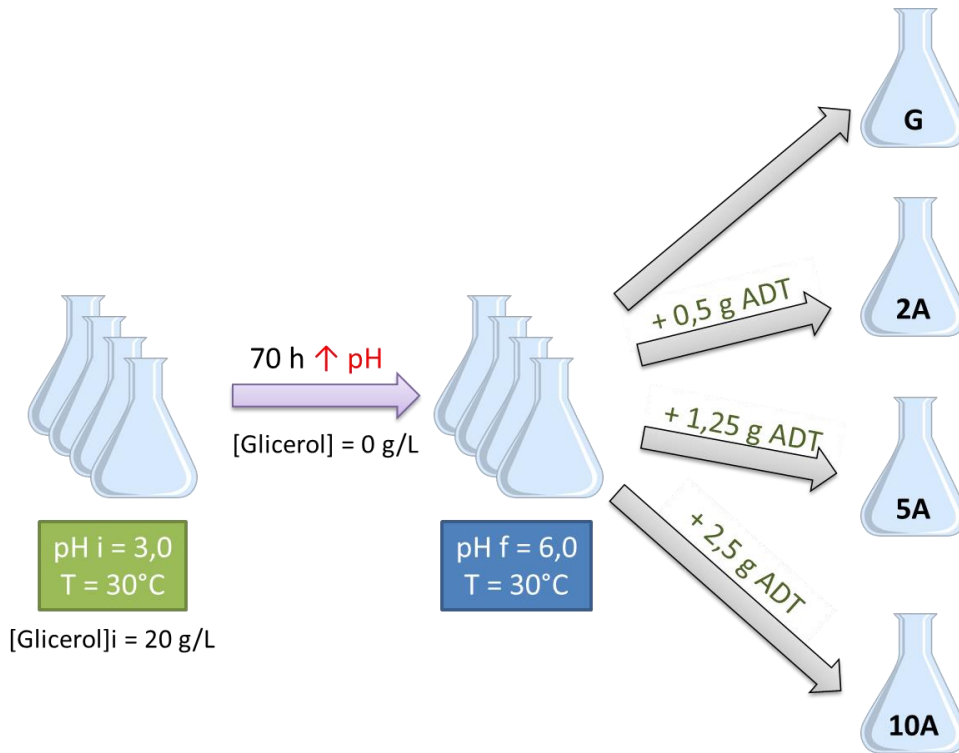


Figura 3.2: Esquema de trabajo aplicado para estudiar el efecto del ADT en la producción de α -Amy.

Los sistemas “Ai3” y “Ai6” comenzaron con una masa ADT cuya concentración equivalente de almidón fue de 8,0 – 11,0 g/L. El sistema “Ai3” comenzó a pH 3,0 y a las 70 horas se lo subió a 6,0, mientras que el sistema “Ai6” comenzó a pH 6,0 y se lo mantuvo constante durante toda la experiencia.

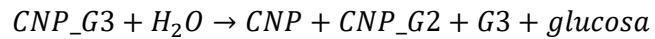
A determinados tiempos de incubación (70, 94, 117 y 142 horas) se tomó una muestra para cada uno de los sistemas, se la centrifugó y al sobrenadante se le realizaron las medidas de actividad enzimática.

La producción de α -Amy y el cambio en la expresión de proteínas fueron evaluadas por electroforesis SDS-PAGE. En una calle se sembró una muestra de ADT (blanco) para evaluar la presencia de proteínas en este sustrato que pudiesen interferir con la interpretación de los resultados. Esta muestra se preparó agregando ADT al medio líquido mínimo a pH 3,0. Luego se la esterilizó, filtró, centrifugó y se sembró el sobrenadante.

3.2.10 Método de medición de actividad catalítica de α -Amy

La actividad catalítica de α -Amy se midió a través de un método cinético empleando el sustrato cromogénico CNP-G3.

Este método se basa en la capacidad que presenta la enzima de hidrolizar específicamente el sustrato de acuerdo a la siguiente reacción, donde *CNP* es 2-cloro-p-nitrofenol; *CNP-G2* es 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltósido y *G3* es maltotriosa:



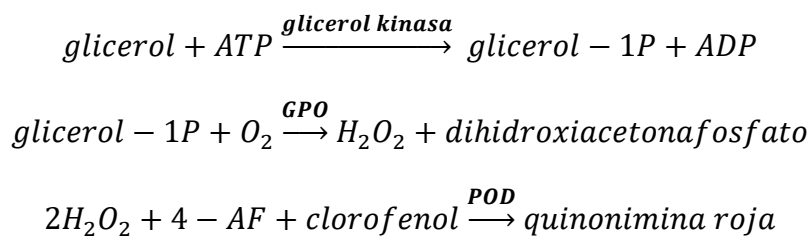
El seguimiento de la reacción se realizó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 405 nm (longitud de onda de máxima absorción del CNP) a través del tiempo. Se preparó una dilución del CNP-G3 en *buffer* KH_2PO_4 50 mM pH 6,0, se realizó el blanco del equipo y luego se agregó la muestra de la enzima, procurando trabajar con el sustrato en exceso y un volumen final de 1,225 mL. La absorbancia a 405 nm se midió cada un segundo, durante 180 segundos. Luego, se graficó en función del tiempo y se obtuvo una recta cuya pendiente es una medida directa de la actividad de la enzima.

La actividad catalítica de α -Amy se expresó en unidades de actividad por litro (U/L). Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un micromol de CNP. El cálculo de la actividad enzimática en U/L a partir de la pendiente ($\Delta Abs/min$) se realizó aplicando la ecuación 3.2, donde 77,52 es un factor de corrección que incluye el coeficiente de extinción molar del CNP y el paso óptico; y vol_{CUBETA} y $vol_{ALÍCUOTA}$ son el volumen final en la cubeta y el volumen de filtrado agregado a la misma, respectivamente.

$$U/L = pendiente \times 77,52 \times \frac{vol_{CUBETA}}{vol_{ALÍCUOTA}} \quad \text{ecuación 3.2}$$

3.2.11 Método de medición de la concentración de glicerol

La concentración de glicerol en el filtrado se determinó a través de un método colorimétrico que emplea un kit de Laboratorios Wiener para la determinación de triglicéridos en suero o plasma. Este kit consta de una mezcla de enzimas necesarias para la serie de reacciones que dan como producto final una quinonimina roja que tiene una longitud de onda de máxima absorción igual a 505 nm. La serie de reacciones es la siguiente:



Un volumen de 10 μL del filtrado se agregó a 1 mL del reactivo de trabajo (A+B) y se incubó 5 minutos a 37 $^\circ\text{C}$. El mismo procedimiento se llevó a cabo usando 10 μL de un estándar de glicerol 0,2 g/L. Luego, se midió la absorbancia a 505 nm y se calculó la concentración de glicerol en el filtrado según la ecuación 3.3:

$$[\text{glicerol}]_{\text{FILTRADO}} = \text{Abs}_{\text{FILTRADO}} \times \frac{0,2 \text{ g/L}}{\text{Abs}_{\text{ESTÁNDAR}}} \quad \text{ecuación 3.3}$$

3.2.12 Método para medir proteínas totales

La concentración de proteínas totales fue determinada aplicando el método de ácido bicinconínico (BCA) [72]. Se fundamenta en la formación de un complejo entre las proteínas y Cu^{+2} en medio alcalino, seguido de reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} . Éste último reacciona con el BCA desarrollándose un intenso color púrpura con un máximo de absorción a 562 nm. Dado que la producción de Cu^{+1} es función de la concentración de proteínas y del tiempo de incubación, el contenido proteico de las muestras incógnitas se determinó espectrofotométricamente contra un estándar de concentración conocida. Se empleó el kit comercial de BCA (Sigma-Aldrich), el cual contiene los siguientes reactivos:

Reactivo A: bicinconinato de sodio (0,1 g), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2 g), tartrato de sodio dihidratado (0,16 g), NaOH (0,4 g) y NaHCO_3 (0,95 g) en 100 mL de H_2O , pH 11,25 ajustado con NaOH 10 M.

Reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,4 g) en 10 mL de H_2O .

Solución de proteína estándar: BSA 1 mg/mL en NaCl 0,15 M y 0,05 % de azida de sodio como preservante microbiano.

El procedimiento fue el siguiente: se preparó la solución de trabajo (RT) mezclando 49 partes del Reactivo A y 1 parte del Reactivo B. Se agregó 200 μL de RT a 25 μL de la mezcla proteica (incógnita o estándar de BSA) y se incubó 30 min a 37 $^\circ\text{C}$. Posteriormente, se

midió la Abs a 562 nm. La concentración de proteínas totales se determinó por extrapolación empleando una curva de calibración (Abs 562 nm vs concentración de BSA) con las muestras estándares de BSA.

3.2.13 Electroforesis SDS-PAGE

La pureza de la muestra y la expresión de proteínas se evaluaron por electroforesis SDS-PAGE, utilizando el equipo Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell de Bio-Rad para geles discontinuos (gel de concentración al 10 %; gel de resolución al 13 %). Los geles y todas las soluciones de trabajo se prepararon de acuerdo al Manual de Instrucciones provisto con el equipo.

La visualización de las bandas proteicas se llevó a cabo aplicando el protocolo de tinción con Coomassie coloidal de acuerdo a las indicaciones del CEQUIBIEM, donde se llevó a cabo el análisis por espectrometría de masa. Se empleó el kit comercial *GE Healthcare Amersham Low Molecular Weight* (código 17-0446-01) como marcadores de pesos moleculares.

3.2.14 Espectrometría de masas (LC-MS)

Las muestras de interés fueron enviadas al Instituto CEQUIBIEM (Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa, UBA) para su análisis mediante LC-MS, técnica química analítica que combina la separación física del HPLC con el análisis de masa de la espectrometría de masas (MS). El protocolo de trabajo y el equipamiento empleado fue el siguiente:

Tratamiento: Las muestras fueron reducidas con DTT 20 mM durante 45 minutos a 56 °C y alquiladas con Iodoacetamida 20 mM durante 45 minutos en oscuridad. Se agregó *buffer* bicarbonato de amonio a una concentración final 50 mM pH 8,0 y se digirió con tripsina durante toda la noche. Cada muestra fue liofilizada por Speed Vac y vuelta a resuspender con 10 µL de Ácido Fórmico 0,1%. Se analizó por nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que permitió separar los péptidos obtenidos por digestión trípica de la muestra para luego identificar a los mismos.

Cromatógrafo: Se utilizó un cromatógrafo modelo EASY-nLC 1000 de Thermo Scientific, apto para separar complejos proteicos con un alto grado de resolución, equipado

con una columna de fase reversa modelo EASY-Spray y una pre-columna modelo Acclaim PepMap, ambas de marca Thermo Scientific. Todos los solventes y reactivos utilizados fueron de calidad LC-MS.

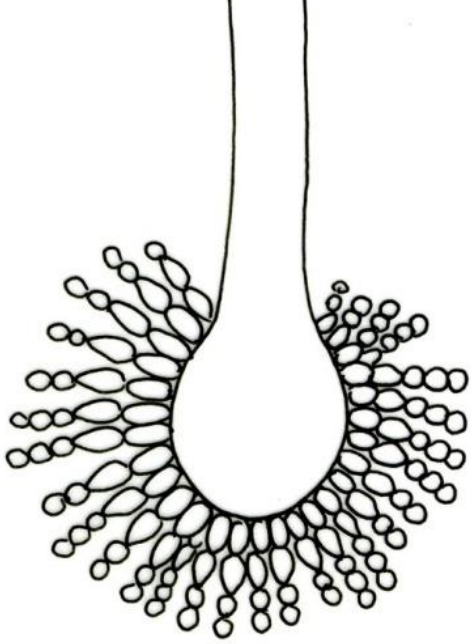
Ionizador: Se utilizó un ionizador por Electro Spray, modelo EASY-SPRAY marca Thermo Scientific.

Espectrómetro de masa: Se utilizó un espectrómetro modelo Q-Exactive de marca Thermo Scientific, con una celda de HCD (*High Collision Dissociation*) y un analizador Orbitrap. La configuración del equipo permitió que la identificación de los péptidos se realizara al mismo tiempo que los mismos se separaban por cromatografía.

Análisis de Datos: Los espectros obtenidos fueron analizados con el motor de búsqueda Proteome Discoverer, utilizando la base de datos de *Aspergillus oryzae* ATCC 42149 / RIB 40. El programa generó un informe que describe las proteínas identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación.

3.2.15 Manejo de los datos experimentales

El análisis de los datos experimentales se realizó utilizando los programas Microsoft Office Excel 2010 y SigmaPlot versión 11.0.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 Resultados y Discusión

4.1 Desarrollo del hongo *Aspergillus oryzae* en medio sólido

Luego de 7 días de incubación, se realizó el recuento de colonias fúngicas en la placa de Petri cuya dilución permitió contar hasta 30 colonias. Se aplicó la ecuación 3.1 y se obtuvo una concentración igual a 3×10^7 conidios/mL.

4.2 Fermentación en batch en medio líquido mínimo a pH 6,0 con diferentes fuentes de carbono

En la tabla IV.I se muestran la actividad catalítica de α -Amy y la concentración de proteínas totales para cada sustrato ensayado. Durante las 90 horas de fermentación, el pH fue disminuyendo, por lo que siempre se lo ajustó a 6,0 con NaOH.

Tabla IV.I: Medidas de actividad de α -Amy y proteínas totales.

Sustrato	Actividad α -Amy (U/L)	Proteínas totales (g/L)
Almidón	17,5	2,5
Dextrina	8,5	4,2
Glicerol	9,3	0,8
Maltosa	11,6	1,1
Glucosa	0,0	0,9

El almidón fue el sistema que presentó mayor actividad catalítica, seguido por maltosa, glicerol, dextrina y glucosa donde no se detectó actividad. Estos resultados son congruentes con el comportamiento que posee cada sustrato con respecto a la expresión de la enzima. En presencia de glucosa, la síntesis α -Amy se inhibe por un mecanismo de represión por catabolito. Por otro lado, al ser el almidón un sustrato de liberación lenta, la concentración intracelular de azúcares simples (principalmente isomaltosa) es baja. De esta manera, se evita este mecanismo de represión, obteniéndose la mayor concentración de α -Amy.

Con respecto a las proteínas totales, el sistema con glicerol fue el que produjo menor concentración.

La figura 4.1 muestra un gel SDS-PAGE en donde se comprobó la pureza de la enzima para cada uno de los sistemas. En presencia de glucosa (calle 7), el hongo no produjo ninguna enzima extracelular. En cambio, en el sistema con glicerol (calle 3) se observó una única banda que corresponde a α -Amy y pocas proteínas contaminantes.

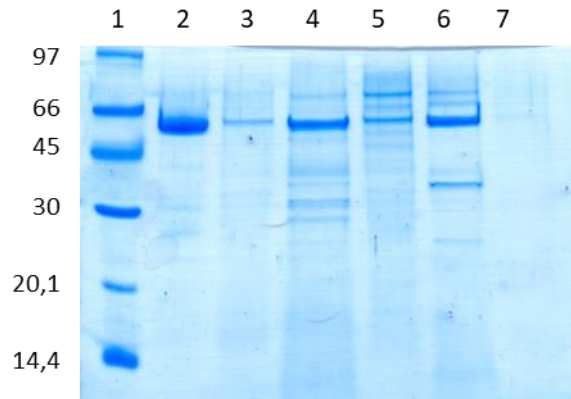


Figura 4.1: Gel SDS-PAGE de la fermentación en batch a pH 6,0 transcurridas 90 horas. Calles: **1:** MPM; **2:** 0,2 g/L de α -Amy pura; **3:** glicerol; **4:** almidón; **5:** dextrina; **6:** maltosa; **7:** glucosa.

La figura 4.2 muestra las fotografías de los cultivos a las 90 horas de incubación. En todos los casos se observó el crecimiento en forma de *pellets* de *A. oryzae*; obteniéndose *pellets* de mayor tamaño para los sustratos de estructura más compleja (almidón y dextrina).

Cuando se realiza una fermentación con hongos filamentosos es deseable obtener *pellets* de pequeño tamaño, para que se pueda lograr una buena transferencia de masa hacia dentro (sustrato y oxígeno) y hacia fuera (metabolitos primarios y secundarios) de los mismos. Por lo tanto, las dimensiones de los *pellets* obtenidos con el medio mínimo con glucosa, glicerol y maltosa son los convenientes para una fermentación en medio líquido.

Además, se observó que a menor tamaño de los *pellets*, mayor es su cantidad.

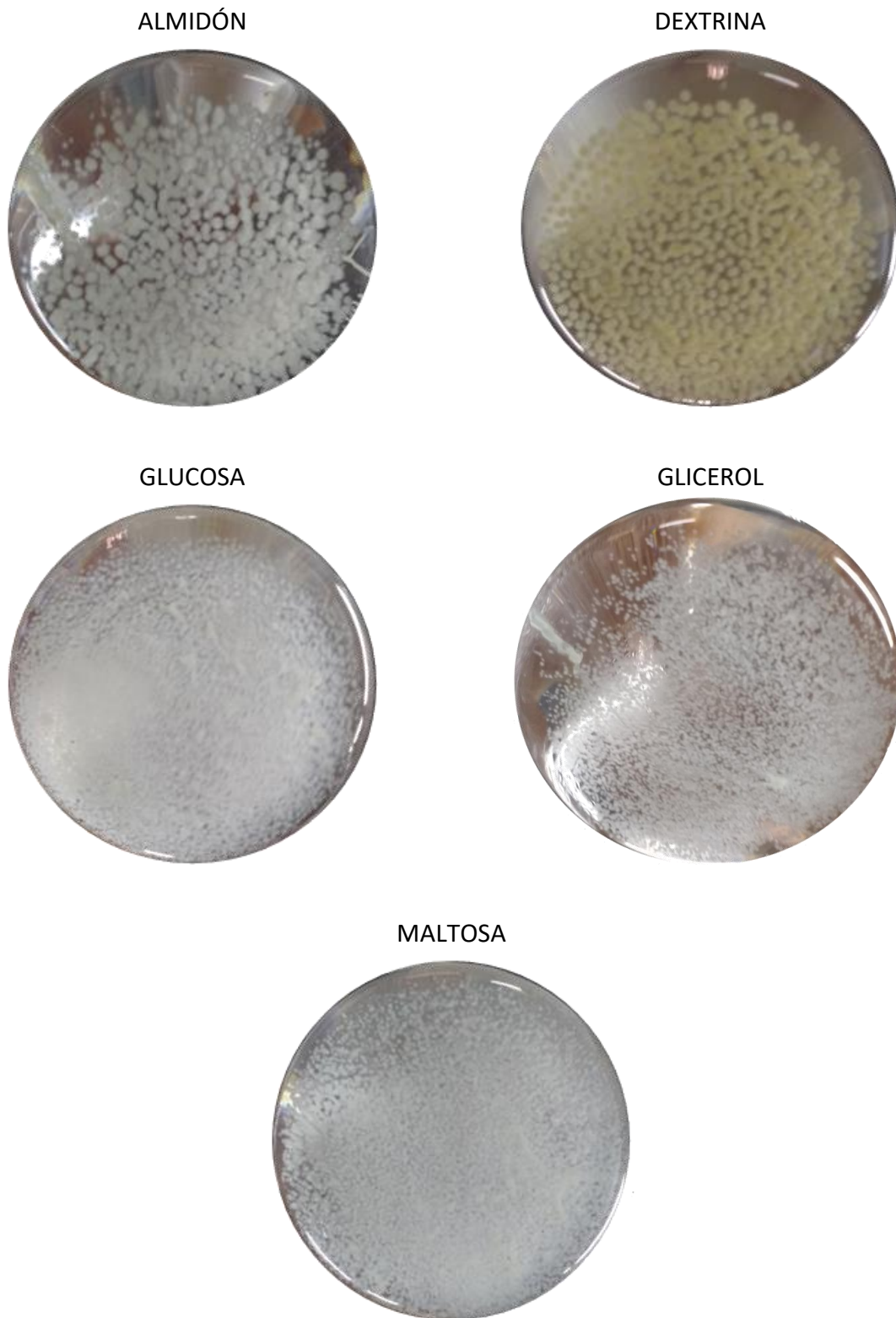


Figura 4.2: Fotografías de los cultivos en medio líquido mínimo a pH 6,0 transcurridas 90 horas.

En base a estos resultados, se escogió al glicerol como sustrato para continuar con los siguientes experimentos, puesto que se obtuvo una buena producción de α -Amy con menor

cantidad de proteínas contaminantes y *pellets* adecuados para una fermentación en medio líquido.

4.3 Fermentación a pH 6,0 con distintas concentraciones de glicerol

Los cultivos con 2 y 5 g/L de glicerol no evidenciaron actividad α -Amy en ninguno de los tiempos ensayados: 49, 96 y 168 horas. Solamente en el sistema con 10 g/L del sustrato se obtuvo actividad enzimática, alcanzándose 4,7 U/L a las 168 horas de incubación (tabla IV.II).

Tabla IV.II: Medidas de actividad de α -Amy (10 g/L de glicerol)

Tiempo	Actividad α -Amy (U/L)
49	1,3
96	3,2
168	4,7

A las 96 horas de fermentación, el sistema mostró una menor actividad enzimática en comparación con el sistema ensayado con 20 g/L de glicerol (tabla IV.I; 9,3 U/L). Así, al trabajar con la mitad de concentración inicial de glicerol, se obtuvo solamente el 35 % de α -Amy.

Por otro lado, a las 168 horas se observó que en los cultivos con 2 y 5 g/L de sustrato, los *pellets* se desarmaron completamente (resultados no mostrados), mientras que en el sistema con 10 g/L la cantidad de *pellets* disminuyó (figura 4.3). En los tres casos, el medio de cultivo se tornó menos viscoso y de un color amarillento. Esta situación no es deseable porque indicaría que el cultivo se está envejeciendo y las células se están lisando.

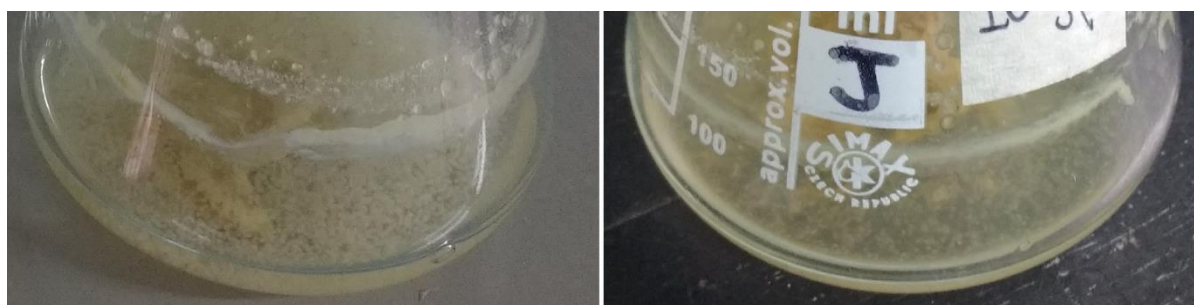


Figura 4.3: Fotografías de los *pellets* en medio líquido mínimo a pH 6,0 con 10 g/L de glicerol. Muchos *pellets* se degradaron: a las 96 horas (izquierda) había más que a las 168 horas (derecha).

Se puede concluir que la mejor condición para llevar a cabo la fermentación es con 20 g/L de glicerol y a un tiempo de incubación no mayor a las 96 horas.

4.4 Fermentación a pH 3,0 y pH 6,0 con distintas concentraciones de glicerol

Las concentraciones de glicerol ensayadas fueron 1, 2, 5, 10 y 20 g/L. Transcurridas las 96 horas de incubación, no se obtuvo actividad α -Amy en ninguno de los sistemas preparados a pH 3,0. Esto fue comprobado en un gel de electroforesis (figura 4.4), donde se observó que no hubo producción de enzimas extracelulares. En las calles 7, 8 y 9 se sembraron controles: se agregó α -Amy pura a la muestra para descartar cualquier interferencia o error en la corrida electroforética.

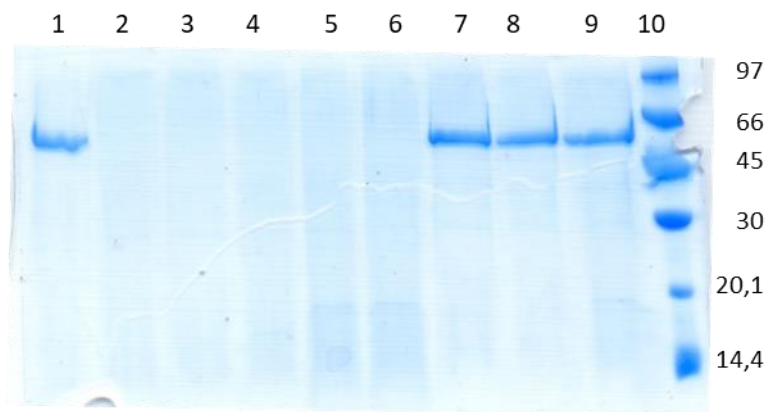


Figura 4.4: Gel SDS-PAGE de la fermentación a pH 3,0 transcurridas 96 horas. Calles: **1:** 0,2 g/L de α -Amy pura; **2:** 1 g/L; **3 y 5:** 10 g/L; **4 y 6:** 20 g/L; **7-9:** controles; **10:** MPM.

Con respecto a los sistemas a pH 6,0, nuevamente se obtuvo la máxima actividad enzimática trabajando con 20 g/L de glicerol ($7,0 \pm 0,2$ U/L).

La tabla IV.III muestra la cantidad de biomasa formada, expresada como gramos de peso seco por litro de cultivo, para las cinco fermentaciones ensayadas a ambos valores de pH.

Tabla IV.III: Valores de biomasa (g/L de cultivo) a pH 3,0 y 6,0

[Glicerol] (g/L)	1	2	5	10	20
pH 3,0	$2,0 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,4$	$4,3 \pm 0,1$	8 ± 2	$14,9 \pm 0,7$
pH 6,0	$6,0 \pm 0,4$	$8,2 \pm 0,7$	$10,1 \pm 0,9$	$15,5 \pm 0,5$	$16,8 \pm 0,2$

Se observó que a mayor concentración de glicerol, mayor fue el aumento en la cantidad de biomasa formada. Además, los sistemas preparados a pH 6,0 mostraron mayores valores que a pH 3,0.

4.5 Curva de crecimiento de *A. oryzae* a pH 6,0 con 20 g/L de glicerol

La figura 4.5 muestra la cantidad remanente de glicerol, la actividad enzimática y la cantidad de biomasa formada en el tiempo.

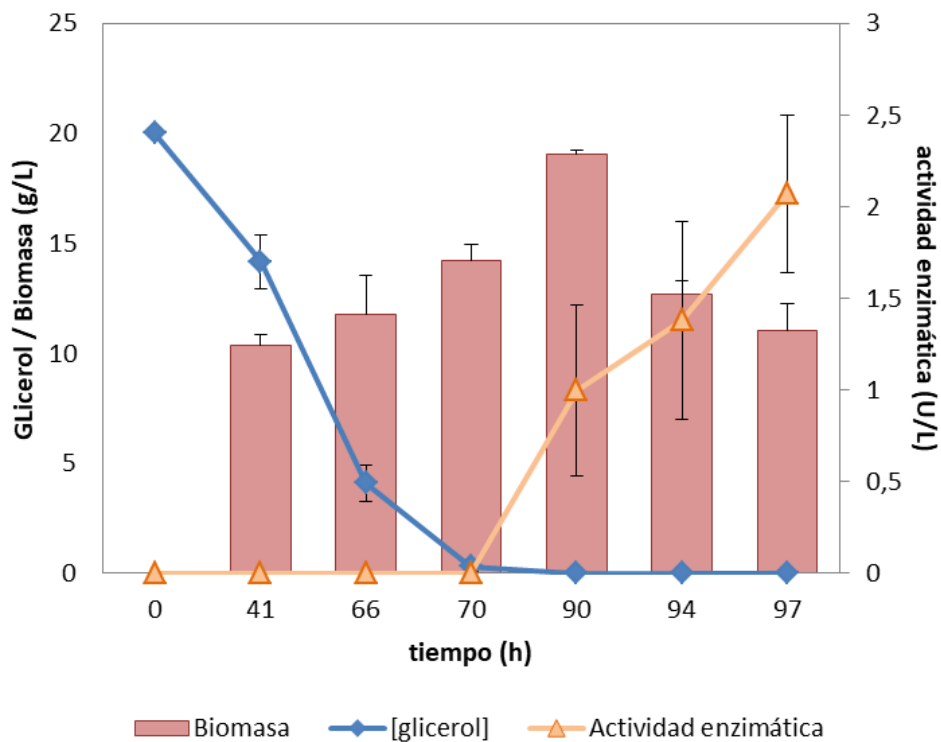


Figura 4.5: Curva de crecimiento en medio líquido mínimo con glicerol a pH 6,0.

A las 70 horas de incubación, se observó que el glicerol se consumió completamente, coincidiendo con el inicio de la producción de α -Amy. Además, la biomasa formada aumentó hasta las 90 horas y luego comenzó a disminuir, en concordancia con lo descrito en el ítem 4.3. Esto podría deberse al agotamiento de la fuente de carbono o a la acumulación de compuestos tóxicos para las células.

En la figura 4.6 se muestra un gel SDS-PAGE donde se sembraron muestras a distintos tiempos de la curva de crecimiento.

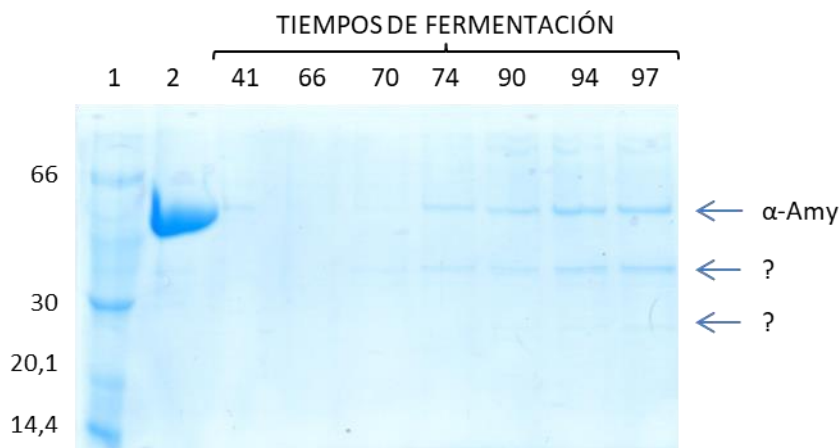


Figura 4.6: Gel SDS-PAGE para los distintos tiempos de la curva de crecimiento a pH 6,0. Calles: **1:** MPM; **2:** 1 g/L de α -Amy pura; **3-9:** tiempos de la fermentación en horas.

La banda correspondiente a α -Amy apareció a partir de las 70 horas y aumentó su intensidad en el tiempo. Estos resultados coinciden con las medidas de actividad enzimática. También se evidenció la presencia de dos bandas a menores pesos moleculares.

Estos resultados indicarían que el glicerol reprime parcialmente la expresión de α -Amy y sólo cuando la concentración extracelular del mismo es igual a cero, el hongo comienza a sintetizar la enzima. De esta manera, para una dada concentración inicial de glicerol se obtendrá una determinada cantidad de biomasa: la cantidad de enzima producida será proporcional a esta cantidad de biomasa desarrollada.

4.6 Curva de crecimiento de *A. oryzae* a pH 3,0 con distintas concentraciones de glicerol

La figura 4.7 muestra la curva de crecimiento del hongo a pH 3,0 (DO a 600 nm vs tiempo) para los sistemas con 1, 2, 5, 10 y 20 g/L de glicerol como única fuente de carbono. A este pH, no se pudo determinar la concentración remanente de glicerol por interferencia del kit con algún metabolito del hongo.

Todos los sistemas mostraron un aumento de la DO a partir de las 40 horas de incubación. Los valores máximos de DO aumentaron con la concentración de glicerol, a excepción del sistema con 20 g/L. Esto puede deberse a que el hongo haya cambiado su estado de agregación, lo que afecta directamente la medida de DO.

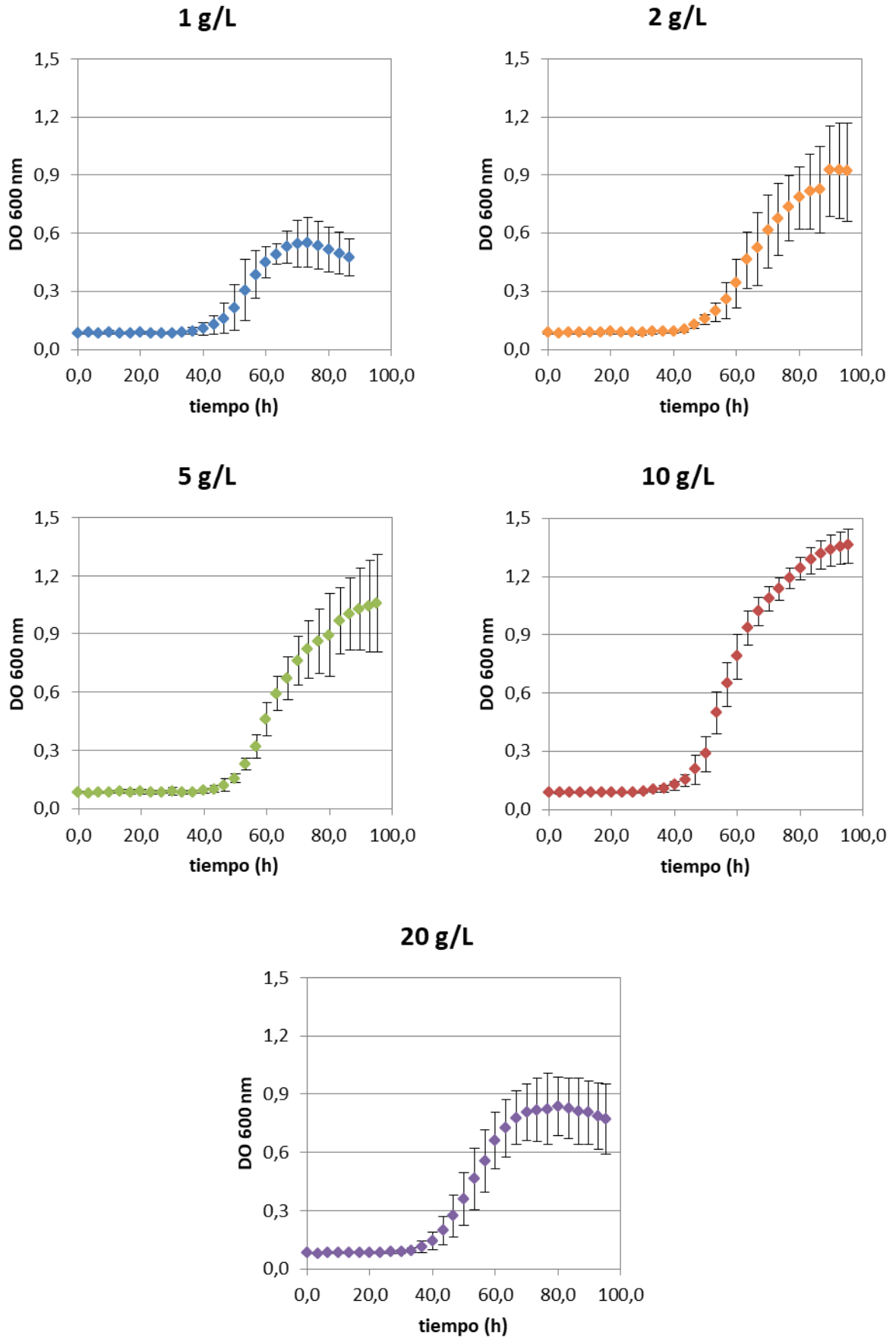


Figura 4.7: Curva de crecimiento a pH 3,0 para distintas concentraciones de glicerol

El sistema con 20 g/L de glicerol mostró que luego de las 70 horas, la DO se volvió constante, indicando que el desarrollo se encuentra limitado por la escasez de algún nutriente esencial o por la acumulación de algún producto tóxico en el medio de cultivo. Esto mismo puede observarse en el sistema con 20 g/L de glicerol a pH 6,0 (figura 4.5), donde la biomasa formada alcanzó el máximo valor a las 90 horas y luego disminuyó.

Estos resultados indicarían que en los sistemas a pH 3,0 y 6,0 con 20 g/L de glicerol, el hongo consume totalmente el sustrato aproximadamente a las 70 horas de incubación, coincidiendo con la producción de α -Amy para el caso con el sistema de pH 6,0.

La figura 4.8 muestra la velocidad máxima de crecimiento para cada concentración de glicerol, determinada por ajuste lineal de los puntos obtenidos entre las 40 y 70 horas.

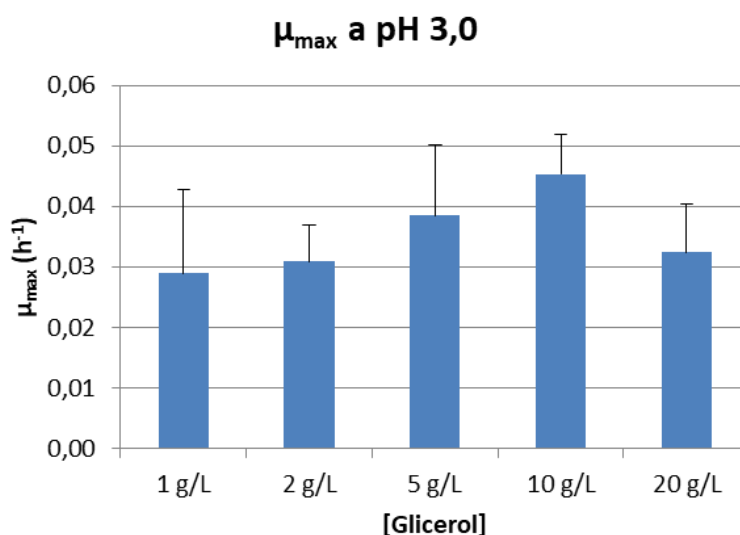


Figura 4.8: Velocidad máxima de crecimiento de *A. oryzae* a pH 3,0

El cultivo con 10 g/L de glicerol mostró la mayor μ_{\max} de crecimiento igual a $0,045 \pm 0,007 h^{-1}$, mientras que con 20 g/L de glicerol se obtuvo una μ_{\max} de $0,032 \pm 0,008 h^{-1}$.

En base a estos resultados, se planteó una estrategia de fermentación en la que se desarrolló al hongo a pH 3,0, y a las 70 horas se ajustó a pH 6,0 para que el microorganismo produzca α -Amy.

4.7 Fermentación con cambio de pH y temperatura

4.7.1 Medidas de actividad enzimática y biomasa

El objetivo de estos experimentos fue evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre la formación de los *pellets*, la actividad catalítica de α -Amy y la producción de otras proteínas extracelulares. El tiempo de 70 horas fue escogido debido a las observaciones encontradas en el ítem 4.6, momento en el cual ya no hubo glicerol en el medio de cultivo.

La tabla IV.IV muestra la actividad enzimática y las biomásas obtenidas por cada uno de los sistemas, al alcanzar las 96 horas de incubación.

Tabla IV.IV: Medidas de actividad de α -Amy y biomasa para los sistemas A, B y C

Sistema	Condiciones	Actividad α -Amy (U/L)	Biomasa (g/L)
A	Cambio de pH	15,3 \pm 0,2	10,7 \pm 0,3
B	Cambio de pH y T	0	8 \pm 1
C	Cambio de T	0	6,6 \pm 0,2

El sistema "A" mostró una mayor actividad enzimática en comparación al sistema ensayado con 20 g/L de glicerol a pH 6,0 (ítem 4.2). Así, al aplicar esta estrategia de cambio de pH, se logró aumentar la cantidad de enzima producida en un 65 %. Por otro lado, el cambio de temperatura afectó considerablemente la producción de α -Amy, ya que no se obtuvo actividad enzimática en los sistemas "B" y "C". Con respecto a los valores de biomasa formada, el sistema "A" produjo la máxima cantidad.

El gel SDS-PAGE (figura 4.9) confirma que solamente se produjo α -Amy en el sistema "A". Nuevamente aparecieron dos bandas a menores pesos moleculares. El sistema "C" no produjo α -Amy, sin embargo, se observó un cambio en el perfil de enzimas secretadas (flechas negras). El sistema "B" no produjo ninguna enzima extracelular (dato no mostrado).

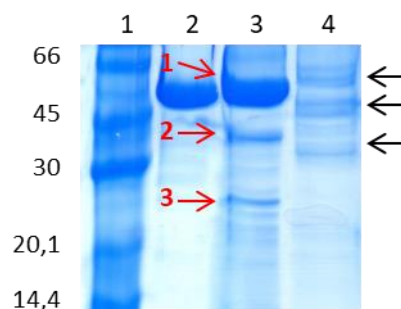


Figura 4.9: Gel SDS-PAGE de los sistemas “A” y “C” ultrafiltrados. Calles: **1:** MPM; **2:** 1 g/L de α -Amy pura; **3:** sistema “A”; **4:** sistema “C”. Las flechas rojas señalan las bandas analizadas por LC-MS.

4.7.2 Espectrometría de masa (LC-MS)

Las tres bandas señaladas con flechas rojas en la figura 4.9 fueron analizadas por espectrometría de masas.

La tabla IV.VI detalla las proteínas mayoritarias encontradas en la banda 1 (45 - 66 KDa) según el informe del CEQUIBIEM.

Tabla IV.VI: Análisis de la espectrometría de masa para la banda 1.

Código Uniprot	Proteína	PM (KDa)	Coverage ^a (%)	Score A Sequest HT ^b	Nº de péptidos ^c
POC1B4	Alfa-amilasa A tipo 3	54,8	67,94	1182,14	32
POC1B3	Alfa-amilasa A tipo 1/2	54,8	67,93	1164,07	31
P36914	Glucoamilasa	65,4	44,12	70,54	18

a: Muestra el porcentaje de la secuencia de proteína cubierto por los péptidos identificados.

b: Muestra la puntuación de proteína, que es la suma de las puntuaciones de los péptidos individuales.

c: Muestra el número de péptidos identificados en una proteína de referencia.

Se encontraron péptidos para las dos isoformas de α -Amy (tipo 3 y tipo 1/2) que cubrieron el 68 % de su secuencia. La diferencia entre ambas isoformas radica en las posiciones de los AA 56 (arginina por glutamina) y 172 (leucina por fenilalanina). Dos de los péptidos generados por el LC-MS abarcaron la secuencia en donde se encuentra el AA 56. Este resultado indica que *Aspergillus oryzae* NRRL 695 sintetizó las dos isoformas de α -Amy.

Además, se generaron péptidos correspondientes a la proteína glucoamilasa, cubriendo el 44 % de su secuencia. El PM para esta proteína es de 65,4 KDa, sin embargo en su forma activa es de 63 KDa, un tamaño cercano al PM de α -Amy. Esto indica que el hongo también produjo glucoamilasa.

Con respecto a las proteínas mayoritarias encontradas para la banda 2 (30 – 45 KDa), el informe del CEQUIBIEM indicó que corresponden a dos proteasas (tabla IV.VII).

Tabla IV.VII: Análisis de la espectrometría de masa para la banda 2

Código	Proteína	Coverage (%)	Score A Sequest HT	PM (KDa)	Nº de péptidos
Q2U1F3	Leucin aminopeptidasa A	39,26	105,31	41,1	13
P12547	Proteasa alcalina 1	20,10	67,39	42,5	8

La leucin aminopeptidasa A (LapA) y la proteasa alcalina 1 (Alp1) son dos enzimas con actividad proteolítica que se liberan al medio extracelular. Ambas se emplean en la industria alimenticia para hidrolizar proteínas durante la elaboración de alimentos y bebidas [73, 74].

Los resultados correspondientes a la banda 3 (20,1 - 30 KDa) no son concluyentes.

4.8 Efecto de la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y otras fuentes de nitrógeno sobre la producción de α -Amy

En este experimento se varió la cantidad y tipo de fuente de nitrógeno. El objetivo fue evaluar su efecto sobre la biomasa formada y la actividad catalítica de α -Amy. Los resultados se muestran en la tabla IV.VII.

Tabla IV.VII: Medidas de actividad de α -Amy y biomasa para distintas fuentes de nitrógeno

Sistema	Fuente de Nitrógeno	Actividad α -Amy (U/L)	Biomasa (g/L)
A	1,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,6 \pm 0,6	11,7 \pm 1,2
B	5,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10,3 \pm 0,4	13,3 \pm 0,9
C	5,0 g/L de Peptona	0	4,3 \pm 0,3
D	5,0 g/L de Ext. de levadura	0	5,4 \pm 0,1

Los sistemas con 1,0 y 5,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mostraron actividad α -Amy, siendo la mayor aquella correspondiente a 5,0 g/L. Por otro lado, no se evidenció actividad catalítica en los sistemas con peptona y extracto de levaduras como fuentes de nitrógeno.

Con respecto al desarrollo del hongo, los sistemas con fuente de nitrógeno orgánica mostraron menores valores de biomasa que los sistemas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

De estos experimentos se concluye que la concentración y naturaleza de fuente de nitrógeno afecta considerablemente la producción de α -Amy.

4.9 Fermentación en batch en medio líquido mínimo con glicerol crudo

En este experimento se decidió trabajar con 10 g/L de glicerol en lugar de 20 g/L, para estudiar la producción de α -Amy en la condición a la cual el hongo presentó mayor velocidad de crecimiento a pH 3,0 (figura 4.8).

La tabla IV.VIII muestra la biomasa obtenida, la actividad catalítica de α -Amy y el rendimiento ($Y_{P/X}$) para ambas fuentes de glicerol, transcurridas 96 horas de incubación.

Tabla IV.VIII: Medidas de biomasa y actividad α -Amy para distintas fuentes de glicerol

Sistema	Glicerol 10 g/L	Actividad α -Amy (U/L)	Biomasa (g/L)	$Y_{P/X}$ (U/g)
A	Refinado	7,4 \pm 0,8	8,0 \pm 0,7	0,9 \pm 0,1
B	Crudo	5,3 \pm 0,3	6,3 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1

El sistema con glicerol refinado alcanzó mayor actividad enzimática y desarrolló una

mayor cantidad de biomasa que el sistema con glicerol crudo; sin embargo, el valor de $Y_{P/X}$ es igual para ambos casos. El desarrollo del hongo pudo estar limitado por la presencia de contaminantes tóxicos en baja concentración (metanol, metales pesados) sin haber sido afectada la producción de α -Amy.

Por otro lado, la actividad para el sistema con glicerol refinado aumentó 131 % respecto de aquella obtenida cuando se trabajó a pH 6,0 (tabla IV.II; 3,2 U/L). Este resultado confirma que realizar la estrategia de cambio de pH aumenta considerablemente la cantidad de enzima obtenida.

4.10 Fermentación con glicerol y afrechillo de trigo

4.10.1 Ensayos de actividad enzimática

El objetivo de estos experimentos fue determinar qué sistema (tabla III.IV) produjo la mayor cantidad de α -Amy, tomando como referencia al cultivo de 20 g/L de glicerol a las 94 horas (sistema "G").

La tabla IV.IX muestra las actividades relativas calculadas a cada tiempo. En la figura 4.10 se graficaron para una mejor visualización.

Tabla IV.IX Medidas de actividad de α -Amy para glicerol y afrechillo de trigo

Sistema	Actividad Relativa		
	94 horas	118 horas	142 horas
G	1,0 ± 0,3		
2A	1,4 ± 0,5	2,9 ± 0,8	3,6 ± 1,0
5A	1,7 ± 0,6	2,4 ± 1,0	3,1 ± 1,7
10A	2,2 ± 0,4	2,6 ± 0,8	3,5 ± 1,2
Ai3	1,9 ± 0,6	1,4 ± 0,5	1,3 ± 0,7
Ai6	2,1 ± 0,6	1,6 ± 0,4	2,0 ± 0,4

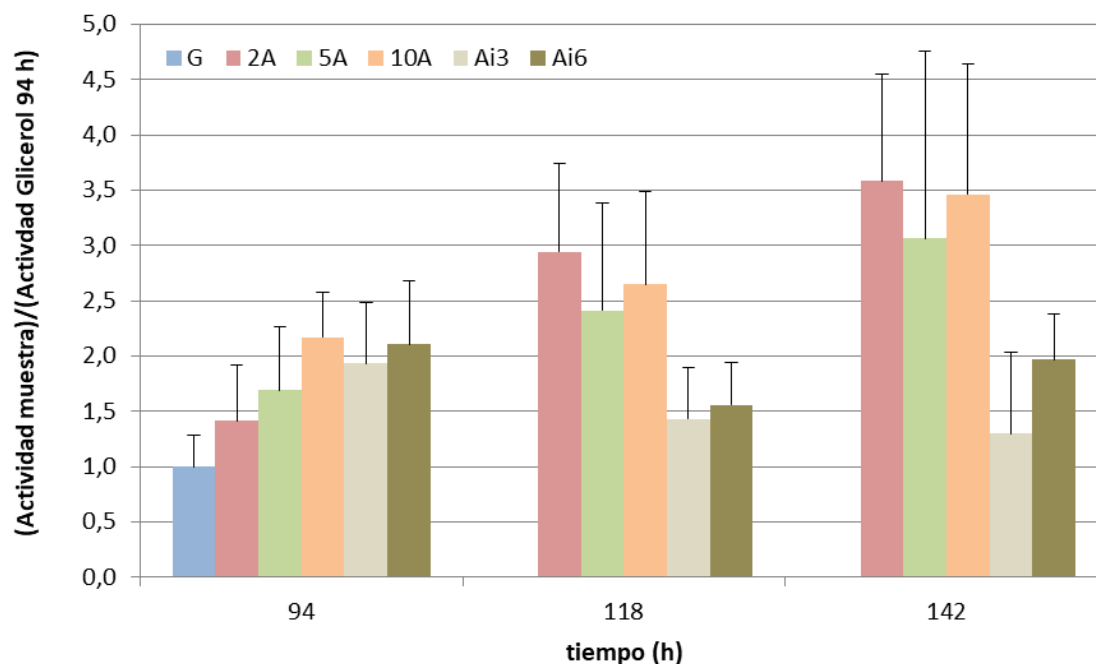


Figura 4.10: Actividades relativas de cada sistema ensayado con respecto al sistema con 20 g/L de glicerol a las 94 horas.

Los sistemas cuyo pH inicial fue 3,0 no evidenciaron actividad α -Amy a las 70 horas de incubación. Estos resultados coinciden con los observados en el ítem 4.4 (figura 4.4). A este tiempo, el único sistema que produjo α -Amy fue el “Ai6”.

Los sistemas que comenzaron inicialmente con glicerol evidenciaron un aumento en la producción de α -Amy a partir de las 94 horas; en cambio, la actividad enzimática de los sistemas “Ai3” y “Ai6” disminuyó.

Todos los sistemas ensayados mostraron mayor actividad enzimática que el control, indicando que el ADT es un buen inductor de la expresión de α -Amy. Estos resultados se explican al considerar al ADT como un “sustrato de liberación lenta”, evitando la represión por catabolito.

Al tiempo final del experimento (142 horas) se lograron valores similares de actividad enzimática para los sistemas “2A”, “5A” y “10A”, obteniéndose niveles de producción de α -Amy que triplicaron al sistema “G”.

4.10.2 Geles de electroforesis

Las muestras de cada sistema fueron corridas en un gel SDS-PAGE (figura 4.11) para evaluar el perfil de secreción de proteínas al realizar cambios en las condiciones de fermentación (pH y/o adición de afrechillo de trigo).

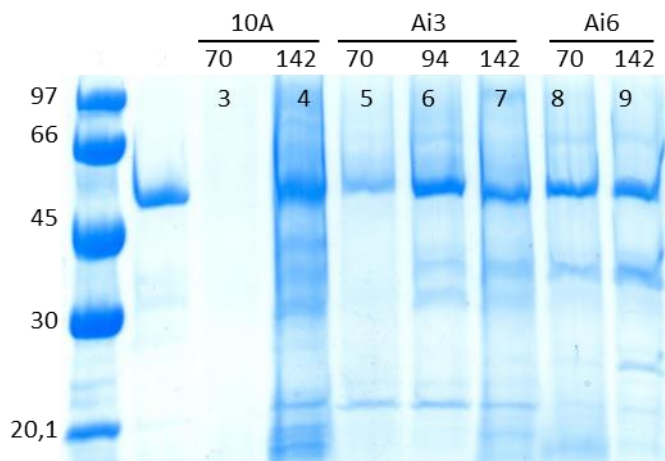


Figura 4.11 Gel SDS-PAGE para los sistemas con glicerol y/o afrechillo de trigo a distintos tiempos de incubación. Calles: **1:** MPM; **2:** 0,2 g/L de α -Amy; **3-9:** muestras.

La calle 3 (sistema 10A – 70 horas) mostró que trabajando a pH 3,0 y 20 g/L de glicerol, el hongo no secreta enzimas al medio. El agregado de ADT al sistema “10A” y el cambio de pH a 6,0 (calle 4) produjeron un cambio en el perfil de secreción de proteínas, siendo la banda mayoritaria aquella correspondiente a α -Amy.

El sistema “Ai3” a las 70 horas (calle 5) mostró dos bandas, una entre 45 y 66 KDa y otra entre 20,1 y 30 KDa. El blanco de proteínas no evidenció interferencia en los resultados de la corrida electroforética. Es importante destacar que este sistema no presentó actividad α -Amy. Luego de cambiar a pH 6,0 (calles 6 y 7) se observó una intensificación de la banda entre 45 y 66 KDa y la aparición de dos bandas entre 30 y 45 KDa. A estos tiempos sí se evidenció actividad α -Amy.

Las calles 8 (Ai6-70) y 9 (Ai6-142) corresponden al sistema con ADT a pH 6,0 a los tiempos de 70 y 142 horas, respectivamente. De acuerdo a las bandas obtenidas (y a las medidas de actividad enzimática) se puede concluir que el hongo produjo α -Amy desde el principio de la fermentación.

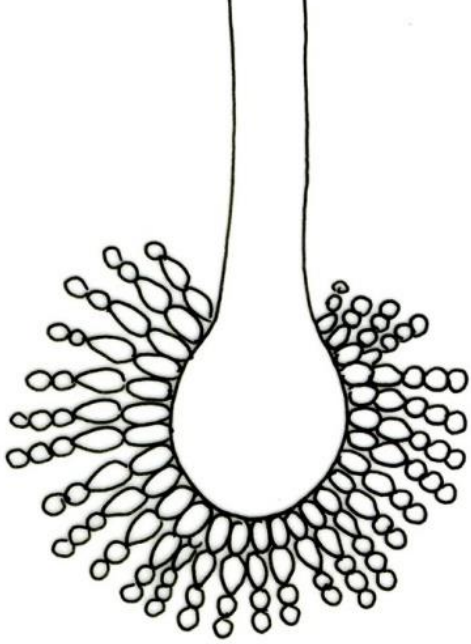
La figura 4.12 muestra la fotografía del cultivo “2A” a las 142 horas de incubación. Los *pellets* del hongo mantuvieron su forma y no disminuyeron en número, situación opuesta a lo observado en la figura 4.3.



Figura 4.12: Fotografía del sistema “2A” (0,5 g de ADT adicionado a las 70 horas) a las 142 horas de incubación.

Estos resultados permiten concluir que el sistema más eficiente para la producción de α -Amy es el sistema “2A” a las 142 horas de fermentación ya que se emplea la menor cantidad de ADT. La actividad enzimática a este tiempo fue 60 ± 7 U/L. Si el tiempo resultase ser una variable limitante en el proceso, entonces el mejor sistema sería el “10A” a las 94 horas.

Por otro lado, se deberá considerar la presencia de proteínas contaminantes (proteasas) que pudieran degradar a α -Amy.



CONCLUSIONES

5 Conclusiones

En este trabajo de tesina se logró producir la enzima α -Amy por fermentación en medio líquido del hongo *Aspergillus oryzae* empleando glicerol y afrechillo de trigo como fuentes de carbono.

Se evaluaron las siguientes variables: tiempo, pH, temperatura, fuente de nitrógeno y pureza del glicerol. Los sistemas incubados a 45 °C no produjeron α -Amy, al igual que aquellos con fuentes de nitrógeno orgánicas. Los estudios realizados con glicerol crudo mostraron que sería un buen sustrato para sustituir al glicerol refinado y de este modo disminuir los costos del proceso.

Los estudios con 20 g/L de glicerol como única fuente de carbono revelaron que el hongo lo consume en su totalidad cuando se alcanzan las 70 horas de incubación, momento en el que comienza a producirse α -Amy en los sistemas a pH 6,0.

Aunque a pH 3,0 el hongo no produce esta enzima, se obtienen *pellets* más pequeños, condición favorable para llevar a cabo una fermentación en medio líquido.

Teniendo en cuenta estos resultados, se diagramó una estrategia de fermentación en lote en la que se desarrolló al hongo en un sistema con 20 g/L de glicerol a pH 3,0 y a las 70 horas se lo ajustó a 6,0 para que el cultivo produzca α -Amy. Esto permitió aumentar la cantidad de enzima obtenida en un 65 % en comparación con el sistema incubado a pH 6,0 durante toda la fermentación. El tiempo de trabajo se fijó en 96 horas para evitar la degradación de los *pellets* (envejecimiento del cultivo).

Posteriormente, a este protocolo se le adicionó un paso que consistió en agregar ADT al momento de aumentar el pH. La producción de α -Amy mejoró considerablemente, obteniéndose un aumento del 100 % con respecto a la estrategia anterior. Además, los *pellets* no se degradaron, lo que permitió aumentar el tiempo de trabajo hasta 142 horas de incubación e incrementar en un 92 % la producción de α -Amy (figura 5.1).

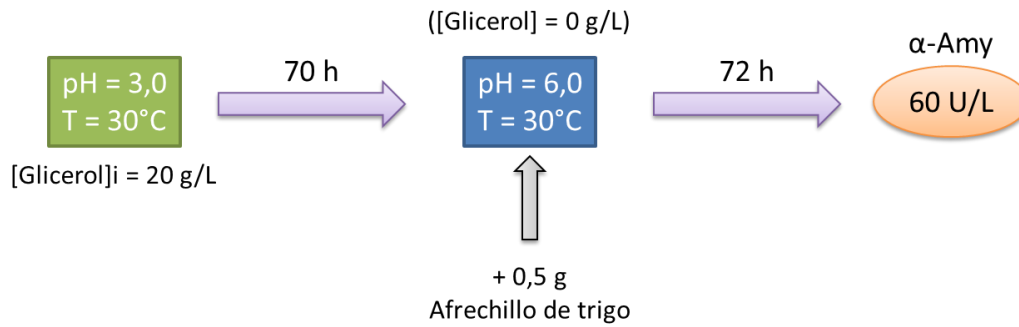


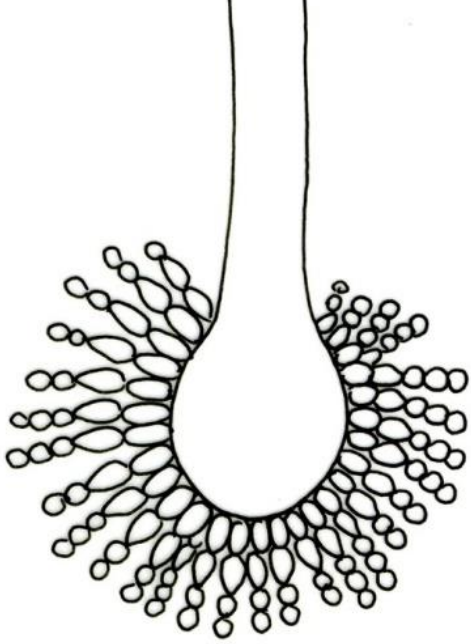
Figura 5.1: Estrategia que permitió conseguir la máxima producción de $\alpha\text{-Amy}$

La estrategia de fermentación propuesta en esta tesina resulta novedosa ya que emplea dos subproductos agroindustriales en etapas consecutivas, permitiendo en la primera, el desarrollo de biomasa y en la segunda, la producción de $\alpha\text{-Amy}$.

Perspectivas a futuro

La problemática que se genera al trabajar con Erlenmeyers radica en la dificultad de controlar adecuadamente el pH y el O_2 disuelto en el medio de cultivo y en mantener el sistema completamente homogenizado. La estrategia descrita será evaluada en un biorreactor que permitirá controlar las condiciones del medio de cultivo y optimizar el mezclado. Además, el uso de este equipo permitirá evaluar otras estrategias de fermentación como el FED-BATCH en condiciones limitantes de sustrato. Este es un paso importante y necesario para escalar el proceso a nivel industrial.

Es importante destacar que *Aspergillus oryzae* no sólo es buen productor de $\alpha\text{-Amy}$, sino que secreta al medio otras enzimas hidrolíticas. El análisis por espectrometría de masas reveló que el hongo produce, además, la enzima glucoamilasa (que actúa en la degradación de almidón) y dos proteasas: leucin aminopeptidasa A y proteasa alcalina 1. En cualquier proceso de producción de enzimas es muy importante separar (o inhibir) las proteasas para evitar la degradación de la enzima de interés y de esta manera aumentar su estabilidad. Esto complejiza la etapa de purificación lo que impacta directamente en el costo del proceso. Por otro lado, considerando que la $\alpha\text{-Amy}$ se aplicará en procesos industriales que requieren degradar moléculas de almidón, no es necesario separarla de la enzima glucoamilasa ya que ambas actúan sinérgicamente.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referencias bibliográficas

- [1] Rohm, O. (1907) Preparation of hides for the manufacture of leather. Patente US886411, The United States Patent and Trademark Office.
- [2] Kumar, V.; Singh, D.; Snagwan, P. and Gill, P.K. (2014) Global market scenario of industrial enzymes. In *Industrial enzymes* (Beniwal, V. and Sharma A.K., eds.), pp 173-196, Nova Science Publishers, New York.
- [3] Anlló, G.; Bisang, R. and Stubrin, L. (2011) Las empresas de biotecnología en Argentina. Documento de la Comisión Económica para América Latina y el Caribe, Naciones Unidas.
- [4] Kirk, O.; Borchert, T. B. and Fuglsang, C. C. (2002) Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotech* 13 345-351.
- [5] Schäfer, T.; Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C.; Pedersen, S.; Salmon, S.; Olsen, H. S.; Deinhammer, R. and Lund, H. (2005) Enzymes for Technical Applications. In *Biopolymers Online* (Steinbüchel, A., ed.), pp 377-387, Wiley, Weinheim.
- [6] Linko, Y. Y.; Lämsä, M.; Wu, X.; Uosukainen, E.; Seppälä, J. and Linko, P. (1998) Biodegradable products by lipase biocatalysis. *J Biotechnol* 66 41-50.
- [7] Schmid, A.; Dordick, J.S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M. and Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409 258-268.
- [8] Aelhe W. (2007) *Enzymes in Industry. Production and Applications*, 3er ed., Wiley, Weinheim.
- [9] Horváthová V, Janeček Š and Šturdík E. (2001) Amylolytic enzymes: molecular aspects of their properties. *Gen Physiol Biophys* 20 7-32.
- [10] Sivaramakrishn, S.; Gangadharan, D.; Nampoothiri, K.; Soccol C. R. and Pandey A. (2006) α -amylases from microbial sources – an overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol* 44(2) 173-184.
- [11] Sauer, J.; Sigurskjold, B. W.; Christensen, U.; Frandsen, T. P.; Mirgorodskaya, E.; Harrison, M.; Roepstor, P. and Svensson B. (2000) Glucoamylase: structure/function relationships and protein engineering. *Biochim Biophys Acta* 1543 275-293.
- [12] Okafor N. (2007) *Modern industrial microbiology and biotechnology*, 1ra ed., Science Publishers, Hampshire.
- [13] Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280 309-316.
- [14] Monteiro de Souza, P. and de Oliveira e Magalhães, P. (2010) Application of microbial α -amylase in industry-a review. *Braz J Microbiol* 41 850-861

- [15] Xie, F.; Pollet, E.; Halley, P. J. and Avérous, L. (2014) Advanced nano-biocomposites based on starch. In Polysaccharides (Ramawat K. G. and Mérillon J., eds.), pp 1-75, Springer International Publishing, Basel.
- [16] El-Fallal, A.; Dohara, M. A.; El-Sayed, A. and Omar, N. (2012) Starch and microbial α -amylases: from concepts to biotechnological applications. In Carbohydrates—comprehensive studies on glycobiology and glycotechnology (Chang, C., ed.), pp 459-488, InTech Open, Rijeka.
- [17] Ismaya, W. T.; Hasan, K.; Subroto, T.; Dessy, N. and Soemitro, S. (2012) Chromatography as the major tool in the identification and the structure-function relationship study of amylolytic enzymes from *Saccharomycopsis fibuligera* R64. In Chromatography—the most versatile method of chemical analysis (de Azevedo, L., ed.), pp 271-294, InTech Open, Rijeka.
- [18] Matura, Y.; Kusunoki, M. and Harada, W. (1984) Structure and possible catalytic residues of Taka-Amylase A. *Biochem J* 95 697-702.
- [19] Swift, H. J.; Brady, L.; Derewenda, Z. S.; Dodson, E. J.; Dodson, G. G.; Turkenburg, J. P. and Wilkinson, A. J. (1991) Structure and molecular model refinement of *Aspergillus oryzae* (TAKA) α -Amylase: an application of the simulated-annealing method. *Acta Crystallogr B* 47 535-544.
- [20] Kuriki, T. and Imanaka, T. (1999) The concept of the α -Amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J Biosci Bioeng* 87(5) 557-565.
- [21] Boel, E.; Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z.S.; Dodson, G. G.; Jensen, V.J.; Petersen, S.B.; Swift, H.; Thim, L. and Woldike, H. F. (1990) Calcium binding in alpha-amylases: An X-ray diffraction study at 2,1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry-US* 29(26) 6244-6249.
- [22] Nemoto, T.; Maruyama, J. and Kitamoto, K. (2012) Contribution ratios of *amyA*, *amyB* and *amyC* genes to high-level α -amylase expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 76(8) 1477-1483.
- [23] Lachmund, A; Urmann, U.; Minol, K.; Wirsal, S. and Ruttkowski, E. (1993) Regulation of α -amylase formation in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus nidulans* transformants. *Curr Microbiol* 26 47-51.
- [24] Tomomura, K.; Suzuki, H.; Nakamura, N.; Kuraya K. and Tanabe, O. (1961) On the inducers of α -amylase formation in *Aspergillus oryzae*. *Agr Biol Chem* 25(1) 1-6.
- [25] vanKuyk, P. A.; Benen, J. A. E.; Wösten, H. A. B.; Visser, J. and de Vries, R. P. (2012) A broader role for AmyR in *Aspergillus niger*: regulation of the utilisation of D-glucose or D-galactose containing oligo- and polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 93(1) 285-293.
- [26] Kato, N.; Murakoshi, Y.; Kato, M. and Tsukagoshi, N. (2002) Isomaltose formed by α -glucosidase triggers amylase induction in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 42(1) 43-50.

- [27] Ruijter, G. J. G. and Visser, J. (1997) Carbon repression in *Aspergilli*. FEMS Microbiol Lett 151(2) 103-114.
- [28] Tsukagoshi, N.; Kobayashi, T. and Kato, M. (2001) Regulation of the amylolytic and (hemi-)cellulolytic genes in *Aspergilli*. J Gen Appl Microbiol 47 1–19.
- [29] Kato, M. (2005) An overview of the CCAAT-Box binding factor in filamentous fungi: assembly, nuclear translocation, and transcriptional enhancement. Biosci Biotechnol Biochem 69(4) 663–672.
- [30] Soetaert, W. and Vandamme, E. J. (2010) Industrial Biotechnology: sustainable growth and economic success, 1ra ed., Wiley, Weinheim.
- [31] Sundarram, A. and Pandurangappa P. (2014) α -amylase production and applications: a review Appl Environ Microbiol 2(4) 166-175.
- [32] Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V. K. and Chauhan, B. (2003) Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochem 38(11) 1599-1616.
- [33] Carlsen, M.; Nielsen, J. and Villadsen, J. (1996) Growth and α -amylase production by *Aspergillus oryzae* during continuous cultivations. J Biotechnol 45 81-93.
- [34] Anto, H., Trivedi, U. and Patel, K. (2006) Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. Food Technol Biotechnol 44(2) 241-245.
- [35] Kurosawa, K.; Hosaka, T.; Tamehiro, N.; Inaoka, T. and Ochi, K. (2006) Improvement of α -amylase production by modulation of ribosomal component protein S12 in *Bacillus subtilis* 168. Appl Environ Microb 72 71-77.
- [36] Yang, H.; Liu, L.; Li, J.; Du, G. and Chen, J. (2011) Heterologous expression, biochemical characterization, and overproduction of alkaline α -amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. Microb Cell Fact 10 1-9.
- [37] Barbesgaard, P.; Heldt-Hansen, H. P. and Diderichsen, B. (1992) On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. Appl Microbiol Biotechnol 36 569-572.
- [38] Gupta, V. K. (2016) New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: *Aspergillus* system properties and applications, 1er ed., Elsevier B.V., Amsterdam.
- [39] Final Screening Assessment for *Aspergillus oryzae* ATCC 11866 (2017), Ministerio de Medio ambiente, Canadá.
- [40] Gomi, K. (2014) ASPERGILLUS | *Aspergillus oryzae*, 2da ed., vol. 1., Elsevier B.V., Amsterdam.
- [41] Maldonado, M. C. and Strasser de Saad A. M. (1998) Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. J Ind Microbiol Biot 20 34-38.

- [42] Li A.; Pfler, N.; Zuijderwijk, R. and Punt, P. (2012) Enhanced itaconic acid production in *Aspergillus niger* using genetic modification and medium optimization. BMC Biotechnol 12 57-66.
- [43] Lubertozzi, D. and Keasling, J. D. (2009) Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. Biotechnol Adv 27 53-75.
- [44] Andersen, M. R. and Nielsen, J. (2009) Current status of systems biology in *Aspergilli*. Fungal Genet Biol 46 S180-S190.
- [45] Punt, P. J.; van Biezen, N.; Conesa, A.; Albers, A.; Mangnus, J. and van den Hondel, C. (2002) Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. Trends Biotechnol 20(5) 200-206.
- [46] Jiang, D.; Zhu, W.; Wang, Y.; Sun, C.; Zhang, K. and Yang, J. (2013) Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies. Biotechnol Adv 31 1562-1574.
- [47] Ruiz-Díez, B. (2002) Strategies for the transformation of filamentous fungi. J Appl Microbiol 92 189-195.
- [48] Meyer, V. (2008) Genetic engineering of filamentous fungi-progress, obstacles and future trends. Biotechnol Adv 26 177-185.
- [49] Fleißner, A. and Dersch, P. (2010) Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. Appl Microbiol Biotechnol 87 1255-1270.
- [50] Nødvig, C. S.; Nielsen, J. B.; Kogle, M. E. and Mortensen, U. H. (2015) A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. PLoS ONE 10(7) 1-18.
- [51] Damaso, M. C. T.; Carvalho Andrade, C. M. M. and Pereira Jr., N. (2002) Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. Braz J Microbiol 33 333-338.
- [52] Papagianni, M.; Nokes, S. E. and Filer, K. (1999) Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation Process Biochem 35 397-402.
- [53] Hua, H. L.; van den Brink, J.; Gruben, B.S.; Wösten, H.A.B.; Gu, J. and de Vries, R.P. (2011) Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. Int Biodeter Biodegr 65(1) 248-252.
- [54] Zhang, B.; Guan, Z. B.; Cao, Y.; Xie, G. F. and Lu, J. (2012) Secretome of *Aspergillus oryzae* in Shaoxing rice wine koji. Int J Food Microbiol 155(3) 113-119.
- [55] Conesa, A.; Punt, P. J.; van Luijk, N. and van den Hondel, C. A. M. J. J. (2001) The Secretion Pathway in Filamentous Fungi: A Biotechnological View. Fungal Genet Biol 33(3) 155-171.

- [56] Carlsen, M.; Spohr, A.; Nielsen, J. and Villadsen, J. (1995) Morphology and physiology of an α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol Bioeng* 49 266-276.
- [57] Sindhu, R.; Binod, P. and Pandey, A. (2016) α -Amylases. In *Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products* (Pandey, A.; Negi, S. and Soccol, C., eds.), pp 3-24, Elsevier B.V., Amsterdam.
- [58] Singh, S.; Singh, S.; Bali, V.; Sharma, L. and Mangla, J. (2014) Production of fungal amylases using cheap, readily available agriresidues, for potential application in textile industry. *BioMed Res Int* 2014 1-9.
- [59] Agger, T.; Spohr, A. B. and Nielsen, J. (2001) alpha-Amylase production in high cell density submerged cultivation of *Aspergillus oryzae* and *A. nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 55(1) 81-84.
- [60] Pedersen, H.; Beyer, M. and Nielsen, J. (2000) Glucoamylase production in batch, chemostat and fed-batch cultivations by an industrial strain of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53 272-277.
- [61] Chen, H. (2013) *Modern solid state fermentation: Theory and practice*, 1ra ed., Springer Science+Business Media, Dordrecht.
- [62] Krull, R.; Cordes, C.; Horn, H.; Kampen, I.; Kwade, A.; Neu, T. R. and Nörtemann, B. (2010) Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 121 1–21.
- [63] Gibbs, P. A.; Seviour, R. J. and Schmid, F. (2000) Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit Rev in Biotechnol* 20(1) 17–48.
- [64] Papagianni, M. (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* 22(3) 189-259.
- [65] Romero, R.; Martínez, S. L. and Natividad, R. (2011) Biodiesel production by using heterogeneous catalysts. In *Alternative fuel* (Manzanera, M., ed.), pp 3-20, InTech Open, Rijeka.
- [66] Calzada, J. and Molina, C. (2017) La industria del biodiesel en Argentina. *Informativo semanal de la Bolsa de Comercio de Rosario*, año XXXV, N° 1823.
- [67] Tan, H. W.; AbdulAziz, A. R. and Aroua, M. K. (2013) Glycerol production and its applications as a raw material: a review. *Renew Sust Energ Rev* 27 118-127.
- [68] Fernández Mayer, C. A. (2014) *Transformación de subproductos y residuos de agroindustria de cultivos templados, subtropicales y tropicales en carne y leche bovina*, 1ra ed., Ediciones INTA, Bordenave.
- [69] Filadoro, A. and Dicovski, J. P. (2014) *Complejo Triguero-Farináceos*. Serie Complejos Productivos, Dirección Nacional de Desarrollo Regional, Ministerio de Economía y Finanzas Públicas, Buenos Aires.

[70] Hill, T. and Kaffer, E. (2001) Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace elements and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genet Newsl* 48 20-21.

[71] Bhargava, S.; Nandakumar, M. P.; Roy, A.; Wenger, K. S. and Marten, M. R. (2003) Pulsed feeding during fed-batch fungal fermentation leads to reduced viscosity without detrimentally affecting protein expression. *Biotechnol Bioeng* 81(3) 341-347.

[72] Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goetze, N. M.; Olson, B. J. and Klenk D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1) 76-85.

[73] Matsushita-Morita, M.; Tada, S.; Suzuki, S.; Hattori, R.; Marui, J.; Furukawa, I.; Yamagata, Y.; Amano, H.; Ishida, H.; Takeuchi, M.; Kashiwagi, Y. and Kusumoto, K. (2011) Overexpression and Characterization of an Extracellular Leucine Aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*. *Curr Microbiol* 62 557-564.

[74] Xiao, Y. (2015) Statistical optimization of alkaline protease production from *Penicillium citrinum* YL-1 under solid-state fermentation. *Prep Biochem Biotech* 45 447-462.