



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

*“PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL POR METODOLOGÍAS
NOVEDOSAS DE OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN”*

Lic. Antonela Taddia

Directora: Dra. Gisela Tubio

Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos
UNR-CONICET



I P R O B Y Q

Rosario, Argentina
2020

*“PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL POR
METODOLOGÍAS NOVEDOSAS DE OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN”*

Antonela Taddia

Licenciada en Biotecnología, Universidad Nacional del Rosario.

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos (IPROBYQ) dependiente de UNR-CONICET durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2016 y el 27 de marzo de 2020, bajo la dirección de la Dra. Gisela Tubio.

Nombres y firmas del Director y los integrantes del Jurado de Tesis:

Directora: Dra. Gisela Tubio.....

Jurado:

Jurado:

Jurado:

Defendida:.....

Este trabajo fue presentado en las siguientes revistas:

- Taddia, A.; Boggione, M. J.; Tubio, G. “Screening of different agroindustrial by-products for industrial enzymes production by fermentation processes”. *International Journal of Food Science and Technology*. 2018. doi:10.1111/ijfs.13915.
- Taddia, A.; Brandaleze, G.; Boggione, M.J.; Bortolato, S.; Tubio, G. “Optimization of the fermentation process by *Aspergillus niger* using different lignocellulosic materials as substrates for the production of xylanase”. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. En revisión.
- Taddia, A.; Rito-Palomares, M.; Mayolo-Deloisa, K; Tubio, G. “Purification of xylanase from an *Aspergillus niger* extract using an integrated and sustainable strategy based on two-phase aqueous systems followed by ion chromatography”. Enviado en febrero de 2020 a la Edición especial titulada Innovation and Perspectives in the Bioseparations Field de la revista *Separation and Purification Technology*.

Este trabajo fue presentado en las siguientes reuniones científicas:

- Taddia, A.; Tubio, G. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC 2016). Córdoba, Argentina. 2016. “Producción de xilanasas fúngicas para la industria panadera”.
- Taddia, A.; Brandaleze, G.; Tubio, G. IV Simposio Argentino de los Procesos Biotecnológicos (SAProBio), Buenos Aires, Argentina. 2016. “Producción de enzimas hidrolíticas de uso industrial”.
- Taddia, A.; Tubio, G. INNOVAR 2016, Catalogo decimosegunda edición. Buenos Aires, Argentina. 2016. “Xilanasas Fúngicas Para Biotecnología Industrial”.
- Taddia, A.; Brandaleze, G.; Bortolato, S. A.; Tubio, G. IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAYA). Mar del Plata, Argentina. 2018. “Producción xilanolítica a partir de residuos agroindustriales”.
- Taddia, A.; Brandaleze, G.; Tubio, G. V Simposio Argentino de los Procesos Biotecnológicos (SAProBio), Tucumán, Argentina. 2018. “Caracterización del extracto enzimático xilanolítico y escalado del bioproceso”.
- Taddia, A.; Tubio, G.; Rito-Palomares, M.; Mayolo-Deloisa, K. I Simpósio Ibero-Americano Sobre Sistemas Acuáticos Bifásicos (SISAB). Aracaju, Brasil. 2018. “Sistemas bifásicos acuosos biocompatibles para la obtención de xilanasas fúngicas”.

- Taddia, A.; Morilla, E.A.; Tubio G. Biopartitioning & Purification Conference (BPP). Aguarujá, Brasil. 2019. “Purification of xylanase from *Aspergillus niger* using aqueous two phase systems followed by ionic chromatography”.
- Taddia, A.; Boggione, M.J; Tubio G. XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos & XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL- ALACCTA). Buenos Aires, Argentina. 2019. “Purificación de xilanasa fúngica para la industria alimentaria”.

Publicación de capítulo de libro:

- Título del libro: Advances in Food Bioproducts and Bioprocessing Technologies.
Autores del libro: Chávez-González, M.; Nagamani Balagurusamy, T.; Aguilar, C.
Título del capítulo: Enzyme Technologies.
Autores del capítulo: Taddia, A.; Haidar, C.; Pellegrini, L; Tubio, G.
ISBN: 9781138544222.
Editorial: Taylor & Francis Ltd. Reino Unido, Noviembre, 2019.

Pasantías en el exterior:

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido obtenidos en el marco de una pasantía realizada en el Centro de Biotecnología-FEMSA del Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey, México; bajo la supervisión de la Investigadora Prof. Dra. Karla P. Mayolo Deloisa, durante el período de julio a octubre del 2017.

Becas de investigación científica y tecnológica:

- Beca Doctoral Nivel Inicial. Agencia Nacional de promoción Científica y Tecnológica. FONCyT. Período: 2015-2018.
- Beca Doctoral Finalización de Doctorado. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. CONICET. Período: 2018-2020.

Este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos de investigación tecnológica:

- 2014-2017. “Desarrollo de una plataforma tecnológica novedosa para la producción industrial de enzimas de alta calidad”. FONCyT. PICT 2013-1730.

- 2017-2018. "Producción biotecnológica de enzimas fúngicas para la elaboración de cerveza". Secretaría De Vinculación Tecnológica Y Desarrollo Productivo-UNR. Res C.S. N° 1671/2016.
- 2017-2020. "Producción de polifenoles a partir de residuos agroindustriales regionales empleando tecnologías eficientes y de bajo impacto ambiental". FONCyT. PICT 2016-1170.
- 2017-2018. "Producción Biotecnológica De Enzimas Fúngicas". SeCyT-UNR. 1BIO520 Res CS N° 653/2017.
- 2018-2019. "Producción biotecnológica de detergentes enzimáticos a partir de biomasa, bajo el concepto de economía circular". UNR. Res CS N° 573/2018.

Índice.....	i
Abreviaturas.....	v
Palabras tomadas del idioma extranjero.....	vii
Resumen.....	viii
CAPÍTULO 1 - Introducción.....	1
1.1. Biotecnología y Enzimas	3
1.2. Hongos Filamentosos	5
1.3. Polisacáridos presentes en la biomasa vegetal.....	6
1.4. Enzimas Hidrolíticas que actúan sobre la biomasa vegetal	8
1.4.1. Xilanasas	8
1.4.2. Celulasas	10
1.4.3. Pectinasa.....	11
1.4.4. Amilasa	11
1.5. Regulación de la producción de las enzimas hidrolíticas en <i>A. niger</i>	12
1.6. Fermentación	13
1.7. Diseño estadístico para la producción enzimática	15
1.8. Bioprocesamiento de enzimas.....	15
1.9. Sistemas bifásicos acuosos	18
1.9.1. Tipos de sistemas bifásicos acuosos	18
1.9.2. Estudio de las propiedades de un SBA: Diagrama Binodial.....	21
1.9.3. Reparto de biomoléculas	22
1.9.4. Factores que inciden sobre el coeficiente de reparto.....	23
1.10. Interacción de SBAs con otras técnicas de purificación.....	25
CAPITULO 2 - Objetivos	27
2.1. Objetivo General.....	27
2.2. Objetivos específicos	27
CAPÍTULO 3 - Materiales y Métodos	29
3.1. Materiales	29
3.2. Metodología.....	31
3.2.1. Producción de las enzimas hidrolíticas mediante fermentación fúngica utilizando sustratos lignocelulósicos	31
3.2.2. Determinación de actividad xilanolítica, celulolítica y pectinolítica ..	34
3.2.3. Determinación de actividad amilolítica	34
3.2.4. Determinación de proteínas solubles extracelulares	35

3.2.5.	Determinación de xilosa y glucosa	35
3.2.6.	Determinación de la concentración de Citrato	36
3.2.7.	Determinación de la concentración de PEG	36
3.2.8.	Composición fisicoquímica de los sustratos lignocelulósicos	37
3.2.9.	Diseño experimental	37
3.2.10.	Escalado de la fermentación	41
3.2.11.	Análisis de diferentes parámetros sobre la estabilidad de las enzimas hidrolíticas del extracto enzimático optimizado.....	42
3.2.12.	Determinación de los parámetros cinéticos de las EX y EC del extracto enzimático optimizado.....	44
3.2.13.	Precipitación salina	44
3.2.14.	Extracción por Sistemas bifásicos acuosos	45
3.2.15.	Cromatografía	47
3.2.16.	Determinación del rendimiento y factor de purificación.....	47
3.2.17.	Electroforesis en medio desnaturalizante.....	47
3.2.18.	Espectrometría de masa	49
3.2.19.	Sacarificación.....	49
3.2.20.	Caracterización de sustratos por microscopía electrónica de barrido .	50
3.2.21.	Panificación y evaluación de la calidad del pan	50
3.2.22.	Determinación del costo de la producción enzimática.....	53
3.2.23.	Procesamiento de la información y Análisis estadístico.....	53
	CAPÍTULO 4 - Producción Fúngica de Enzimas Hidrolíticas.....	54
4.1.	Evaluación de diversos sustratos en la producción de enzimas hidrolíticas de la cepa <i>Aspergillus niger</i> en fermentación sumergida.....	54
4.1.1.	Enzimas Xilanolíticas	55
4.1.2.	Enzimas Celulolíticas.....	58
4.1.3.	Enzimas Pectinolíticas	59
4.1.4.	Enzimas Amilolíticas	60
4.2.	Evaluación de diversos sustratos en la producción de enzimas hidrolíticas de la cepa <i>Aspergillus niger</i> en fermentación en estado sólido (FES).....	60
4.3.	Comparación de la producción de enzimas hidrolíticas en fermentación sumergida y sólida.....	63
4.3.1.	Relación entre la producción de actividades de las EX y EC	64

	CAPÍTULO 5 - Optimización de la Producción de EX	66
	5.1. Cribado de los factores que afectan la producción de las enzimas del complejo xilanolítico	66
	5.1.1. Sustrato: Cascarilla de soja	68
	5.1.2. Sustrato: Salvado de trigo	69
	5.1.3. Sustrato: Afrechillo de trigo.....	70
	5.2. Optimización de los factores que afectan la producción de las EX utilizando afrechillo de trigo.....	72
	5.3. Validación.....	78
	5.4. Escalado de la fermentación optimizada	78
	5.5. Reutilización de los residuos de la fermentación optimizada.....	79
	CAPÍTULO 6 - Caracterización del Extracto Enzimático Optimizado	81
	6.1. Caracterización fisicoquímica	81
	6.2. Espectrometría de masa	81
	6.3. Análisis de la estabilidad de las enzimas del EEO	82
	6.3.1. Efecto de la temperatura	83
	6.3.2. Cinética de inactivación térmica	84
	6.3.3. Efecto del pH	85
	6.3.4. Efecto de sales.....	87
	6.3.5. Efecto de estabilizantes	87
	6.3.6. Estudio la estabilidad de la EX del EEO en presencia de la Fase superior e inferior de SBA PCF/NaCit.....	89
	6.4. Determinación de los parámetros cinéticos	90
	CAPÍTULO 7 - Caracterización de la Extracción de EX.....	92
	7.1. Precipitación salina de las EX	92
	7.2. Extracción líquido - líquido empleando sistemas bifásicos acuosos de EX.....	95
	7.2.1. Extracción de los pigmentos del EEO.....	95
PT	7.2.2. Determinación de los parámetros que afectan el reparto de EX, EC y	96
	7.2.3. Efecto del PCF	97
	7.2.4. Efecto de la sal	98
	7.2.5. Efecto de la cantidad de EEO	98
	7.2.6. Efecto de la longitud de la línea de unión	99
	7.2.7. Efecto de la presencia de NaCl	100

7.2.8.	Efecto del peso molecular del PEG.....	100
7.2.9.	Extracción combinada por sistemas UCON/NaCit y PEG/NaCit.....	105
7.2.10.	Comparación de la extracción por SBA simples y combinados	107
7.2.11.	Evaluación de la V_{sup}/V_{inf} en la extracción combinada por sistemas UCON/NaCit y PEG 1450/NaCit	108
7.2.12.	Composición de las fases superior e inferior en la extracción combinada por sistemas UCON/NaCit y PEG 1450/NaCit	109
7.2.13.	Extracción de EX empleando cromatografía de intercambio iónico	111
	CAPÍTULO 8 - Diseño de una Estrategia Integrada de Purificación.....	116
8.1.	Reciclado de los componentes de las fases de los SBA	119
8.2.	Análisis de costos de operaciones unitarias desarrolladas.....	120
	CAPÍTULO 9 - Eficiencia de las enzimas xilanolíticas	124
9.1.	Sacarificación	124
9.2.	Elaboración de panes	126
	CAPÍTULO 10 - Conclusión.....	132
	CAPITULO 11 - ANEXO	136
11.1.	Producción Fúngica de Enzimas Hidrolíticas	136
11.2.	Caracterización del EEO, FS y FI.....	139
11.3.	Análisis de costos de operaciones unitarias desarrolladas.....	142
	CAPÍTULO 12 - Referencias Bibliográficas.....	146

Abreviaturas

%R	Rendimiento
A	Aserrín de madera de pino y cancharana
ANOVA	Análisis de la variancia
AT	Afrechillo de trigo
C	Cebada
CG	Cáscara de semillas de girasol
CM	Cáscara de maní
CN	Cáscara de naranja
CS	Cascarilla de soja
CUP	Costo por unidad de producto
DEE	Diseño estadístico experimental
DFE	Diseño factorial
EA	Enzimas amilolíticas
EC	Enzimas celulolíticas
EEO	Extracto enzimático optimizado
EP	Enzimas pectinolíticas
EX	Enzimas xilanolíticas
FA	Falta de ajuste
FES	Fermentación en estado sólido
FI	Fase inferior
FP	Factor de purificación
FPLC	Cromatografía líquida de proteína a alta velocidad
FS	Fase superior
FSm	Fermentación sumergida
HV	Harina de vino
KPi	Fosfato de potasio
Kr	Coefficiente de reparto

LLU	Longitud de línea de unión
NaCit	Citrato de sodio
PCF	Polímero de cadena flexible
PEG	Polietilenglicol
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PT	Proteínas solubles totales
SA	Salvado de avena
SBA	Sistema bifásico acuoso
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante con dodecil sulfato sódico
SL	Sustrato lignocelulósico
ST	Salvado de trigo
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSF	Temperatura de separación de fases
UCON	Polímero de óxido de etileno y óxido de propileno
V	Viruta de madera de pino y cancharana
V_{Inf}	Volumen de la fase inferior del SBA
V_{Sup}	Volumen de la fase superior del SBA

Palabras tomadas del idioma extranjero

<i>Buffer</i>	Solución amortiguadora
<i>Salting out</i>	Precipitación salina
<i>Upstream Processing</i>	Refiere al proceso de producción de biomoléculas.
<i>Downstream Processing</i>	Refiere al proceso de recuperación y la purificación de biomoléculas

Resumen

El diseño de bioprocesos para la producción de metabolitos fúngicos como las enzimas comprende operaciones unitarias para la producción, incluidas en el *upstream*, y en las de recuperación y purificación denominadas *downstream*. La optimización del bioproceso global permite minimizar el costo de producción. El hongo filamentoso *Aspergillus niger* es uno de los microorganismos más usado para la producción de enzimas hidrolíticas, debido a su capacidad de producir proteínas exógenas. En el marco del presente trabajo de tesis doctoral se planteó el desarrollo de un bioproceso de producción de enzimas del sistema xilanolítico, a partir de un subproducto de la industria harinera priorizando el empleo de reactivos biodegradables e inoos y reutilizando los residuos generados para alcanzar un proceso sostenible.

Como punto de partida del *upstream* del proceso, se realizó la caracterización de extractos enzimáticos obtenidos de cultivos fúngicos de *A. niger*, fermentaciones sumergidas y sólidas, efectuadas a partir de diferentes sustratos lignocelulósicos utilizados como única fuente de carbono. Se seleccionó el afrechillo de trigo, la cascarilla de soja y la harina de trigo como los más adecuados en comparación a otros nueve sustratos ensayados, para la producción de xilanasas. Mediante diseño estadístico experimental, se identificaron los factores que más afectaron al proceso productivo, permitiendo así optimizar las condiciones metodológicas y maximizar la concentración de enzimas xilanolíticas (EX) respecto de las celulolíticas (EC). El sistema optimizado mediante un diseño central compuesto empleando metodología de superficie de respuesta contiene 0,1 gramo de afrechillo de trigo sin tratamiento alcalino; 1 g/L de NaNO₃, 29,09 mL de solución de cultivo a pH=6,50 incubándose a 30°C durante 4 días, y el extracto optimizado contiene una actividad específica de enzimas xilanolíticas de 24 U/mg. El escalado de la fermentación optimizada, permitió obtener el extracto enzimático sin variación en la calidad ni cantidad de las EX, reutilizándose el sólido remanente en nuevos procesos fermentativos para la producción de biosurfactantes. Se caracterizó el secretoma optimizado de *A. niger* identificando las enzimas que lo componen; y evaluando los parámetros cinéticos de las EX del extracto, las que resultaron sensibles a la presencia de Cu²⁺, estables en un amplio rango de pH (3,00-9,00), con un tiempo de vida media superior a 120 días a temperaturas entre 20 y 30°C, no requiriendo del agregado de cosolutos para su estabilización. La eficiencia de las enzimas del EEO, se analizó mediante sacarificación de cascarilla de soja, corroborándose que el conjunto de enzimas hidrolíticas es altamente activo en la degradación de la hemicelulosa y celulosa de este residuo.

Iniciando el *downstream* del proceso de obtención de EX fúngicas se caracterizaron tres diferentes técnicas de extracción, la tradicional precipitación con sulfato de amonio en la cual se obtuvo bajo rendimiento, la extracción líquido-líquido empleando sistemas bifásicos acuosos (SBAs) y finalmente cromatografía de intercambio iónico.

En la extracción empleando SBAs se evaluaron sistemas formados por los polímeros de cadena flexible UCON y PEGs de pesos moleculares promedio 600, 1450, 2000 y 4600, como también las sales NaCit y KPi, la composición inicial, agregado de NaCl, la variación de la relación de volúmenes de fases y la cantidad de EEO. Se ensayó la extracción combinada y consecutiva de los sistemas UCON/NaCit y PEG/NaCit, siendo posible extraer los pigmentos producidos durante la fermentación en la fase superior de la extracción primaria del sistema UCON/NaCit. La fase inferior, donde se concentraron las proteínas del EEO, se utilizó para formar un nuevo sistema (extracción secundaria) formado por PEG1450 y NaCit en el cual se recuperaron en la fase superior las EX con una abundancia relativa del 66,1%. La combinación de ambos SBA permitió incrementar la capacidad separativa de las EX respecto de las EC, alcanzando un factor de purificación de 3,8 y un %R_{EX} del 80%, y recuperándose la sal citrato de sodio de la fase inferior para su reutilización en nuevos SBAs. Se evaluó a las enzimas purificadas por extracción combinada de los SBA y las del EEO, como aditivos enzimáticos en la elaboración de pan de harina de trigo. Las enzimas purificadas mediante SBA combinados mejoraron la estructura de la miga, el volumen, el peso y el corte del pan.

El fraccionamiento de proteínas por cromatografía de intercambio iónico fue óptimo al emplear una columna Q Sheparosa XL, siendo el %R_{EX} de esta etapa de purificación de 99,2% y factor de purificación de 2,9.

Finalmente, se planteó una estrategia integrada para la bioseparación de las EX combinando la extracción consecutiva UCON15%P/P / NaCit7%P/P y PEG15,5%P/P / NaCit13,6%P/P con un $V_{sup}/V_{inf}= 1$ a pH 5,2 y temperatura de 22°C; con cromatografía aniónica utilizando la columna Q Sheparosa XL a flujo de 1mL/min, volumen de inyección de 100μL, gradiente de elución en 2 minutos y tiempo de lavado 1 de 5 minutos. El bioproceso diseñado fue eficiente para la producción y purificación de EX de *A. niger*, con un rendimiento total de 79,9% un factor de purificación de 11 y actividad xilanólítica de 0,49 U/ml correspondientes a endo-β-1,4-xilanasas B y C, las que se encuentran libres de las enzimas celulolíticas, lo cual permitiría su utilización en la industria papelera en reemplazo de agentes tóxicos que se utilizan para el blanqueo de la pasta de papel.

CAPÍTULO 1 - Introducción

A lo largo de los últimos siglos la comunidad científica en general se ha ocupado, y muchas veces preocupado por el incremento de la población mundial. De acuerdo a las proyecciones de la Organización de las Naciones Unidas (O.N.U.) para el año 2050 la población mundial se estima que se incrementará hasta aproximadamente un 33%, es decir que alcanzará la cifra de 9.700 millones de habitantes, en consecuencia, para poder satisfacer la demanda de alimentos de toda la población mundial, la agricultura deberá incrementar la cantidad de cultivo, como también la ganadería y por lo tanto la manufactura (Naciones Unidas 2020a). Este panorama conlleva a un aumento en la cantidad de desechos agrícolas y agroindustriales generados, siendo de gran importancia crear productos con valor agregado a partir de los mismos. La fermentación de los desechos agrícolas o agroindustriales a partir de fuentes microbianas, ha sido utilizada para la producción, con valor comercial, de productos biológicos tales como enzimas, antibióticos, compuestos aromatizantes, biomasa microbiana para la alimentación animal, etc. (Kheng and Omar 2005).

En Argentina, en el año 2019 se cosecharon 55 millones de toneladas de soja, 51 millones de toneladas de maíz y 19,5 millones de toneladas de trigo, según el Departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA 2020). Nuestro país, siendo un país agrícola, genera abundantes y variados desechos producto de esta actividad. Los residuos agrícolas y agroindustriales provenientes de cosechas de trigo, maíz y soja, como también las de manzana, uva y cítricos, contribuyen a millones de toneladas anuales de residuos de base lignocelulósica, en particular en la región pampeana los subproductos agroindustriales están ampliamente disponibles, dado que es donde se localiza la mayor cantidad de molinos y aceiteras de acuerdo a los datos informados por la Federación Argentina de la Industria Molinera y cámara de la industria aceitera de la República Argentina (Fiam 2020; CIARA 2020)

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible impulsados por la ONU son una respuesta a las amenazas del cambio climático, el crecimiento de la población, el aumento de la riqueza y las necesidades de una mayor salud prolongada. En su conjunto, estas problemáticas impactan en las cadenas mundiales de suministro de alimentos exigiendo una innovación significativa para enfrentar estos desafíos (Naciones Unidas 2020b).

Las enzimas son ampliamente empleadas en la producción de alimentos. Por su naturaleza y sencillez de aplicación, permiten un mejor aprovechamiento de la materia prima, la optimización de los procesos de producción y el desarrollo de productos de alta calidad. Actualmente, las enzimas se consideran aditivos en la industria de los alimentos ya que pueden modificar la apariencia, textura, valor nutricional, generar aromas y sabores, además de disminuir el tiempo de proceso. Su utilización se ha extendido a otras aplicaciones relacionadas con la industria alimentaria como el desarrollo de envases activos y biosensores.

Esta aplicación se enmarca en las misiones desarrolladas por Peter Lillford y Anne-Marie Hermansson, para abordar las necesidades críticas de la ciencia y la tecnología de los alimentos, con un plan de acción para poder cumplir los Objetivos de Desarrollo Sostenible. La utilización de las enzimas y su producción se engloba en dos de las siete misiones. La primera “desarrollar nuevos procesos y sistemas para garantizar una fabricación más sostenible” y la segunda “eliminar el desperdicio de material en la producción, distribución y consumo” (Lillford and Hermansson 2019).

En la Figura 1.1 se esquematiza como el aumento de la población genera el incremento en la producción de alimentos, y en consecuencia un incremento de los desechos producidos por su manufactura. Las aplicaciones biotecnológicas pueden emplear estos desechos como materia prima para la producción de enzimas. Estas enzimas contribuyen a la mejora de los alimentos procesados y pueden repercutir en beneficios para la población.

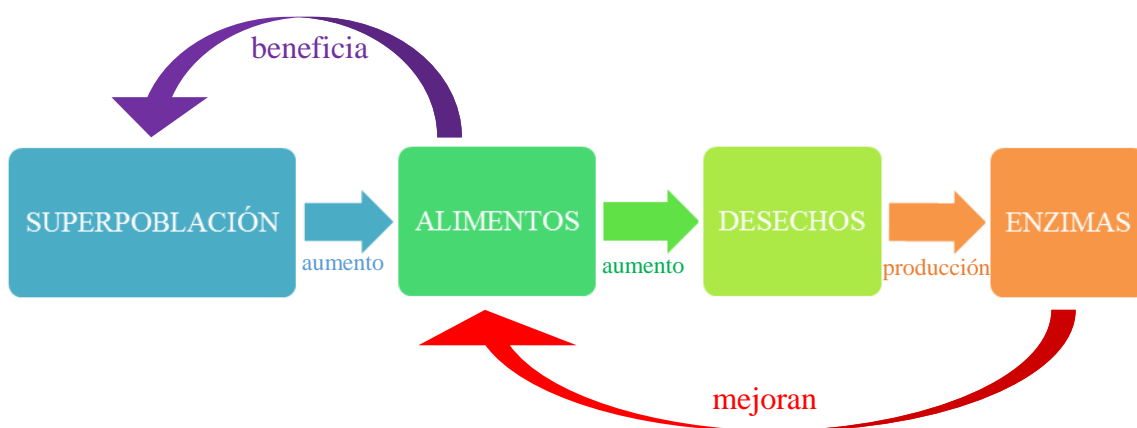


Figura 1.1: Esquematización de la contribución indirecta del incremento de la población a la producción de enzimas.

1.1. Biotecnología y Enzimas

La Biotecnología refiere a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos. No consiste en una ciencia básica sino en un conjunto de actividades, métodos, conocimientos y herramientas con un enfoque multidisciplinario, con el objetivo de estudiar y manipular los sistemas biológicos para favorecer al ser humano (Naciones Unidas 1992).

Al ser un campo tecnológico amplio, cuenta con diversas aplicaciones como la medicina, farmacéutica, alimentación, agricultura, química, por mencionar algunas. La biotecnología industrial es la que se dedica a optimizar los procesos industriales tendiendo a reemplazar las tecnologías convencionales por otras más “limpias” o amigables con el ambiente entre las que se puede incluir las fermentaciones por microorganismos para la producción de biocombustible, ácidos orgánicos y enzimas (Jegannathan and Nielsen 2013).

En los últimos años, en la industria, los procesos catalizados por enzimas han adquirido gran relevancia, ya que presentan ventajas frente a los catalizadores no biológicos. La producción de enzimas a nivel mundial (Figura 1.2) está a cargo de 18 compañías distribuidas en Europa, Asia y América, dominando las ventas globales Novo Nordisk (Dinamarca), Novozymes (Dinamarca) y DuPont Danisco (USA). Con una participación menor pero importante se encuentran las compañías alemanas BASF y Henkel, la holandesa DSM, así como las japonesas Amano y Ajinomoto. En el año 2018 se calculó que el mercado global de las enzimas era alrededor de 9,3 billones de dólares y se espera para el 2025 un incremento del 7,1%. En América Latina existen empresas productoras de enzimas, sin embargo, muchas de ellas son subsidiarias de empresas transnacionales.

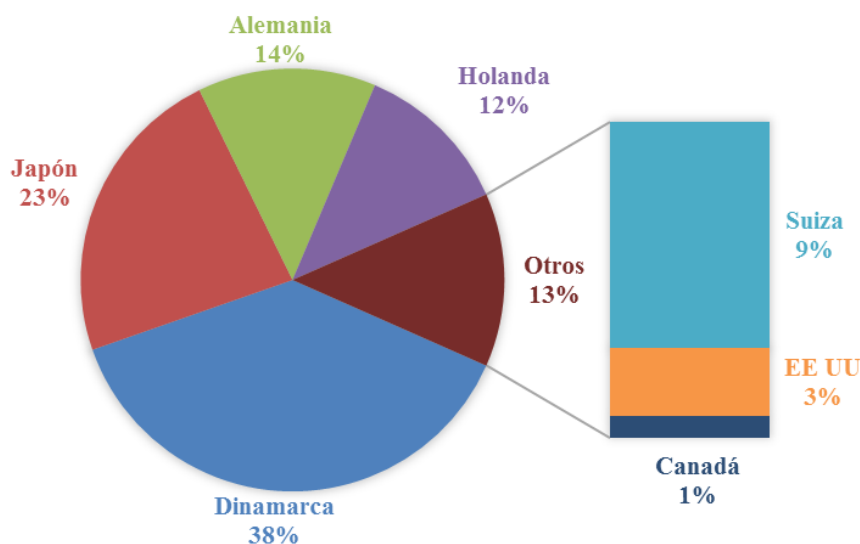


Figura 1.2: Principales países productores de enzimas en el año 2018, adaptado de (del Moral, Ramírez-coutiño, and García-gómez 2015)

La venta mundial de enzimas se ha incrementado de manera constante desde hace varios años en función de las necesidades específicas de cada continente o región. La distribución del mercado está repartido en diversos sectores, entre los que se encuentran productos de limpieza (37%), alimentos y bebidas (31%), bioenergéticos (17%) o alimentos para ganado (15%). Las regiones en las que se comercializan las enzimas son Norteamérica (35 %), Europa (36%), Asia (19%) y Latinoamérica (10%). En Europa y Norteamérica se consumen enzimas principalmente para el sector de biocombustibles y de detergentes; mientras que, en América Latina y China, se emplean en el sector alimentario. Por esta razón los países emergentes deberían implementar estrategias para satisfacer, al menos, la auto demanda de enzimas, en varios sectores productivos. (del Moral, Ramírez-coutiño, and García-gómez 2015).

A la fecha, en la región pampeana Argentina, solo existen dos empresas que están construyendo plantas para la producción de enzimas mientras continúan avanzando con el desarrollo. Por un lado, NOVA S. A. con tres líneas de investigación, está desarrollando dos enzimas para la industria láctea, dos para la industria del bioetanol y una para la producción de alimento balanceado. Por otro lado, Keclon S. A. posee una línea de investigación para el tratamiento enzimático de aceites, para el refinado de biodiesel y producción de oleínas. Actualmente, ninguna de ellas produce enzimas hidrolíticas debiendo por ello ser importadas para sus múltiples aplicaciones.

Por esta razón el desarrollo de nuevas estrategias de producción de enzimas útiles en la industria, es de gran interés, especialmente las que utilizan procesos donde sea

posible una producción rentable y a la vez amigable con el medioambiente (Wolfgang 2007).

1.2. Hongos Filamentosos

Los microorganismos tales como bacterias, algas, hongos, protozoos, gasterópodos y artrópodos producen una amplia variedad de enzimas hidrolíticas. A través de dichas enzimas degradan la pared celular vegetal, este fenómeno genera la liberación de monosacáridos, que pueden entrar en el metabolismo del microorganismo, proporcionándole energía. Los hongos filamentosos, son los mejores productores de las enzimas hidrolíticas ya que pueden excretarlas con niveles superiores al de levaduras y bacterias (Polizeli et al. 2005). Estos hongos se en su mayoría son saprófitos, viven en la materia compuesta principalmente por biomasa vegetal orgánica muerta o en descomposición siendo fundamentales para la vida en la Tierra, ya que son responsables de gran parte de los flujos de carbono en la biosfera (de Souza 2013).

Dentro de los hongos filamentosos *Aspergillus niger*, es comúnmente conocido por estar ampliamente distribuido en la naturaleza, especialmente en lugares cálidos y húmedos y por estar involucrado en la descomposición de los alimentos. Puede producir una amplia gama de enzimas que degradan la pared vegetal celular, en especial la hemicelulosa. Este hongo es utilizado en biotecnología dada su habilidad de secretar ácidos orgánicos y enzimas necesarias para la hidrólisis de biopolímeros, actuando de una manera sinérgica para hidrolizar tales sustratos complejos.

Muchos de los hongos filamentosos se reproducen por conidios y se distinguen por las características de las estructuras especializadas que los soportan y producen, denominadas conidióforos. En el caso de los *Aspergillus* el conidióforo se eleva a partir de una célula del micelio vegetativo, llamada célula pie, que termina en una parte hinchada denominada vesícula (Vásquez Vanegas 2013). Desde esta expansión los conidios se forman en cadena a partir de la célula conidiógena denominada fiálide, en *A. niger* estos conidios son de color negro y rugoso (Figura 1.3) (de Souza 2013). *A. niger* es considerado GRAS (del inglés: *Generally Recognized As Safe*), cuyo reconocimiento fue otorgado por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos, razón por la cual se considera seguro su uso en procesos destinados a consumo humano (Izarra et al. 2010). La versatilidad de esta especie fúngica para adaptar su metabolismo a diversos sustratos lo ha convertido en un buen candidato para la producción selectiva de enzimas xilanasas, glucanasas, pectinasas o amilasas (Andersen et al. 2012).

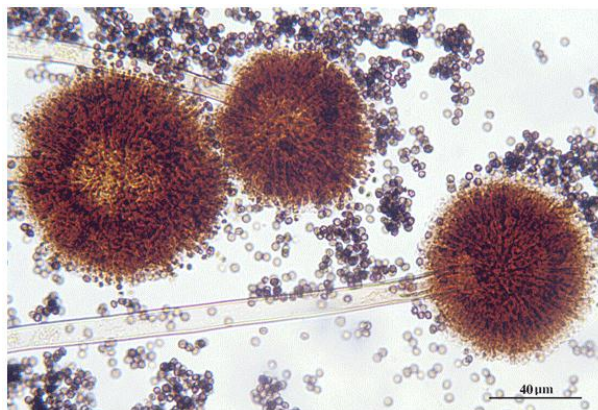


Figura 1.3: Microscopia de conidios de *Aspergillus niger* extraída con permiso de www.sinusitiswellness.com.

1.3. Polisacáridos presentes en la biomasa vegetal

La pared celular de las plantas está considerada como la fuente renovable de polisacáridos más abundante en la naturaleza. Los componentes principales se agrupan de acuerdo al esquema de la Figura 1.4 en *celulosa*, *lignina*, *hemicelulosa* y *pectina*. Juntos, los polisacáridos y la lignina proporcionan alta complejidad y rigidez a la pared celular de las plantas (Ratanakhanokchai et al. 2013).

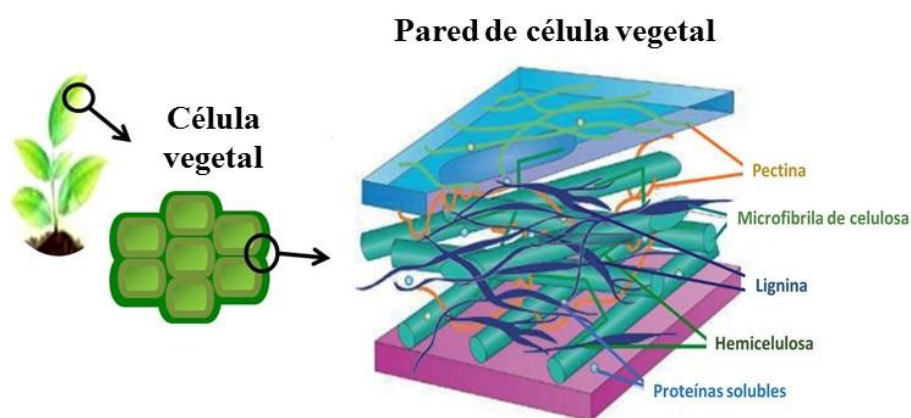


Figura 1.4: Esquema de la disposición de los componentes principales de la pared celular vegetal adaptado de (Ratanakhanokchai et al. 2013)

Celulosa

La celulosa, es un biopolímero insoluble compuesto por residuos de glucosa unidos por enlace glicosídicos β -1,4 que forman cadenas poliméricas lineales de alrededor de 8000 a 12000 unidades de glucosa. Es el principal constituyente de la pared celular vegetal. En su forma cristalina, consiste en cadenas que están unidas por enlaces de hidrógeno para formar estructuras altamente insolubles, llamadas microfibrillas. Además, este polímero

contiene regiones amorfas dentro de las microfibrillas llamadas estructura no cristalina (de Souza 2013).

Hemicelulosa

Consiste en una estructura ramificada compuesta por heteropolisacáridos de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (manosa, glucosa y galactosa) y azúcares acetilados donde los componentes principales son los polímeros de xilosa, denominados generalmente xilanos. El xilano está constituido por una cadena principal de residuos de esta pentosa, unidas por enlaces glicosídicos β -1,4. De acuerdo a la especie vegetal que lo produce, puede variar la cantidad de ramificaciones y sustituyentes que tenga la cadena lineal de xilosa, por ejemplo, en las maderas duras, el xilano se encuentra mayormente acetilado y en las maderas blandas posee en proporción mayor número de residuos de arabinosa (de Souza 2013; Ratanakhanokchai et al. 2013).

Lignina

Este complejo polifenólico se encuentra asociado a las hemicelulosas formando matrices que rodean a las microfibrillas de celulosa proporcionando de esta manera gran dureza a la pared celular vegetal

Pectina

Las pectinas son otra familia de heteropolisacáridos de pared celular de plantas. Es un polímero heterogéneo compuesto por una cadena principal de ácido D-galacturónico unido por enlaces α -1,4. Estos polímeros generalmente contienen dos tipos diferentes de regiones. La denominada región "lisa" constituida por residuos de ácidos D-galacturónicos con uniones α -1,4, las cuales pueden metilarse o acetilarse y la región "peluda", constituida por residuos de los ácidos D-galacturónicos interrumpida por residuos de L-ramnosa con uniones α -1,2, los cuales a su vez, pueden estar ramificados por largas cadenas laterales de L-arabinosa y D-galactosa (de Souza 2013).

Almidón

El almidón se produce por la fotosíntesis en las hojas verdes de las plantas y es depositado en semillas, raíces y tallos como una manera de almacenar energía. Normalmente es acumulado formando gránulos en los orgánulos específicos llamados amiloplastos. Compuesto por dos estructuras diferentes del polisacárido: amilosa y amilopectina, ambas son polímeros de α -glucosa. La primera forma, amilosa, representa

generalmente el 20-30% del almidón y está compuesto de largas cadenas lineales con residuos de D-glucopiranosos con uniones α -1,4, estas moléculas se enrollan en una estructura helicoidal. La segunda, amilopectina, es el mayor componente del almidón, también está formada por D-glucopiranosos, aunque en este caso conforma una cadena altamente ramificada en la que hay uniones α -1,4, como se indicó en el caso anterior, y muchos enlaces α -1,6 que originan sitios de ramificación (Preiss 1988).

1.4. Enzimas Hidrolíticas que actúan sobre la biomasa vegetal

Las enzimas que degradan la biomasa vegetal son enzimas hidrolíticas, entre las que se encuentran las que conforman el sistema o complejo xilanolítico (EX), celulolíticos (EC), amilolítico (EA) y pectinolíticos (EP). Presentan un gran interés biotecnológico cuando se las emplea en procesos industriales que utilizan como materia prima sustratos de origen vegetal, ya que su uso exhibe ventajas como pueden ser la elevada eficiencia, su bajo impacto medioambiental y su rentabilidad económica (Bhardwaj, Kumar, and Verma 2019).

1.4.1. Xilanasas

Debido a la heterogeneidad del xilano, su hidrólisis requiere de la acción de un sistema complejo de enzimas el cual comprende las enzimas que actúan sobre la cadena principal: endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8), exo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.156), β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) y las que desprenden los grupos laterales unidos a los residuos de xilosa: α -glucuronidasas (EC 3.2.1.131), α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), feruloilesterasas (EC 3.1.1.73), acetil-xilanoesterasas (EC 3.1.1.6) y galactosidasas (EC 3.2.1.22) (Bhardwaj, Kumar, and Verma 2019). En la Figura 1.5 puede observarse una representación esquemática de la estructura del xilano y los sitios de hidrólisis de las diversas enzimas que componen el complejo xilanolítico.

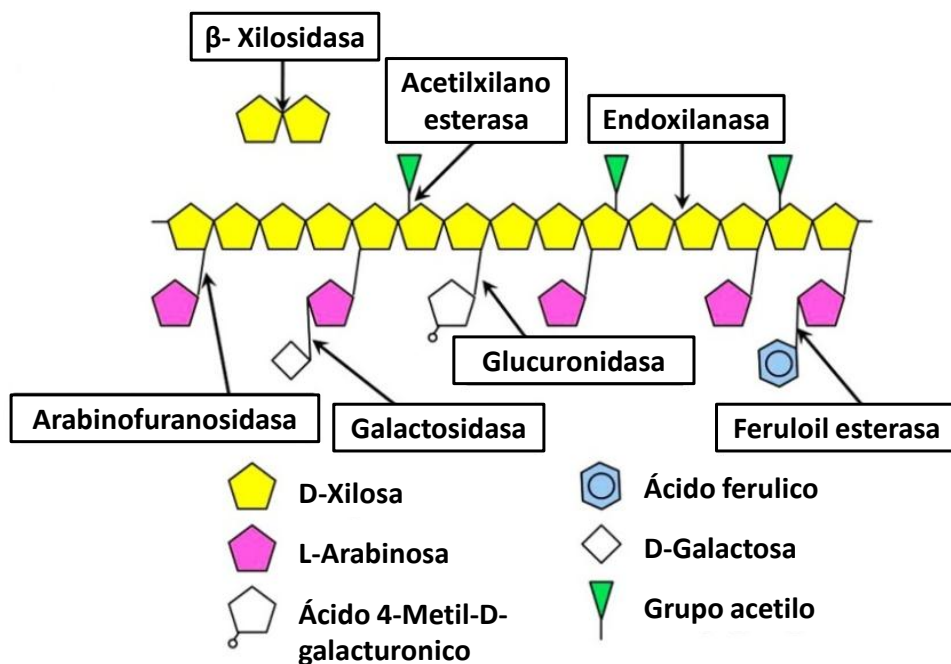


Figura 1.5: Representación esquemática de la estructura del xilano y sistemas de enzimas implicadas en la degradación del mismo adaptada de (Ratanakhanokchai et al. 2013).

Cuando se encuentran libres de enzimas del complejo celulolítico, las xilanasas se utilizan para el blanqueo de la pasta de celulosa en la fabricación de papel, incluyendo su reciclado, la cual provoca una disminución de hasta el 35% en el uso de los compuestos clorados. Por otro lado, las xilanasas en conjunto con celulasas, se han utilizado como aditivo de detergentes, en la producción de oligosacáridos farmacológicamente activos como antioxidantes, y en la síntesis de nuevos tensoactivos debido a la actividad transxilosidasa que poseen algunas de estas enzimas. Además, se emplean en la manufactura de bebidas, en la cerveza disminuye la viscosidad y en los jugos naturales se emplean también para la clarificación. En el vino aumenta el aroma. Cuando se adicionan en alimento animal favorece su digestión. También se utiliza para extraer café y aceite de plantas, y para la producción de hidrolizados de desechos agroindustriales, entre otras aplicaciones (Bajpai 2014; Collins, Gerday, and Feller 2005; Krishna 2005; Polizeli et al. 2005; Bhardwaj, Kumar, and Verma 2019).

Las xilanasas se usan ampliamente como aditivos en la industria de la panificación para mejorar el procesamiento y la calidad de los productos. Se ha demostrado que afectan las características de la masa, como la estabilidad, la flexibilidad, la extensibilidad y la coherencia, facilita la redistribución del agua y modifica la elasticidad de la red de gluten. Esto da como resultado una mejor estructura de la miga, mejora de su porosidad, firmeza,

perfil de textura, capacidad de retención de la humedad y prolongación de la vida útil del pan (de Queiroz Brito Cunha et al. 2018).

1.4.2. Celulasas

Celulasas o Glucanasas es el nombre genérico que recibe el sistema de enzimas capaces de degradar el biopolímero celulosa. En la Figura 1.5 puede observarse una representación esquemática de su estructura y los sitios de hidrólisis de las diversas enzimas involucradas. Este complejo enzimático está conformado por la endo- β -1,4-D-glucanasa (EC 3.2.1.4), cuya función es hidrolizar los enlaces β -1,4 de la celulosa para producir glucooligosacáridos, la exo- β -1,4-glucanasa (celobiohidrolasa) (EC 3.2.91), que produce celobiosa a partir de celulosa y la β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.21) que degrada los glucooligosacáridos a glucosa (Botella et al. 2005; Krishna 2005; de Souza 2013).

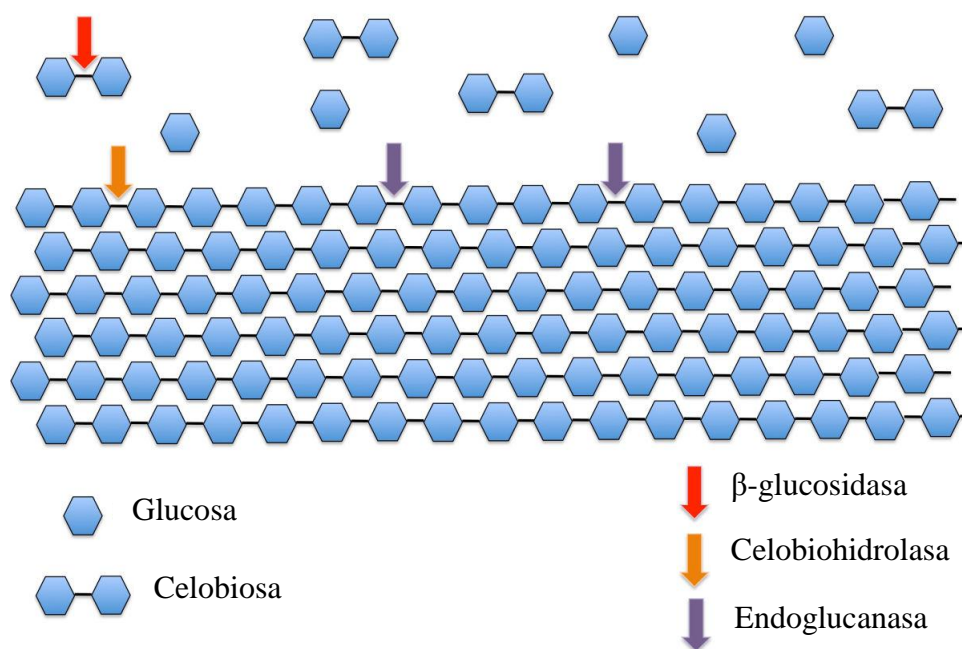


Figura 1.6: Representación esquemática de la estructura de la celulosa y sistemas de enzimas implicadas en su degradación adaptada de (de Souza 2013).

Las enzimas de este complejo se emplean en la producción de glucosa y de etanol, también para extraer componentes del té verde, para producir jarabe de fructosa, para el tratamiento de materiales que contienen lignocelulosa y en la industria textil se utiliza para desteñido de tela de jeans (Botella et al. 2005; Krishna 2005).

1.4.3. Pectinasa

Las enzimas que degradan pectina son poligalacturonasas (EC 3.2.1.15) llamadas comúnmente pectinasas. Constituyen un complejo sistema catalítico cuya función es la hidrólisis de los polisacáridos de ácido galacturónico de los tejidos de las plantas (de Souza 2013).

Las pectinasas poseen aplicaciones industriales muy diversas, siendo la más beneficiada la alimentaria, particularmente en el procesado de frutas y vegetales. El uso más antiguo y aún hoy más difundido es, junto con otro tipo de enzimas, en la optimización de los procesos de filtración y clarificación de jugos como el de manzana o el de uva (Kashyap et al. 2001). Además, la pectina permite la maceración de los tejidos vegetales, cuyo objetivo es producir pulpas de frutas y vegetales para ser utilizadas como ingredientes en alimentos, fundamentalmente para bebés y ancianos. También se utiliza para la extracción de la pectina de los demás componentes del tejido vegetal o para la posterior purificación del producto, el cual es un aditivo alimenticio altamente utilizado como gelificante y estabilizante (Pedrolli et al. 2009; Ahmed et al. 2016).

1.4.4. Amilasa

La α -amilasa (EC 3.2.1.1) es una enzima hidrolasa que cataliza la reacción de hidrólisis de los enlaces α -1,4 entre las unidades de glucosa al digerir el glucógeno y el almidón para formar fragmentos de glucosa (dextrinas, maltosa) y glucosa libre. Son producidas por animales, plantas y microorganismos. Todas las α -amilasas son metaloenzimas que contienen al menos un ión Ca^{2+} por molécula de enzima, el cual es esencial para su actividad y estabilidad (Ballschmiter, Fütterer, and Liebl 2006).

La enzima amilasa encuentra su potencial aplicación en una serie de procesos industriales tales como la fabricación de pan, cerveza, procesamiento del almidón y en las industrias farmacéutica, textil y del papel (Kammoun, Naili, and Bejar 2008). En la industria de la cerveza se utiliza para aumentar la capacidad de fermentación del mosto de cerveza (incluyendo los que son a base de cereales no malteados), en la industria del almidón para producir jarabes de alto equivalente de dextrosa y de maltosa, y en la industria del alcohol para reducir el tiempo de fermentación (Samborska et al. 2006). En la industria alimenticia, se emplea específicamente en panadería, generando azúcares simples disponibles para el crecimiento de las levaduras, mejorando el rendimiento del proceso y las propiedades organolépticas del producto (Andreu, Collar, and Martínez-Anaya 1999).

Además, las amilasas se emplean en las industrias farmacéuticas y químicas para el diseño de biosensores (Van Der Maarel et al. 2002).

1.5. Regulación de la producción de las enzimas hidrolíticas en *A. niger*

El primer activador transcripcional de enzimas extracelulares en hongos filamentosos fue descrito para *A. niger*. La proteína XlnR activa la transcripción de los genes del sistema xilanolítico xlnA, xlnB, xlnC, xlnD y axeA, así como también la transcripción de genes que codifican para endoglucanasas, eglA y eglB, y celobiohidrolasas, eg1A y eg1B; indicando una posible coordinación en la regulación de las xilanasas y celulasas. La transcripción es dirigida es inducida por D-xilosa y no por soforosa (disacárido de glucosa) u otro producto de degradación de la celulosa.

En la Figura 1.7 puede observarse una representación del modelo de regulación de la expresión de las enzimas xilanolíticas y celulolíticas de *Aspergillus niger*. En este modelo se asume que una limitación por carbono lleva a una condición de desrepresión por catabolito, y en este estado los azúcares monoméricos, D-xilosa, o sus derivados, pueden actuar como inductores; la naturaleza de este azúcar monomérico determina el sistema enzimático que es inducido. El activador es expresado en presencia de xilano y lleva a una co-utilización de la celulosa, por consiguiente, en ausencia de xilano este sistema podría no ser activado o serlo pobremente, lo que conlleva a un crecimiento reducido cuando la celulosa es la única fuente de carbono.

La expresión de genes xilanolíticos y celulolíticos es fuertemente reprimida por glucosa, fructosa y altas concentraciones de D-xilosa siendo mediada por la proteína creA. En consecuencia, el nivel de expresión de estos genes depende del balance entre la inducción por XlnR y la represión por CreA (Gutiérrez-Rojas, Moreno-Sarmiento, and Montoya 2015; Aro, Pakula, and Penttilä 2005).

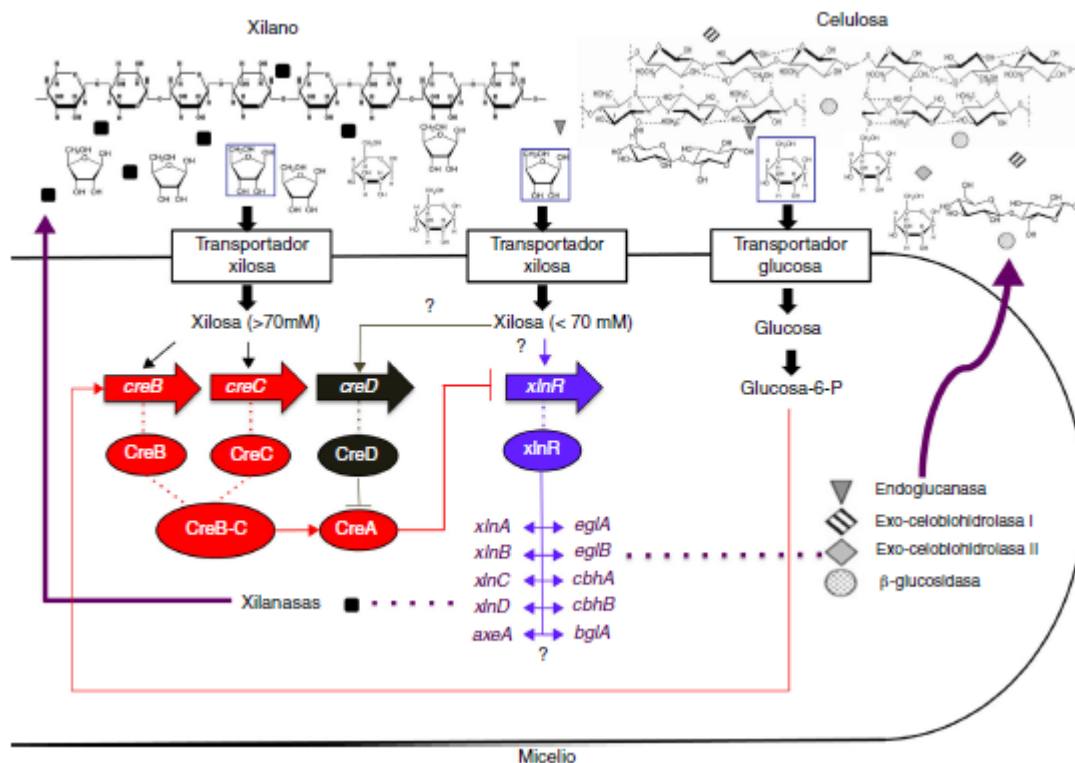


Figura 1.7: Representación del modelo de regulación de la expresión de las enzimas xilanolíticas y celulolíticas de *Aspergillus niger*. Adaptado de (Gutiérrez-Rojas, Moreno-Sarmiento, and Montoya 2015).

1.6. Fermentación

El medio de crecimiento natural de la mayoría de los hongos filamentosos es el medio sólido, desarrollándose dentro del sustrato o en su superficie, de acuerdo a la porosidad del mismo. Sin embargo, los hongos filamentosos también pueden crecer en medio líquido. Las características distintivas de cada tipo de fermentación se resumen en la Tabla 1.1. Las fermentaciones llevadas a cabo en medio líquido cuentan con mayores diseños y desarrollos industriales en sus fermentadores, permitiendo realizarlas con un alto control de las variables del sistema, haciendo que sean las más utilizadas en la producción de enzimas a escala industrial. Son generalmente sistemas perfectamente mezclados, donde cada parte del reactor contiene la misma cantidad de microorganismos, nutrientes y metabolitos, evitando concentraciones locales contraproducentes (Chen 2013; Chávez-González, Balagurusamy, and Aguilar 2020).

Tabla 1.1: Características de las fermentaciones sumergidas y en estado sólido

Fermentación sumergida	Fermentación en estado sólido
El sistema fluye	El sistema no fluye
Los nutrientes se dispersan homogéneamente en el cultivo y están siempre disponibles	Sustrato humedecido para permitir el acceso a nutrientes
El agua es el componente mayoritario	La cantidad de agua es la mínima requerida para el crecimiento del microorganismo
Limitada solubilidad del O ₂	Fácil aireación y gran superficie de intercambio de O ₂
La agitación es esencial para homogeneizar	Por lo general no requiere agitación
El crecimiento ocurre bajo la forma de micelio o pellets de micelio uniformemente distribuidos	El crecimiento involucra la penetración de las hifas en el sustrato sólido
Al ser cosechado los productos de fermentación están diluidos	Al ser cosechado con el volumen deseado, contiene los productos de fermentación concentrados
Fácil control de temperatura	Baja capacidad de transferencia del calor
Consumo de mucha energía	Consumo de poca energía
Facilidad en el control de parámetros	Dificultad en el control de parámetros
Un mayor requerimiento de agua facilita contaminación bacteriana en el proceso	Un nivel de agua bajo y una carga de inóculo alta conduce a una menor contaminación.
Fácil escalado, altamente estudiado	Difícil escalado, poca información
El <i>downstream</i> más simple con bajos insumos de agua.	El <i>downstream</i> es relativamente simple para la extracción de enzimas pero requiere alta cantidad de agua

En cuanto al medio de cultivo sobre el cual se desarrollarán los microorganismos, este debe tener todos los nutrientes necesarios de forma balanceada y con concentraciones adecuadas para favorecer el crecimiento del microorganismo. Las condiciones ambientales a tener en cuenta en la fermentación son la humedad, la actividad del agua, el pH, la temperatura, la concentración y disponibilidad del sustrato, el tipo y cantidad de carbono y nitrógeno, la aireación, el tamaño de partículas y la forma de inoculación, todos estos factores pueden afectar significativamente el crecimiento y la formación de productos.

1.7. Diseño estadístico para la producción enzimática

El diseño estadístico de experimentos (DEE), también denominado diseño experimental, se define como un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influida por varias variables. Cuando se emplea la metodología de superficie de respuesta, su objetivo es optimizar la respuesta. El DEE se ha utilizado como herramienta para seleccionar una estrategia experimental óptima durante varias décadas (Ferré and Rius, n.d.). Para estudiar la influencia de diversos parámetros sobre la producción de enzimas hidrolíticas de biomasa vegetal mediante fermentación de *A. niger* a partir de diversos sustratos de base lignocelulósica, se desarrolló una estrategia de DEE en cuatro etapas como se muestra en la Figura 1.8.

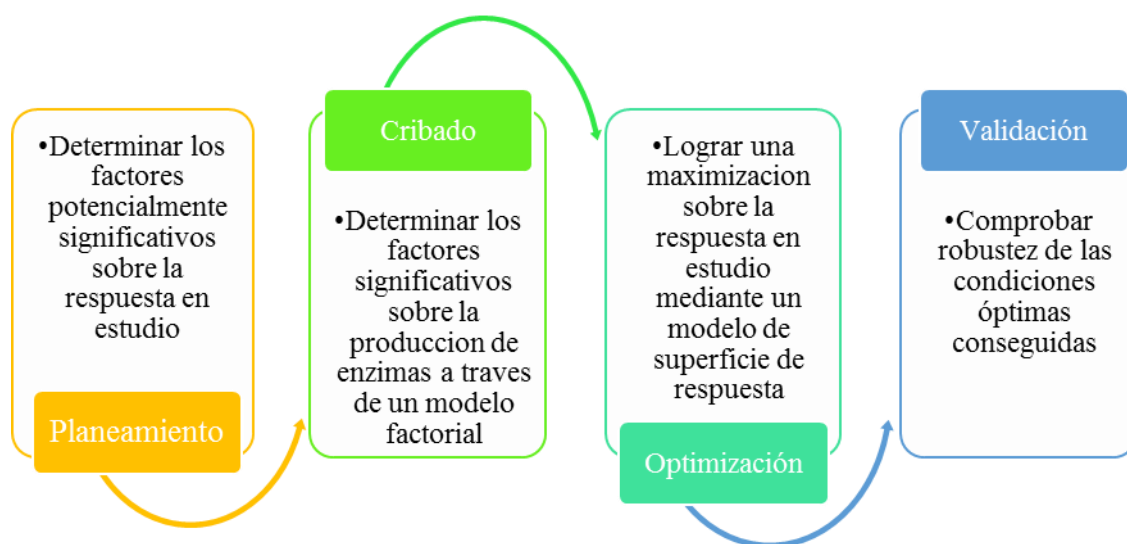


Figura 1.8 Esquema representativo del diseño experimental sobre la producción de enzimas hidrolíticas de la pared celular vegetal mediante fermentación de *A. niger* empleando sustratos de base lignocelulósica.

1.8. Bioprocesamiento de enzimas

La forma más simple y general de representar un bioproceso es en dos etapas generales, la primera es el proceso de *upstream* el cual consiste en la selección de la cepa microbiana o la manipulación genética para mejorar la síntesis del producto, la preparación y la esterilización del medio de cultivo, el proceso de fermentación desarrollado en biorreactores, como también diseñar o mejorar el medio ideal para la conversión bioquímica de sustratos a un producto específico por el metabolismo de la cepa microbiana.

La segunda etapa del proceso se denomina *downstream*. En ella se aplican los métodos apropiados para la recuperación, purificación y caracterización del producto de fermentación con valor agregado. Generalmente se necesita utilizar métodos escalables y bioselectivos para la recuperación y purificación del producto. Las estrategias para el diseño de un bioprocesamiento, buscan intensificar o maximizar la eficiencia de ambas etapas del proceso aumentando el rendimiento y también integrando dos o más operaciones unitarias en el proceso de purificación para finalmente mejorar los rendimientos generales de obtención: recuperación y pureza (Rito-Palomares and Benavides 2017; Chávez-González, Balagurusamy, and Aguilar 2020).

Hoy en día, existe una creciente demanda para establecer nuevas técnicas de los procesos de *downstream*, que sean factibles y eficientes en biotecnología y campos relacionados. Las tecnologías convencionales de *downstream*, por lo general son caras y requieren mucho tiempo y, a menudo, proporcionan bajos rendimientos de recuperación. Por lo tanto, el *downstream* es un importante cuello de botella para la comercialización de productos biológicos.

El proceso de aislamiento y purificación consiste en la extracción del producto de interés de la mezcla compleja que constituye su fuente natural utilizando una o varias operaciones unitarias. En general, la purificación de proteínas consta de los siguientes pasos: separación de células y fragmentos celulares del medio de cultivo (clarificación), concentración y/o purificación de baja y alta resolución, y operaciones para el acondicionamiento final del producto. Las etapas de aislamiento y purificación de enzimas representan entre el 70 y 80 % del costo total del producto final (Pessoa Junior and Kilikian 2005). En la Tabla 1.2 se presentan las operaciones unitarias empleadas en los procesos de purificación a escala industrial.

Tabla 1.2: Operaciones unitarias de procesos de purificación de macromoléculas adaptado de (Pessoa Junior and Kilikian 2005).

ETAPAS DEL PROCESO	OPERACIONES UNITARIAS
<i>Clarificación</i>	Filtración convencional
	Centrifugación
	Filtración tangencial (membranas)
	Floculación

<i>Ruptura de células</i>	Homogeneización
	Ultrasonicación
	Molienda en molino de bolas
	Rompimiento químico o enzimático
<i>Purificación de baja resolución</i>	Precipitación
	Ultrafiltración (membranas)
	Sistemas bifásicos acuosos
<i>Purificación de alta resolución</i>	Cromatografía de intercambio iónico
	Cromatografía de afinidad (biológica o química)
	Cromatografía de inmunoafinidad
	Cromatografía de interacción hidrofóbica
	Cromatografía de exclusión molecular
	Membranas adsortivas
<i>Acondicionamiento final</i>	Cristalización
	Liofilización
	Secado
	Estabilización

Debido al interés actual, por incorporar enzimas a los procesos industriales, es que ha crecido notablemente la demanda de enzimas hidrolíticas (Beniwal and Sharma 2014). Por este motivo es importante contar con métodos de purificación y concentración que puedan ser aplicados a gran escala, con elevada relación rendimiento/costo y que permitan el reciclado de los reactivos empleados en las sucesivas etapas del proceso. En este sentido, el principio de extracción líquido-líquido empleando sistemas bifásicos acuosos (SBAs) es un método que permite la extracción, separación y purificación de una gran variedad de material biológico, como enzimas, ácidos nucleicos, virus, membranas, etc., tanto a escala de laboratorio como a nivel industrial (Iqbal et al. 2016).

1.9. Sistemas bifásicos acuosos

La extracción líquido-líquido empleando SBAs constituye una alternativa a los procesos bioseparativos del *downstream* tradicionales, la cual ha sido exitosamente utilizada para aislar proteínas y otros materiales orgánicos (Glyk, Scheper, and Beutel 2015). En la Figura 1.9 se esquematizan las principales ventajas que ofrece esta técnica:



Figura 1.9: Representación gráfica de las ventajas de aplicación de los SBAs.

Como se observó en la Tabla 1.2, la extracción por SBA se enmarca dentro de las técnicas de baja resolución, sin embargo, presenta como ventaja una alta capacidad resolutoria combinando varias operaciones unitarias de los procesos convencionales como la clarificación, concentración, decantación, etc.

1.9.1. Tipos de sistemas bifásicos acuosos

Los SBAs se forman cuando se mezclan, en medio acuoso, dos polímeros de cadena flexible (PCF) como puede ser polietilenglicol (PEG), dextrano, polivinil alcohol, polímero de óxido de etileno y propileno (UCON) o bien un PCF y una sal como fosfato de potasio (KPi), citrato de sodio (NaCit), sulfato de sodio, por encima de cierta composición y temperatura crítica (Benavides Lozano and Rito-Palomares 2008). Se originan espontáneamente dos fases, una rica en uno de los PCF y la otra rica en el otro PCF o la sal. Debido a su bajo costo y corto tiempo de separación los sistemas PEG/sal

son los más empleados. En la Figura 1.10 se representa un esquema del mismo.



Figura 1.10: Esquema representativo de la preparación del SBAs.

Los SBAs formados por PCF y sales se han empleado para la separación biomolecular utilizando diferentes tipos de sales. La separación de macromoléculas en SBAs polímero-sal se basa en el efecto de *salting out* debido a la hidratación o deshidratación. También es importante destacar que la carga de iones juega un papel importante en la separación. El citrato de sodio es una sal trivalente de la serie Hofmeister y en esta serie, las bases trivalentes tienen un efecto de *salting out* mayor que los aniones monolíticos. Según la teoría de la exclusión, el volumen excluido efectivo (VEE) es un parámetro para comparar y estimar la capacidad de las sales para crear un efecto de *salting out* y para impulsar las moléculas más hidrofílicas. En otras palabras, es más probable que un VEE más grande induzca el flujo de migración de sal hacia una región en la que una concentración de polímero es más baja. La sal citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) es una opción adecuada para la extracción de proteínas en un sistema de dos fases acuosas debido también a su degradabilidad, alta recuperación y bajo costo. En particular el sistema formado por PCF/NaCit es uno de los sistemas bifásicos acuosos más adecuados para separar macromoléculas. (Raja and Murty 2012; Hong Yang 2013; Tubio, Pellegrini, Nerli, and Picó 2006; Azevedo et al. 2009).

Los sistemas PCF/fosfato han sido usados en macro escala para la separación de proteínas por su bajo costo. Sin embargo, no son muy selectivos y pueden dañar proteínas frágiles. Las proteínas anfílicas poseen baja solubilidad a altas concentraciones de sal y tienen una alta tendencia a agregarse en estos sistemas (Persson, Johansson, and Tjerneld 2000). Una desventaja adicional que presentan estos sistemas es que la concentración de fosfato requerida para la formación de las dos fases es muy alta, constituyendo un problema

medioambiental. Greve y Kula (Greve and Kula 1991) estudiaron el modo de reciclar la fase fosfato de los sistemas por precipitación del fosfato mediante el uso de alcohol. En este trabajo se emplearon los polímeros PEG, UCON y las sales NaCit y KPi, se utilizó esta sal para evaluar el comportamiento de reparto de las enzimas hidrolíticas fúngicas respecto de los sistemas formados con citrato de sodio.

El PEG es un polímero neutro, lineal o ramificado, soluble en agua y algunos solventes orgánicos. Es no tóxico, fue aprobado por la agencia gubernamental de Estados Unidos denominada Administración de Alimentos y Medicamentos o FDA (del inglés: *Food and Drug Administration*) para consumo humano y, su presencia no afecta la actividad de un gran número de enzimas. La Figura 1.11 muestra la estructura química del PEG. Su grado de polimerización, da origen a PEGs de diferentes pesos moleculares (PM) con características físicas distintivas. Los PEGs de PM menores a 1000 Da resultan líquidos viscosos prácticamente incoloros, y aquellos de PM mayores suelen ser sólidos blancos cristalinos. Los puntos de fusión de estos sólidos dependen en forma directa de su PM (J. M. Harris 1992).

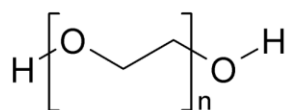


Figura 1.11: Estructura química del polietilenglicol.

El UCON es un copolímero al azar de óxido de etileno y óxido de propileno, es un lubricante derivado de polialquilenglicol, soluble en agua el cual se utiliza en maquinaria industrial donde existe la posibilidad de contacto con alimentos. Este polímero es termoinducibile a baja temperatura, es decir, al ser calentado por encima del punto de enturbiamiento, se induce la separación térmica observándose un nuevo sistema de dos fases que consiste en una fase superior de agua y una fase inferior enriquecida en polímero que permite el reciclaje del mismo (Tubio et al. 2009).

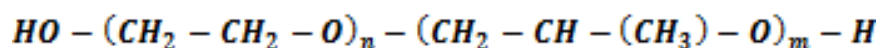


Figura 1.12: Estructura del copolímero al azar de óxido de etileno y óxido de propileno.

La extracción empleando SBAs permite, además, adicionar pasos consecutivos de extracción para lograr mayores grados de rendimiento y/o purificación, sin perder actividad, eliminando otros componentes contaminantes del medio. De esta manera, mediante el empleo de diferentes pasos consecutivos combinados, se favorece el reparto diferencial de

los distintos componentes del medio según sus características y las del sistema empleado (Glyk, Scheper, and Beutel 2015).

1.9.2. Estudio de las propiedades de un SBA: Diagrama Binodial

Cuando se trabaja con SBAs, es necesario obtener amplia información experimental del equilibrio líquido-líquido, tal como su composición y propiedades fisicoquímicas. Un adecuado conocimiento de dicho equilibrio permitirá predecir las composiciones de fase de distintos sistemas de composición total conocida y contribuir así al diseño y optimización del proceso extractivo. Los diagramas binodiales, útiles para este fin, están representados por una “curva binodial” (Figura 1.13) que es característica de un dado SBA bajo ciertas condiciones de pH, temperatura y presencia de sales.

La concentración de la especie que predomina en fase superior (FS) se representa en el eje de las ordenadas, mientras que el PCF o sal, que predomina en la fase inferior (FI) se representa en el eje de las abscisas, ambas expresadas como porcentaje en peso. En estos diagramas, la curva binodial separa dos zonas, una por encima de la curva, cuyos puntos corresponden a mezclas de concentraciones polímero-polímero o polímero-sal que darán lugar a sistemas bifásicos, y otra zona correspondiente a todos los puntos por debajo de la curva, los cuales representan las mezclas de composición polímero-polímero o polímero-sal que darán lugar a la formación de sistemas monofásicos.

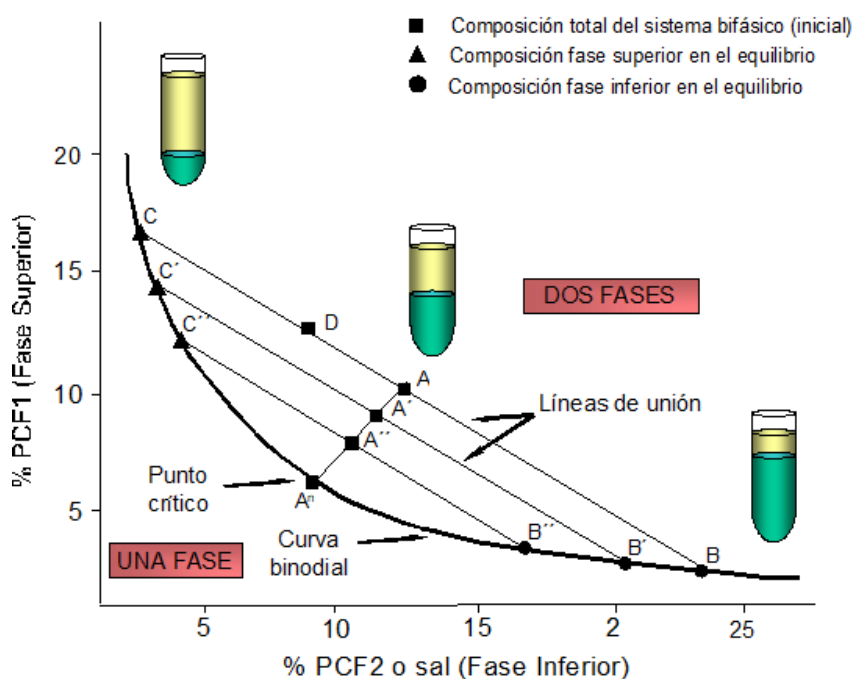


Figura 1.13: Representación gráfica del Diagrama Binodial.

La representación de la composición total inicial de un sistema bifásico se representa, por ejemplo, por el punto A (Figura 1.13). Las concentraciones de equilibrio en la fase superior (rica en PEG) e inferior (rica en sal) están dadas por los puntos C y B, respectivamente. De igual manera, un sistema con composición total inicial A' tendrá en el equilibrio, una composición C' en la fase superior y B' en la fase inferior, y así sucesivamente ocurrirá con los sistemas A'', A''' y otras combinaciones posibles. El conjunto de puntos C, C', C'', ..., Cn y B, B', B'', ..., Bn que representan la composición de las fases de cada sistema en el equilibrio, pertenecen y delimitan a la curva binodial. Un par de puntos tales como B y C se llaman nodos y las líneas entre ambos líneas de unión (Zaslavsky 1995; Rogers and Eiteman 1995).

Cualquiera de los posibles sistemas cuya composición total inicial esté incluida dentro de los puntos de una misma línea de unión (por ejemplo A y D en la línea de unión CB) darán lugar, en el equilibrio, a sistemas bifásicos con la misma composición final superior e inferior, si se mantienen las mismas condiciones experimentales (presión, temperatura y sales), pero con distintos volúmenes de las fases.

Como la concentración se expresa en % P/P, se cumple que la razón entre el peso de la fase superior y la fase inferior es igual a la razón entre las longitudes de las líneas AB y AC respectivamente. A medida que la composición inicial del sistema se mueve, por ejemplo en la dirección A, A', A'', ..., An, las concentraciones de las fases en equilibrio se hacen cada vez menores y similares entre sí, llegando al “punto crítico” (An) que corresponde al caso teórico en el cual la composición y volúmenes de ambas fases en equilibrio son iguales.

1.9.3. Reparto de biomoléculas

Macromoléculas tales como proteínas se reparten entre las fases de un SBA de acuerdo a la afinidad que presenten por cada una de ellas (Figura 1.14). Esto se ve reflejado numéricamente en el coeficiente de reparto (Kr) que se define de acuerdo a la ecuación 1:

$$Kr_M = \frac{[M]_{Sup}}{[M]_{Inf}} \text{ Ecuación 1}$$

donde $[M]_{Sup}$ y $[M]_{Inf}$ son las concentraciones de la macromolécula en la FS y FI, respectivamente, cuyos valores pueden determinarse por distintos métodos según las características de la macromolécula.

Se desconoce con precisión el mecanismo por el cual cursa el reparto de una

macromolécula entre dos fases, pero sin duda, éste depende de las diferentes y complejas interacciones entre la molécula a separar y las moléculas que la rodean (moléculas de solvente, PCF y ligandos). Intervienen la formación de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, así como también los efectos estéricos. Asimismo, influyen el tamaño, la conformación y las propiedades de superficie de la sustancia sometida al reparto (hidrofobicidad y carga superficial).

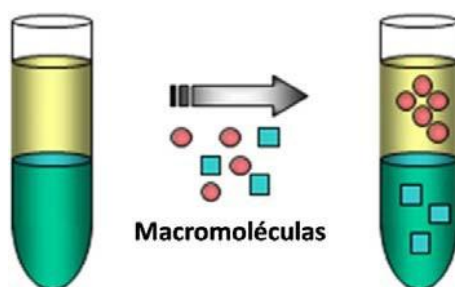


Figura 1.14: Representación gráfica del Reparto de macromoléculas.

1.9.4. Factores que inciden sobre el coeficiente de reparto

Si bien hasta el presente no existe ningún modelo lo suficientemente abarcativo que logre explicar el reparto de macromoléculas en SBAs, si existe suficiente evidencia experimental que permite hacer algunas generalizaciones acerca del efecto de diversos factores sobre el coeficiente de reparto (K_r). A continuación, se describen algunos de los más relevantes.

a) Características de los componentes seleccionados

Las características del PCF y su variación en peso molecular influyen sobre el reparto de las macromoléculas, por un lado, modificando el diagrama de fases, y por otro, cambiando el tipo y la magnitud de la interacción proteína-polímero. En general, el incremento del peso molecular del polímero provoca el desplazamiento del equilibrio de reparto hacia donde dicho polímero se encuentra en menor concentración (Abbott, N L, Blankschtein, and Hatton 1990). Esto se puede deber al efecto del volumen excluido el cual es ocasionado por el aumento de la masa molar o concentración del polímero producen la expulsión de la biomolécula a la otra fase. Este fenómeno también se ve más pronunciado cuanto mayor es el tamaño de la proteína.

b) Composición del SBA o longitud de la línea de unión

La longitud de la línea de unión (LLU) indica directamente la cercanía al punto crítico. Dado que en este punto las composiciones de las fases en equilibrio son similares,

los solutos no presentan preferencias de reparto y sus K_{rs} generalmente son cercanos o igual a la unidad. A medida que aumenta la LLU, cada fase se va enriqueciendo en uno de los dos componentes del sistema. En consecuencia, las proteínas mostrarán comportamientos diferentes de reparto dirigiéndose hacia una de las dos fases preferentemente, según su afinidad relativa por los polímeros de fase, haciendo que K_r disminuya o aumente según cada macromolécula en particular.

c) Tamaño de la biomolécula

Pequeñas moléculas como aminoácidos, azúcares de bajo peso molecular o ácidos orgánicos en general se reparten similarmente entre ambas fases mientras que en el caso de moléculas más grandes (ADN y proteínas de alto peso molecular) el equilibrio de reparto está más desplazado hacia una de las fases. Trabajos previos empleando sistemas polímeros/sal han mostrado que cuanto mayor es el PM de la proteína, más desplazado hacia la fase pobre en polímero se encuentra el equilibrio de reparto. Este comportamiento podría deberse a un fenómeno de mutua exclusión polímero-proteína altamente dependiente del tamaño de ambos.

d) Fuerza iónica

La adición de sales como NaCl, puede aumentar la diferencia de hidrofobicidad entre las fases, el balance de hidrofóbico/hidrofílico y la carga de los compuestos son importantes. El efecto de *salting out* debido al aumento de la concentración de sal, resultando la disminución de la solubilidad de las biomoléculas en la fase rica en sal, y consecuentemente, la migración de las biomoléculas a la fase opuesta.

En la Figura 1.15 se diagrama el enfoque práctico para el diseño de procesos de extracción utilizando SBA para la recuperación de biomoléculas, se divide en cuatro etapas principales, la etapa (1) es la caracterización fisicoquímica inicial de la materia prima, es decir, identificar el producto y los contaminantes principales, el peso molecular y el punto isoeléctrico. La etapa (2) es la selección del tipo SBA, entre polímero-sal, polímero-polímero. La etapa (3) es la selección de parámetros del sistema como el peso molecular del polímero, la longitud de la línea de unión, la relación de volúmenes de fase y el pH, para lograr una separación selectiva. Si la recuperación del producto no es aceptable o es baja después de una evaluación de los parámetros del sistema, se debe cambiar el tipo de SBA. Por otro lado, si la recuperación es aceptable o lo suficientemente alta, se pasa a la etapa (4) donde se realiza la evaluación de la influencia de los parámetros del proceso en el rendimiento y pureza del producto, es decir, la cantidad de muestra, adición de sales neutras u otros productos químicos, etapas extracción consecutivas, geometría del sistema,

reciclaje de materiales, concentración de biomasa. Al finalizar se obtiene un proceso optimizado de extracción utilizando SBA con alta relación de rendimiento y pureza (Benavides and Rito-Palomares 2008).



Figura 1.15: Representación simplificada de la estrategia propuesta para desarrollo y diseño del proceso de purificación de biomoléculas utilizando SBA adaptado de (Benavides and Rito-Palomares 2008).

1.10. Interacción de SBAs con otras técnicas de purificación

La asociación de diferentes operaciones unitarias en el diseño de un proceso integrado de purificación se realiza de manera tal que las condiciones de salida de una determinada operación unitaria se puedan usar directamente como entrada para la siguiente operación unitaria, eliminando así la necesidad de acondicionar la muestra previamente. Se puede realizar la integración de SBAs con cromatografías de interacción hidrofóbica o de intercambio iónico como se representa en la Figura 1.16.

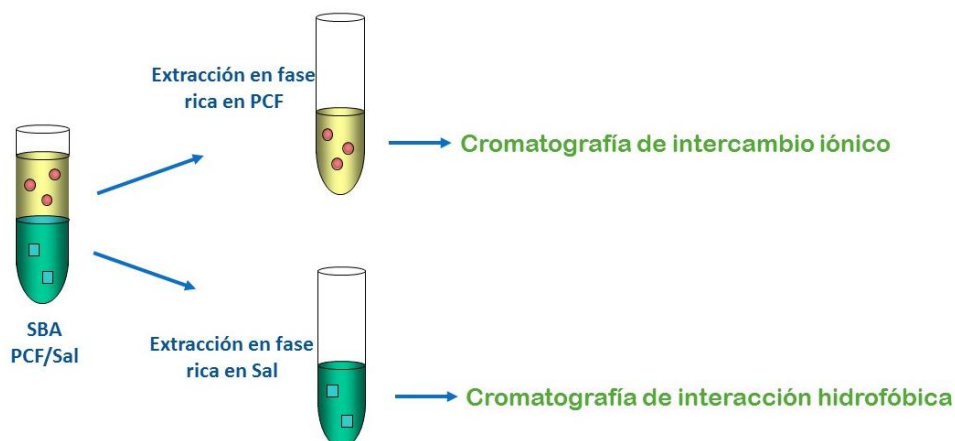


Figura 1.16: Representación gráfica de la integración de SBAs con diversas cromatografías.

En un SBA compuesto por PCF y sal, si la proteína de interés reparte hacia la fase inferior rica en sal, la misma puede cargarse directamente en una columna de interacción hidrofóbica, dada la alta concentración de la sal presente en esta fase, para mejorar aún más la purificación. En general, las proteínas se unen a esta columna a una alta concentración de sal, y su elución se realiza con una disminución de la concentración de sal.

Mientras que, cuando la proteína de interés se reparte hacia la fase superior rica en polímero, se puede acoplar, dependiendo de las características de la proteína, la cromatografía de intercambio catiónico o aniónico. La primera, retiene cationes cargados positivamente debido a que la fase estacionaria muestra un grupo funcional cargado negativamente y la segunda retiene aniones usando grupos funcionales cargados positivamente. En ambos casos, la fuerza de interacción entre la proteína y la fase estacionaria dependerá de una serie de factores como el tipo de ligando inmovilizado en la matriz (lo cual determina la selectividad de la columna), el grado de sustitución de ligando en la matriz (que influye en la capacidad de unión), la matriz utilizada o las condiciones de trabajo como pH, temperatura y la concentración salina. En este caso, la concentración salina de la fase móvil debe ser lo suficientemente baja ya que la afinidad de las proteínas por la resina de intercambio disminuye al aumentar la fuerza iónica de la fase móvil, de hecho esta propiedad es utilizada como un método para eluir las proteínas de la columna (Healthcare 2016).

Al utilizar un proceso de múltiples etapas, es posible lograr un proceso más efectivo en términos de selectividad, purificación y rendimiento (Bernardo, Azevedo, and Aires-Barros 2014).

CAPITULO 2 - Objetivos

2.1. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es desarrollar una plataforma tecnológica sostenible de producción de enzimas hidrolíticas, empleando el hongo filamentoso *Aspergillus niger* y sustratos de base lignocelulósica.

2.2. Objetivos específicos

Para el logro del objetivo general del trabajo se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- *Estimar la potencialidad de diferentes sustratos (desechos agrícolas y agroindustriales) para producir las enzimas hidrolíticas que componen los complejos xilanolítico, celulolítico, amilolítico y pectínolítico, usando el hongo Aspergillus niger mediante fermentación en estado líquido y sólido.*

Se determinará la actividad enzimática en los sistemas fermentativos sumergidos y sólidos en los que se emplearan once diferentes sustratos lignocelulósicos. Se analizarán los resultados obtenidos y se vincularán con la regulación enzimática, el tipo de fermentación, la relación entre los diferentes complejos enzimáticos.

- *Optimizar las condiciones de fermentación mediante un diseño estadístico experimental.*

Mediante la utilización de arreglos experimentales adecuados que permitan el uso de herramientas estadísticas rigurosas, se cribarán las variables que afecten significativamente la producción de enzimas hidrolíticas y se modelarán las respuestas (actividad específica de las enzimas xilanolíticas y relación entre la actividad de las enzimas xilanolíticas respecto a la celulolíticas). Se determinarán las condiciones óptimas que permitan maximizar la recuperación las enzimas xilanolíticas en el extracto enzimático minimizando las del complejo celulolítico.

- *Caracterizar el extracto enzimático optimizado.*

Se determinarán parámetros fisicoquímicos, cinéticos y composición proteica por GCMasa, entre otros. Se analizarán los resultados obtenidos, los efectos observados en presencia de ciertas sales, cosolutos, variaciones de pH y temperatura que permitan su estabilización y el empleo de determinadas estrategias bioseparativas para la purificación de las enzimas xilanolíticas.

-Definir los factores que permitan seleccionar las técnicas más adecuadas para el diseño de una estrategia bioseparativa.

Se analizarán los factores más relevantes del proceso de purificación de la extracción líquido-líquido empleando sistemas bifásicos acuosos formados por polímeros de cadena flexibles (PCF) y sales, la naturaleza de los PCFs y sales, composición inicial, variación de la fuerza iónica y relación de volúmenes de fases. Además, se evaluará la purificación empleando columnas de interacción iónica, la naturaleza de la columna (aniónica o catiónica), tipos de columnas, *buffers* de elución, tiempos de elución, tipos y concentraciones de gradientes de elución, etc., Del análisis de los mismos se podrá definir las condiciones que maximicen la extracción de las enzimas del complejo xilanolítico y minimicen las del complejo celulolítico.

-Diseñar una estrategia bioseparativa integradora para la purificación de las enzimas xilanolíticas.

En base a los resultados obtenidos a partir de los objetivos específicos precedentes, se propondrá y llevará a cabo un proceso extractivo sobre el extracto enzimático optimizado. El mismo se evaluará con los parámetros de purificación definidos. Se compararán los resultados con los obtenidos por una estrategia convencional a fin de concluir sobre las fortalezas y debilidades de la metodología propuesta.

-Aplicar el extracto enzimático optimizado y las enzimas purificadas para determinar su efectividad.

Se analizará la efectividad tanto del extracto enzimático optimizado como del extracto purificado en la sacarificación de cascarilla de soja y en la elaboración de panificados a base de harina de trigo.

CAPÍTULO 3 - Materiales y Métodos

3.1. Materiales

Todas las soluciones fueron preparadas con drogas de calidad analítica provistas por la empresa Cicarelli, aquellas que fueron adquiridas a otras compañías se encuentran indicadas en cada caso particular.

a) Buffers

En la preparación de los diferentes *buffers* se utilizó: hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), cloruro de sodio (NaCl), sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), y los siguientes reactivos adquiridos a la compañía Sigma Aldrich: ácido cítrico (C₆H₈O₇), fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), ácido ortofosfórico (H₃PO₄), ácido acético glacial (CH₃COOH) y Tris(hidroximetil)aminometano ((HOCH₂)₃CNH₂, Tris).

b) Medios de cultivos

Agar papa glucosado (Britania) y las sales: KH₂PO₄, nitrato de sodio (NaNO₃), sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O), cloruro de calcio (CaCl₂), sulfato de hierro heptahidratado (FeSO₄.7H₂O), sulfato de manganeso monohidratado (MnSO₄.H₂O), cloruro de cobalto (CoCl₂) y sulfato de zinc (ZnSO₄).

c) Sustratos lignocelulósico

Se emplearon los siguientes sustratos de base lignocelulósica (desechos agrícolas y agroindustriales): aserrín y viruta de maderas de *Pinus* y *Cabralea oblongifoliola* comúnmente llamadas Pino y Cancharana (Aserradero Mattio S.R.L.), cáscara de soja (Molinos Río de la Plata S.A.) cáscara de naranja (Verdulería Morango), cáscara de maní (origen Posadas, Dietética Alberdi), salvado de trigo (S.A.), salvado de avena (Schatzi S.A.), cáscara de semillas de girasol (Dietética Alberdi), cebada (Schatzi S.A.), harina de vino (Bodegas Salentein, Valle de Uco) y afrechillo de trigo o subproducto de la industria harinera (OS S.A. Molinos Venado Tuerto).

d) Enzimas

Endo-1,4-β-xilanasas (E.C.3.2.1.8) y endo-1,4-β-glucanasas (E.C.3.2.1.4) de *Aspergillus niger* fueron adquiridas a Megazyme Ltd. (Irlanda) a través Granotec S.A., distribuidor oficial en Argentina.

e) Polímeros de cadena flexible

UCON 50-HB-5100 (EO50PO50) de peso molecular promedio 4000 y calidad analítica fue provisto por Union Carbide (New York, USA.); polietilenglicoles (PEGs) de peso molecular promedio: 600; 1450; 2000 y 4600 (PEG600, PEG1450, PEG2000, PEG4600) de calidad analítica se adquirieron a Sigma Aldrich.

f) Reactivos para la determinación de actividad enzimática, proteínas totales, azúcares, citrato y PEG.

Se empleó xilano de madera de haya, carboximetilcelulosa, pectina, ácido 3,5 dinitrosalicílico de Sigma Aldrich y además hidróxido de sodio (NaOH) y tartrato de sodio y potasio (Sal de Rochelle - $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

La glucosa se determinó mediante el empleo del kit comercial Glicemia enzimática AA de Wiener Lab y para la determinación de xilosa se utilizó floroglucinol (Sigma Aldrich).

Las curvas de calibración se realizaron con D-xilosa, glucosa y ácido glucurónico adquiridos en Sigma Aldrich.

La actividad α -amilasa se determinó mediante el empleo del kit comercial Amilase 405 de Wiener Lab.

Los reactivos utilizados para la determinación de proteínas totales solubles fueron: bicarbonato de sodio (NaHCO_3), carbonato de sodio (Na_2CO_3), hidróxido de sodio (NaOH), tartrato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) y sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Además, se empleó ácido bicinconínico y albúmina sérica bovina como estándar (Sigma Aldrich).

La concentración de citrato se determinó mediante el empleo del Kit de Boehinger Mannheim/ R- Biopharm. Ref 1013907635. En la determinación de PEG se empleó ferrotiocianato de amonio ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SCN})_4$) y cloroformo.

g) Microorganismo

Para este trabajo de tesis se utilizó la cepa de *Aspergillus niger* NRRL3 cedida por el Centro Nacional para la Investigación de la Utilización Agrícola de Estados Unidos.

h) Soluciones para electroforesis

Se emplearon Temed, metanol y ácido acético glacial, y los siguientes reactivos adquiridos a Biorad: acrilamida, SDS, glicina, bromofenol blue. Además, se utilizó Coomassie brilliant blue (Biopack) y Tris (Sigma).

i) Panificación

Se utilizaron harina de trigo 000 de OS S.A. Molino Venado Tuerto, levadura seca activa Okedo Instant (Puratos), mejorador de panadería Toupan 4x4 (Puratos), enzima comercial Multizyme XT (Nutring) y sal de mesa (Dos Anclas).

j) Equipamiento

Se ha empleado el siguiente equipamiento: pHmetros (BOECO BT 600 y Hanna HI 9017), campana de flujo laminar vertical (Miniflo Due, pbi-brand), estufa de cultivo (San Jor SLDB), micropipetas (BOECO, Hamilton), baños termostáticos (Vicking Masson D), baño seco (Labnet), agitador orbital (BOECO), agitador magnético (BOECO), espectrómetro (BOECO S20), homogeneizador (Bioelec), espectrofotómetro UV-Visible (Jasco V-530), espectrofotómetro lector multiplaca (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific Corporation) operado mediante el software SkanIt 3.2 (Thermo Fisher Scientific Corporation), electroforesis (BIO-RAD Mini-PROTEAN 3 Cell), microscopio (BOECO), centrífuga (Sigma y Presvac), molinillo (Tecno Dalvo), liofilizador (Liotop), cromatógrafo líquido AKTApriime Plus (GE Healthcare), autoclave eléctrico (Ficoinox), balanza analítica (OHAUS) y Conductímetro (Horiba).

3.2. Metodología

3.2.1. Producción de las enzimas hidrolíticas mediante fermentación fúngica utilizando sustratos lignocelulósicos

3.2.1.1. Preparación de los sustratos lignocelulósicos

Para la producción fúngica de enzimas se utilizaron sin lavado previo y como única fuente de carbono, once sustratos lignocelulósicos (SL) de diferente naturaleza (desechos agrícolas y agroindustriales), los que se indican en la Tabla 3.1. Todos los sustratos, con excepción de la viruta de pino y Cancharana, fueron molidos con molinillo, tamizados para obtener tamaños de partículas homogéneos menores a 20 mesh y finalmente almacenados en bolsas plásticas con cierre hermético a temperatura de -20°C.

El tratamiento alcalino de los sustratos se realizó por inmersión de los mismos en solución de NaOH 0,1 N, 0,5 N y 1 N y posteriormente autoclavados por 30 min a 120°C. Una vez enfriadas las muestras, se neutralizaron con solución de HCl 3 N se lavaron con *buffer* fosfato de potasio (*buffer* KPi) 50 mM pH 6,00 y finalmente fueron filtradas con tela tafeta de poliéster. Los sustratos sólidos fueron recuperados, secados a 30°C hasta pesada

constante y guardados en bolsas plásticas con cierre hermético a temperatura de -20°C hasta su uso (Goyal et al. 2008).

Tabla 3.1: Sustratos lignocelulósicos utilizados y la simbología empleada para identificarlos.

Sustratos lignocelulósicos	Símbolo
Aserrín de madera de Pino y Cancharana	A
Viruta de madera de Pino y Cancharana	V
Cáscara de Soja	CS
Cáscara de Naranja	CN
Cáscara de Maní	CM
Salvado de Trigo	ST
Salvado de Avena	SA
Cáscara de semillas de Girasol	CG
Cebada	C
Harina de Vino	HV
Afrechillo de trigo	AT

3.2.1.2. Preparación de inóculos

La cepa fúngica de *A. niger* NRRL3 solubilizada en glicerol fue fraccionada en crioviales y conservadas a -80°C . La propagación se realizó por triplicado en Erlenmeyer de 250 mL en medio rico con agar papa glucosado (APG) el cual permite el crecimiento de este tipo de hongos filamentosos. Se disolvieron 1,17 g de APG en 30 mL de agua destilada y se autoclavó a 121°C y 15psi por 20 minutos. Una vez preparados y esterilizados los medios se inocularon 50 μL de la cepa madre de *A. niger* en condiciones de esterilidad y se llevaron a estufa a 30°C durante 5 días hasta que el desarrollo del micelio cubriera toda la superficie del medio de cultivo.

Finalizado el período de incubación, se resuspendieron los conidios agregando 15 mL de glicerol al 20% en un agitador magnético por un período de 15 minutos. El contenido se recolectó en tubos Falcon de 15 mL de capacidad y se realizó el recuento de conidios presentes por mililitro en cámara Neubauer utilizando un microscopio binocular siguiendo la metodología de Porfirí (Porfirí et al. 2016). Se procedió a obtener una disolución stock de conidios de *A. niger*.

3.2.1.3. Fermentación en estado sumergido y sólido

En todos los sistemas fermentativos se agregó solución *buffer* de cultivo conteniendo las mismas sales y concentración que la formulación del medio optimizado por Mandel para la producción de xilanasa por *A. niger* utilizando como fuente de carbono xilano (Tabla 3.2) (Yuan et al. 2005).

Las fermentaciones sumergidas (FSm) se realizaron en matraz de Erlenmeyer de 250 mL a los que se agregó la cantidad adecuada de sustrato lignocelulósico y 100 mL de solución *buffer* de cultivo, dejándose en agitación orbital constante a 125 rpm. Los cultivos en estado sólido (FES) se realizaron en recipientes (canastillas de 5,5 cm de diámetro) de aluminio, estático, a los que se les agregó 5 mL de solución *buffer* de cultivo a fin de conservar una humedad favorable para el crecimiento de *A. niger*. Un volumen apropiado de suspensión madre de conidios se empleó como inóculo a las concentraciones finales de 10^6 conidios/mL para la siembra aséptica de cada uno de los sistemas fermentativos ensayados. Todos los sistemas se incubaron a temperatura constante de $30\pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días.

Tabla 3.2: Sales del medio de cultivo específico optimizado por Mandel para la producción de xilanasa por *A. niger* a pH 6 (Yuan et al. 2005).

MEDIO MANDEL	
Componentes	Concentración (g/L)
KH ₂ PO ₄	3,0000
NaNO ₃	3,0000
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5000
CaCl ₂	0,5000
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0075
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0025
CoCl ₂	0,0030
ZnSO ₄	0,0020

La recuperación de las proteínas secretadas por el hongo filamentoso en las FES se realizó con el agregado de 15 mL de *buffer* fosfato 50 mM pH 6,00, luego se agitó durante 15 minutos a 125 rpm para favorecer la extracción. En ambas fermentaciones, el extracto se obtuvo por filtración en tela tafeta y posterior centrifugación durante 5 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido considerado “extracto enzimático” se fraccionó y almacenó a -20°C para su empleo como fuente natural de enzimas.

minutos (Ishikawa et al. 1990). La concentración de CNP-G3 en el ensayo fue de 0,27 mM de modo de asegurar condiciones saturantes de sustrato. Se definió la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto.

3.2.4. Determinación de proteínas solubles extracelulares

El ensayo del ácido bicinconínico para la determinación de proteínas solubles totales (PT) fue descrito por Smith (Smith et al. 1985) y, al igual que el método de Lowry (Lowry et al. 1951), 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} . Este último reacciona con el ácido bicinconínico 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 debió ser determinado espectrofotométricamente en comparación con un estándar de concentración conocida.

Se preparó una solución con ácido bicinconínico al 1,00%P/V, tartrato sódico 0,16%P/V, Na_2CO_3 2,00%P/V, NaOH 0,4%P/V y NaHCO_3 0,95%P/V, llevándose a pH 11,20 con NaOH. También se preparó una solución de CuSO_4 al 4,00%P/V. La solución de trabajo se preparó mezclando la solución de ácido bicinconínico con una alícuota de CuSO_4 al 4%P/V en proporción 50:1 respectivamente. El protocolo se llevó a cabo colocando en cada pocillo de la microplaca 25 μL de muestra y luego agregando simultáneamente (en todos los pocillos) 200 μL de reactivo ácido bicinconínico de trabajo a cada uno, incubando 30 minutos a 37°C. La concentración de proteínas totales solubles en los extractos enzimáticos fue determinada empleando una curva de calibración de absorbancia a 562 nm en función de la concentración de albúmina sérica bovina expresada en mg/mL en el espectrofotómetro multiplaca.

3.2.5. Determinación de xilosa y glucosa

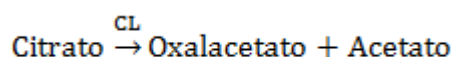
Para determinar la concentración de xilosa en solución, se procedió a colocar 1,5 ml del reactivo floroglucinol junto con 15 μL de extracto enzimático o solución de azúcar en un tubo tipo eppendorf de 2 mL (Eberts et al. 1979). Se calentó cada muestra exactamente por 4 minutos a 100°C, luego se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. Se midió la absorbancia del complejo xilosa-phloroglucinol a 554 nm y utilizando una curva de calibración de xilosa se determinó la concentración de dicho monosacárido.

La concentración de glucosa se determinó por el método enzimático descrito por Trinder (Trinder 1969). Se incubó un volumen apropiado de extracto o solución conteniendo el azúcar a determinar durante 10 minutos en baño de agua a 37°C, luego se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. Las medidas de absorbancia de quinonimina roja se realizaron espectrofotométricamente a 505 nm. La concentración de glucosa en la muestra desconocida se calculó con la siguiente ecuación:

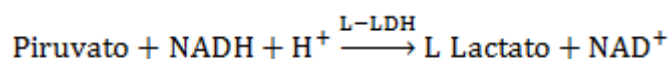
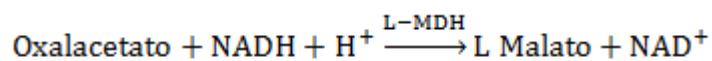
$$[\text{Glucosa}]_{\text{muestra}} = \text{Abs}_{\text{muestra}} \times \frac{\text{g/L}}{\text{Abs}_{\text{estándar}}}$$

3.2.6. Determinación de la concentración de Citrato

Para la determinación de Citrato se empleó un método enzimático. El citrato presente en la muestra es convertido a oxaloacetato y en acetato por la enzima citrato liasa (CL)



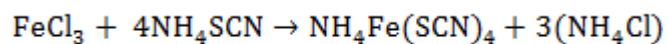
Por acción de las enzimas L-malato (L-MDH) y L-lactato (L-LDH) deshidrogenasa, el oxaloacetato y el producto de su decarboxilación, el piruvato, son reducidos en presencia del cofactor NADH a L-malato y L-lactato respectivamente:



La cantidad de nicotinamida adenina di nucleótico oxidada (NAD⁺), estimada mediante el cambio en la absorbancia a 340 nm (longitud de onda a la que absorbe el NADH), es estequiométricamente igual a la cantidad de citrato presente en la muestra. La recta de calibrado se obtuvo preparando cinco concentraciones diferentes del patrón citrato, equiespaciadas, cada una por triplicado.

3.2.7. Determinación de la concentración de PEG

Se empleó un ensayo colorimétrico (Nag, Mitra, and Ghosh 1996) basado en la propiedad del PEG de desplazar el equilibrio de reparto de un cromóforo presente en una solución acuosa de ferrotiocianato hacia una fase clorofórmica. La solución de ferrotiacinato de amonio fue preparada disolviendo cloruro férrico (FeCl₃) y tiocianato de amonio (NH₄SCN) en agua destilada.



El cromóforo, $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SCN})_4$, presente en la solución acuosa puede ser extraído con cloroformo en presencia de PEG. Esto es posible debido a que este PCF tiene la propiedad de ser altamente soluble en agua y en la fase orgánica por su naturaleza anfipática, por lo tanto, puede solvatar al cromóforo y llevarlo a la fase clorofórmica. En dicha fase el $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SCN})_4$, presenta un color rosa-púrpura que absorbe luz a 510 nm y cuya intensidad directamente proporcional a la concentración de PEG.

Para la determinación, se tomaron 50 μL de cada una de las soluciones conteniendo PEG y se le adicionaron 2,50 mL de la solución de ferrotiocianato de amonio y 2,50 mL de cloroformo. Se agitó vigorosamente durante 30 minutos, se centrifugó a 2000 rpm durante 2 minutos y posteriormente se extrajo la fase inferior (clorofórmica) que posee el cromóforo solvatado por el polímero y se determinó la absorbancia a 510 nm.

Para la cuantificación del PEG en las distintas muestras se realizaron curvas de calibración con soluciones de PEGs de concentración 5%P/P. Se corroboró que la presencia de NaCit, azúcares y proteínas no interfiriera en el método.

3.2.8. Composición fisicoquímica de los sustratos lignocelulósicos

Se analizó el contenido de proteína cruda, nitrógeno no proteico, fibra de detergente neutro, fibra de detergente ácido y lignina de detergente ácido de la cascarilla de soja, salvado de trigo y afrechillo de trigo utilizando los métodos descritos por la Asociación Oficial de Química en Agricultura (AOAC) (Horwitz 2000). Las determinaciones se realizaron en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Argentina. Los porcentajes de hemicelulosa, celulosa y lignina se estimaron utilizando los métodos de Van Soest (Van Soest 1983). El peso seco se determinó agregando 1 g de SL en una termobalanza a 130°C hasta obtener un peso constante.

3.2.9. Diseño experimental

Para estudiar la influencia de diversos parámetros sobre la producción de enzimas con capacidad para hidrolizar celulosa y hemicelulosa vegetal, se desarrolló una estrategia de diseño de experimentos en cuatro etapas las que se detallan a continuación.

3.2.9.1. Planeamiento

El objetivo de esta primera etapa del diseño se enfocó en estimar la potencialidad de once diferentes sustratos de base lignocelulósica (desechos agrícolas y agroindustriales) los que se describieron en la Tabla 3.1, para ser empleados en la producción de enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular vegetal de los sustratos empleados, utilizando la especie fúngica *A. niger* NRRL3 mediante fermentación en estado sumergido y sólido. En esta etapa se evaluó la producción de enzimas xilanolíticas, celulolíticas, amilolíticas y pectinolíticas.

3.2.9.2. Cribado

A partir de los resultados obtenidos en la etapa de planeamiento, se seleccionaron como única fuente de carbono los SL: cascarilla de soja, salvado de trigo y afrechillo de trigo para la fermentación fúngica. Durante esta etapa, se analizaron los potenciales factores significativos que podrían afectar la producción de enzimas hidrolíticas con actividad xilanolítica y celulolítica.

Tabla 3.3: Factores y Niveles utilizados en el cribado mediante DFF (2^{5-1}) que afectan la producción de las EX y EC por *A. niger*.

Código	Factores	Símbolo	Unidad	Dominio experimental	
				Nivel (-)	Nivel (+)
X ₁	Gramos de SL	C	g	0,4	4,0
X ₂	Concentración de NaNO ₃	N	g/L	0,4	6,0
X ₃	Pre tratamiento alcalino de SL	NaOH	N	0	1
X ₄	pH del sistema	pH	-	3,50	6,50
X ₅	Volumen de solución de cultivo	Medio	mL	5	50

SL: sustrato lignocelulósico

Se analizó la cantidad de sustrato lignocelulósico, la cual varió manteniendo la concentración final de conidios constante (10^6 conidios/mL); la concentración de nitrógeno no proteico, mediante el agregado de NaNO₃; la necesidad de realizar pre tratamiento alcalino con NaOH; pH inicial del sistema y el tipo de fermentación (FSm y FS) analizado como una variable cuantitativa a través del volumen de la solución de *buffer* de cultivo. Se utilizó un Diseño Factorial Fraccionado (DFF) con cinco factores a dos niveles (2^{5-1}) uno inferior (-1) y uno superior (+1), los que se encuentran detallados en la Tabla 3.3. El tipo de sustrato lignocelulósico se analizó repitiendo el mismo diseño para cada sustrato.

La matriz de los tratamientos del DFF se muestra en la Tabla 3.4. La misma abarcó 18 experimentos, pertenecientes a la media fracción del diseño. Cada uno de los experimentos correspondió a un sistema fermentativo con una combinación de factores determinada, según se especifica en la matriz de tratamientos para analizar cuál o cuáles de los factores mejoraba la eficiencia de la fermentación.

Tabla 3.4: Matriz de tratamientos con niveles reales para el diseño estadístico DFF utilizados en el cribado.

Experimento	C (g)	N (g/L)	NaOH (N)	pH	Medio (mL)
1	4,0	0,4	0	6,50	50
2	0,4	0,4	0	6,50	5
3	0,4	0,4	0	3,50	50
4	4,0	6,0	0	3,50	50
5	0,4	0,4	1	6,50	50
6	4,0	6,0	0	6,50	5
7	4,0	0,4	1	6,50	5
8	0,4	6,0	1	3,50	50
9	4,0	6,0	1	3,50	5
10	4,0	0,4	0	3,50	5
11	0,4	0,4	1	3,50	5
12	0,4	6,0	1	6,50	5
13	0,4	6,0	0	6,50	50
14	0,4	6,0	0	3,50	5
15	4,0	6,0	1	6,50	50
16	4,0	0,4	1	3,50	50
17	0,4	6,0	0	3,50	5
18	4,0	0,4	0	6,50	50

Se determinaron las actividades xilanolíticas y celulolíticas, presencia de azúcares reductores y concentración de proteínas totales solubles para analizar los factores respuestas: actividad de las EX producida en la fermentación fúngica (Y1), la relación de actividad EX/EC (Y2) y la actividad específica de EX (Y3).

3.2.9.3. Optimización

Para estudiar las correlaciones entre los factores significativos y poder determinar el nivel óptimo de cada uno, se planteó una metodología de superficie de respuesta mediante un Diseño Central Compuesto (DCC) con tres factores: gramos de SL como fuente de carbono, concentración de NaNO_3 y volumen de solución de *buffer* de cultivo agregada. Se realizaron 20 experimentos totales, de los cuales seis fueron centrales (replicas) y seis axiales, utilizándose para la determinación de los puntos un $\alpha=1,68179$. En la Tabla 3.5 se resumen los factores y los cinco niveles empleados.

Tabla 3.5: Factores y dominio experimental del DCC para la optimización de los parámetros que afectan la producción de las EX y EC por *A. niger*.

Factores	Símbolo	Unidad	Dominio experimental (nivel)					
			-2	-1	0	+1	+2	
X ₁	Gramos de SL	C	G	0,1	0,829	1,9	2,97	3,7
X ₂	Concentración de NaNO_3	N	g/L	1	2,418	4,5	6,581	8
X ₅	Volumen de solución de cultivo	Medio	mL	5	14,121	27,5	40,878	50

SL: sustrato lignocelulósico

La Tabla 3.6 muestra la matriz de tratamientos que se llevó a cabo. Los niveles de cada uno de los factores a optimizar se seleccionaron ajustando el dominio experimental de acuerdo a los resultados obtenidos en la etapa de cribado. Se seleccionaron tres valores numéricos más: un punto medio entre ambos y dos puntos más que se calcularon en base al parámetro α de la ecuación. Al igual que en el cribado los factores respuestas analizados fueron: actividad de las EX producida en la fermentación fúngica (Y1), la relación de actividad EX/EC (Y2) y la actividad específica de EX (Y3).

Tabla 3.6: Matriz de tratamientos con niveles reales para el diseño estadístico DCC.

Experimento	C (g)	N (g/L)	Medio (mL)
1	3,7	4,5	27,5
2	0,829	6,581	14,121
3	1,9	4,5	5
4	1,9	4,5	27,5
5	2,97	2,418	40,878
6	1,9	4,5	27,5

7	1,9	4,5	27,5
8	2,97	6,581	14,121
9	1,9	8	27,5
10	1,9	1	27,5
11	1,9	4,5	27,5
12	1,9	4,5	27,5
13	2,97	6,581	40,878
14	1,9	4,5	27,5
15	2,97	2,418	14,121
16	1,9	4,5	50
17	0,829	2,418	14,121
18	0,1	4,5	27,5
19	0,829	6,581	40,878
20	0,829	2,418	40,878

3.2.9.4. Validación

A partir de cinco réplicas del máximo optimizado, se buscó comprobar la robustez de las condiciones óptimas conseguidas.

3.2.10. Escalado de la fermentación

El escalado de la fermentación se realizó conservando constante la relación geométrica y el diámetro/altura del líquido en matraces Erlenmeyers de volúmenes 250, 500, 2000 y 5000 mL. Además, se mantuvieron las proporciones de solución de *buffer* de cultivo, SL y conidios inoculados respecto a la fermentación optimizada. El escalado se llevó a cabo cultivando el micelio a 30°C en agitación (125 rpm) por 96 hs. Los volúmenes efectivos fueron 60, 120, 600 y 1200 mL. En todos los casos se determinó la actividad xilanolítica y celulolítica como así también proteínas totales solubles y concentraciones de azúcares reductores según se describió precedentemente.

3.2.11. Análisis de diferentes parámetros sobre la estabilidad de las enzimas hidrolíticas del extracto enzimático optimizado

3.2.11.1. Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las EX fue analizado incubando el extracto enzimático optimizado (EEO) a 20, 30, 40, 50 y 60°C, por un periodo de 110 días, recolectándose alícuotas periódicamente. Se calcularon los parámetros cinéticos termodinámicos relacionados con dicha actividad los que se describen en la siguiente tabla:

Tabla 3.7: Parámetros cinéticos termodinámicos determinados para las EX.

Parámetro	Símbolo	Ecuación
Constante de inactivación térmica	K_d	$\ln(A/A_0) = -K_d \times t$
Tiempo de vida media	$t_{1/2}$	$t_{1/2} = \ln(2) / K_d$
Tiempo reducción decimal	D	$D = \ln(10) / K_d$
Temperatura necesaria para reducir D un ciclo logarítmico.	Z	$\log(D) = (-1/Z) \times T$
Energía de desnaturalización	E_d	$\ln(K_d) = -E_d / (R \times T) + cte$
Cambio en Entalpía	ΔH°	$\Delta H^\circ = E_d - (R \times T)$
Cambio en Energía libre	ΔG°	$\Delta G^\circ = -RT \ln(K_d \times h / K_B \times T)$
Cambio en Entropía	ΔS°	$\Delta S^\circ = (\Delta H^\circ - \Delta G^\circ) / T$

donde D es el tiempo reducción decimal para lograr mantener el 10% de actividad residual, A_0 es la actividad inicial (U/mL), A es la actividad residual (U/mL), t es el tiempo (minutos), T es la temperatura (°K), R es la constante de los gases (8,314 J/mol K), h es la constante de Planck ($11,04 \times 10^{-36}$ J min) y K_B constante de Boltzman ($1,38 \times 10^{-23}$ J/K).

3.2.11.2. Efecto del pH

Se estudió el efecto del pH sobre la estabilidad de las EX y EC del EEO, incubando durante 72 horas a 20°C un volumen de 2,50 mL del EEO en el mismo volumen de diferentes soluciones amortiguadoras, las que se describen en la Tabla 3.8. Se recolectaron alícuotas de cada uno de los sistemas a los siguientes tiempos: 0,5, 24, 48 y 72hs. Posteriormente se realizaron las determinaciones de actividad enzimática.

Tabla 3.8: Soluciones amortiguadoras empleadas en el análisis de la estabilidad enzimática mediante variación del pH.

Buffer	pH
Citrato de sodio	3,00; 4,00; 5,00; 6,00
Fosfato de potasio	7,00 y 8,00
Tris	9,00

3.2.11.3. Efecto sales inorgánicas

Se incubó el EEO en presencia de diferentes sales durante 30 minutos a 20°C. Las sales utilizadas a concentración final de 0,1M fueron: CaCl₂, NaCl, KCl, CoCl₂, (NH₄)₂SO₄, MnSO₄, CuSO₄ y FeSO₄. Las actividades de las EX y EC sobre el EEO y un control sin agregado de sal se determinaron a los 5, 13 y 30 minutos de incubación.

3.2.11.4. Efecto de estabilizantes

Los estabilizantes Glicerol y Betaína (cada uno en dos proporciones 5 y 10 %P/P), Polivinilpirrolidona y Dextrano (1 %P/P) fueron agregados en forma sólida a 10 ml de EEO. Los resultados fueron referidos a la muestra control del EEO que se incubó en las mismas condiciones en ausencia de estabilizante, diluyéndolo con agua destilada de modo que todas las muestras tuvieran la misma actividad enzimática inicial. La incubación se realizó por un período de 34 días a 20°C. En todos los casos, se recolectaron alícuotas periódicamente y, se realizaron las determinaciones de actividad enzimática y azúcares reductores.

3.2.11.5. Efecto de la Fase superior e inferior de SBA UCON/NaCit y PEG1450/NaCit

Se preparó un sistema bifásico compuesto por UCON 15%P/P y NaCit 7%P/P a 25°C, luego de alcanzar al equilibrio de separación, ambas fases fueron recuperadas. De acuerdo al diagrama de fases, la composición de la fase superior fue 34,8%P/P de UCON y 1,74%P/P de NaCit, y de la fase inferior fue 0,4%P/P UCON y 10,87%P/P NaCit (Tubio et al. 2009). También se preparó un sistema bifásico compuesto por PEG1450 15,5%P/P y NaCit 13,6%P/P a 25°C. De acuerdo al diagrama de fases, la composición de la fase superior fue 33,35%P/P de PEG1450 y 4,81%P/P de NaCit, y la de la fase inferior 2,05%P/P PEG1450 y 20,29%P/P NaCit (Tubio, Pellegrini, Nerli, and Pico 2006). Se incubó una concentración de 12,5 mg/mL del EEO en las soluciones de fase superior e

inferior, y se evaluó la estabilidad en cada una de ellas durante 27 días, tomándose alícuotas en forma periódica y determinándose las actividades de las EX y EC.

3.2.12. Determinación de los parámetros cinéticos de las EX y EC del extracto enzimático optimizado

Se determinaron los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y K_m aparentes para las EX y EC del EEO, y se compararon con los de las enzimas endo- β -1,4-xilanasas y endo- β -1,4-glucanasas comerciales de la misma fuente fúngica provistas por la empresa Megazyme. Se realizaron mediciones de actividad a diferentes concentraciones de xilano de haya hasta 20 mg/mL o carboximetilcelulosa hasta 36 mg/mL según corresponda, preparados en *buffer* NaCit 50 mM a pH 5,30. Posteriormente se realizaron las determinaciones de actividad. Se analizó la actividad vs concentración de sustratos y la doble recíproca, realizando el ajuste mediante los modelos de Michaelis-Menten y Lineweaver- Burk.

3.2.13. Precipitación salina

El extracto enzimático de *A. niger* previamente optimizado en este trabajo de tesis, se sometió a precipitación fraccionada y consecutiva del 20, 40, 60 y 80% de sulfato de amonio. Al EEO se agregó la sal en forma de droga sólida hasta alcanzar el porcentaje de saturación deseado y se homogeneizó durante 10 minutos a 4°C en baño termostático. Durante todo el proceso se controló el pH y fue corregido a 6,60 con una solución de NaOH concentrada. Finalizada la precipitación se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C en centrífuga refrigerada. La fracción precipitada fue posteriormente resuspendida en 1 mL de agua destilada. Al sobrenadante se le agregó nuevamente sal para llegar a la siguiente concentración de saturación, repitiendo el procedimiento de precipitación sucesivamente para las cuatro concentraciones de sal.

Además, se realizó la precipitación directa de proteínas del EEO al 80% de sal. Al EEO se agregó la sal en forma de droga sólida hasta alcanzar el 80% de saturación, y se procedió como se indicó precedentemente.

Cada una de las fracciones fue dializada empleando dispositivos de filtro centrífugo de 3KDa Amicon® ultra-4 (Merck Millipore, Irlanda) a 4°C durante 2 horas para realizar las medidas de actividad sin interferencias debido a la presencia de la sal. Luego a cada fracción se determinó actividad xilanolítica y celulolítica y la concentración de proteínas solubles totales, verificándose además mediante SDS-PAGE.

3.2.14. Extracción por Sistemas bifásicos acuosos

3.2.14.1. Preparación de SBAs

Se evaluó la recuperación de las EX a partir del EEO, el cual se empleó sin tratamiento previo. Se trabajó con dos esquemas diferentes, el primero consta de SBAs individuales PCF/sal y el segundo de dos pasos de extracción consecutivos y combinados.

Las extracciones de las EX mediante SBA individuales se realizó por mezcla directa del EEO y los polímeros UCON 50-HB-5100 y PEG de peso molecular 600, 1450, 2000 y 4600, y solución de las sales NaCit al 25%P/P o KPí 20%P/P pH 5,20 variando la relación de volúmenes de fases superior e inferior (V_{sup}/V_{inf}), la longitud de línea de unión (LLU) de 25, 35 y 45 %P/P y fuerza iónica por incorporación de diferentes concentraciones de NaCl en los casos que correspondiera. Los sistemas se prepararon en tubos cónicos plástico tipo Falcon de 50 mL. Las composiciones de las fases de los sistemas fueron estimadas a partir de diagramas binodiales bibliografiados (D. B. D. B. Loureiro, Romanini, and Tubio 2016; Tubio et al. 2009; Tubio, Pellegrini, Nerli, and Picó 2006) y corroborados por la determinación de NaCit descrita en la sección 3.2.6.

Los SBAs preparados fueron homogeneizados por 15 minutos en agitación rotatoria vertical a 15 rpm con homogeneizador y posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm de modo que alcancen el equilibrio de separación de fases a temperatura controlada y constante ($22\pm 1^\circ\text{C}$). Finalmente se separaron las fases superior e inferior (FS e FI) de cada uno de los sistemas.

Por otra parte, para el esquema de extracción de las EX en dos pasos consecutivos se procedió como se describe a continuación:

La primera extracción se realizó por mezcla directa de UCON sólido, solución de NaCit al 25%P/P y EEO a pH 5,20; para formar un SBA con una composición inicial seleccionada de UCON y NaCit y LLU de aproximadamente 35%P/P, en tubo cónico plástico tipo Falcon de 50 mL. Los SBAs se homogeneizaron y separaron las fases. Luego se determinó la concentración de ácido cítrico en fase inferior del SBA UCON/NaCit como se describió precedentemente. Se agregó solución de NaCit al 25 %P/P y PEG1450 sólido para completar las concentraciones totales requeridas para preparar un segundo sistema PEG1450/NaCit de composición inicial definida. Alcanzado el equilibrio de reparto del segundo sistema se separaron las fases.

En todos los casos las extracciones se realizaron por triplicado y la estimación visual de los volúmenes de FS y FI se realizó en tubos de vidrio graduados marca IVA. En cada

una de las fases de los sistemas se determinó actividad enzimática xilanolítica y celulolítica, presencia de pigmentos, concentración de azúcares reductores y de proteínas solubles totales

Determinación del coeficiente de reparto y la capacidad separativa

Como se definió en la introducción, el coeficiente de reparto de una proteína se determina a partir del cociente de las concentraciones proteicas (o alguna propiedad directamente proporcional a ella) en las FS y FI respectivamente luego de alcanzado el equilibrio de reparto (Ecuación 1).

Es importante también analizar la capacidad separativa (β). El mayor alejamiento de este parámetro respecto de la unidad es un indicador de la capacidad que presenta un sistema de separar las enzimas de un complejo respecto del total de proteínas o de las enzimas que conforman otro complejo presente en la muestra. La misma se calculó como el cociente de los respectivos coeficientes de reparto (K_r) (Ecuación 2).

$$\beta_{EX/EC} = \frac{K_{rEX}}{K_{rEC}} \quad \circ \quad \beta_{EX/PT} = \frac{K_{rEX}}{K_{rPT}} \quad \text{Ecuación 2}$$

3.2.14.2. Perturbación de los espectros de absorción

Se obtuvieron los espectros de absorción de las soluciones proteicas del EEO y de las FS y FI del sistema UCON/NaCit con y sin EEO entre 350-700 nm en medios conteniendo *buffer* fosfato de potasio 50 mM pH 7,40. Los espectros de absorción fueron obtenidos empleando un espectrofotómetro Jasco V-530 con un ancho de banda de 2 nm y una velocidad de barrido de 200 nm/min, con tres ciclos repetitivos. Todas las medidas fueron realizadas termostalizando la cubeta a $21 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

3.2.14.3. Determinación de la temperatura de separación de fases (TSF) de soluciones de UCON

Se determinó la temperatura de separación de fase (TSF) de soluciones de UCON de concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, y 30% P/P y FS del sistema UCON/NaCit. En todos los casos, las soluciones fueron calentadas a velocidad constante de $1^\circ\text{C}/\text{min}$. La aparición de turbidez, señal indicativa del comienzo de la separación de fases, fue detectada por medidas de absorbancia a 600 nm. La TSF se estimó como la abscisa de la intersección entre la recta tangente a la curva absorbancia (600 nm) vs temperatura en su punto de inflexión y la recta que se obtiene en el tramo inicial del calentamiento previo a la separación de fases (Alexandridis, Holzwarth, and Hatton 1994).

Las medidas de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro UV-visible Jasco V-630 BIO con celda Peltier Jasco EH716 con agitación que permite obtener un gradiente lineal temperatura-tiempo.

3.2.15. Cromatografía

Se realizaron cromatografías de intercambio iónico utilizando un cromatógrafo AKTA prime Plus GE Healthcare. En cada caso, se cargó una muestra de 0,1 o 0,5 mL de endo- β -1,4-xilanasa comercial, EEO y FS rica en PEG1450 del sistema combinado (UCON/NaCit- PEG1450/NaCit).

Se emplearon las columnas catiónicas HiTrap SP FF y HiTrap SP XL (HiTrap IEX Selection Kit, GE Healthcare), las cuales se equilibraron con *buffer* A acetato de sodio 20mM pH 4,30 y eluyeron con *buffer* B acetato de sodio 20 mM con NaCl 1M, pH 4,30 y 5,00.

En las cromatografías de intercambio aniónico se utilizaron las columnas HiTrap DEAE FF y HiTrap Q XL (HiTrap IEX Selection Kit, GE Healthcare), se equilibraron con *buffer* A Tris 20mM y eluyeron con *buffer* B Tris 20mM NaCl 1M, a pH 7,50; 8,00 y 8,50. En todos los casos se emplearon columnas de 1mL de capacidad (GE Healthcare) y el caudal fue de 1 mL/min. Se recolectaron las fracciones cada 1 mL.

3.2.16. Determinación del rendimiento y factor de purificación

A partir de los resultados obtenidos aplicando los distintos métodos de purificación, se calcularon los parámetros rendimiento (%R) y factor de purificación (FP) en cada etapa, y se realizó la tabla de purificación. Estos indicadores fueron calculados según las siguientes ecuaciones:

$$\%R = \frac{\text{Actividad total en la etapa de purificación}}{\text{Actividad total en el extracto inicial}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

$$FP = \frac{\text{Actividad específica en la etapa de purificación}}{\text{Actividad Específica en el extracto inicial}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

3.2.17. Electroforesis en medio desnaturizante

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida utilizando equipos Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). Se utilizaron geles al 12,5% de una solución acrilamida: bisacrilamida en una relación 30:0,8. Las muestras proteicas fueron incubadas en baño de ebullición durante 5 min en una solución de desnaturización conteniendo

2%P/V SDS; 10%V/V glicerol; 5%V/V β -mercaptoetanol; 0,02 mg/mL azul de bromofenol; y posteriormente sembradas en los geles. Las corridas electroforéticas fueron realizadas con una intensidad de corriente constante de 25 mA. La solución *buffer* de corrida fue: 3 g/L de TRIS, 18,8 g/L de Glicina y 1 g/L de SDS. Luego de la electroforesis, las proteínas fueron teñidas utilizando una solución de 0,1%P/V Azul de Coomassie R250 en una relación de etanol:ácido acético:agua en una relación de 50:7:43. Como marcadores de pesos moleculares se empleó el kit comercial Sigma Marker Molecular Weight, LowRange, el cual se sometió al mismo tratamiento que las muestras a analizar (Laemmli 1970).

Además, se realizó una tinción con nitrato de plata la cual permite detectar menores concentraciones de proteínas que la tinción con el colorante Coomassie Brilliant Blue (González-González, Mayolo-Deloisa, and Rito-Palomares 2012). El procedimiento para la tinción con nitrato de plata consta de seis etapas, en la primera se realiza la fijación de las bandas en el gel, incubándolo en una solución de ácido acético 12%V/V con metanol 50%V/V y formaldehído 0,05%V/V por 40 minutos. La segunda etapa es de lavado con una solución de etanol 30%V/V durante 30 minutos. La tercera etapa consiste en un pretratamiento que se realiza al resguardo de la luz. Para ello, se incubó el gel en una solución de tiosulfato sódico 0,03%P/V por 1 min, seguido de tres lavados con agua destilada milli-Q por 30 segundos. En la cuarta etapa se realizó la tinción con una solución de nitrato de plata 0,2%P/V y formaldehído 0,05%V/V durante 20 min al resguardo de la luz y luego se realizaron dos lavados con agua destilada milli-Q. La quinta etapa es para el revelado de las bandas, se incubó el gel en una solución de carbonato sódico 6%P/V y formaldehído 0,05%V/V durante 5 minutos. Finalmente se realizó la detención o stop, donde se agregó una solución de metanol 50%V/V y ácido acético 12%V/V.

Para analizar las muestras proteicas provenientes de la extracción por sistemas bifásicos acuosos, fue necesario previamente eliminar la sal y los polímeros. Las proteínas de las soluciones de FS y FI se precipitaron con el mismo volumen de ácido tricloroacético al 20%P/V, se incubó durante la noche a 4°C y centrifugó a 16.400 rpm por 20 min a 4°C. El precipitado se lavó dos veces con acetona a -20°C, volviendo a centrifugar después de cada lavado. El precipitado se re suspendió en el *buffer* de corrida.

3.2.18. Espectrometría de masa

El secretoma de *A. niger* NRRL3 obtenido a partir de la fermentación optimizada por DCC, las fases superior e inferior de la extracción combinada por SBA y las eluciones obtenidas de cromatografía iónica fueron analizadas por esta técnica.

Con la finalidad de obtener una única banda que contenga todas las proteínas, todas las soluciones enzimáticas fueron corridas en un gel de electroforesis SDS-PAGE hasta 1cm después de entrar al gel de resolución. La tinción se realizó con Coomassie Blue Coloidal y las bandas fueron cortadas para su posterior análisis en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEN-CONICET-UBA).

Las muestras fueron analizadas por nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap. Esta estrategia permitió, en primer lugar, una separación de los péptidos obtenidos por digestión triptica de la muestra y la posterior identificación de los mismos. Los espectros obtenidos fueron analizados con el programa Proteome Discoverer, utilizando la base de datos correspondiente al estudio en cuestión. De este modo fue posible identificar las proteínas presentes en cada fracción y su abundancia relativa.

Los métodos de conteo espectral estiman la abundancia de proteínas comparando el número de espectros de espectrometría de masa que han sido asignados a cada proteína. El método se basa en la suposición de que el número de péptidos observados de una proteína se correlaciona con su abundancia. En esta estrategia se ha implementado el conteo espectral realizado con el índice de abundancia de proteína modificada exponencialmente (emPAI). El método emPAI se basa en la comparación del número de péptidos observados experimentalmente y número de péptidos observables calculado. Este método presenta mayor reproducibilidad con respecto otros métodos, siendo muy sencillo de implementar ya que el motor de búsqueda que emplea denominado Mascot, usa datos de espectrometría de masas para identificar proteínas en bases de datos incorporando el valor emPAI en los resultados (Martins-de-Souza 2014). Posteriormente, la abundancia relativa se calculó a partir del parámetro emPAI, siendo el 100% la suma total de emPAIs de todas las proteínas.

3.2.19. Sacarificación

Para observar la capacidad hidrolítica de las enzimas producidas por los cultivos se realizó la sacarificación sobre cascarilla de soja. Se incubó 3gr de sustrato lignocelulósico

con 150 mL de *buffer* NaCit 50 mM pH 5,30 estériles con un volumen equivalente a 50,4 U de actividad xilanolítica de EEO o xilanasas comerciales cada una previamente filtrada con filtros de esterilización. También se realizó un control en ausencia de enzima. La mezcla de reacción se incubó asépticamente a 20°C en agitación orbital a 100 rpm por 72 hs. Se tomaron alícuotas por triplicado cada 24hs. en las condiciones asépticas para la determinación de azúcares reductores totales, xilosa y glucosa según se describió en la sección 3.2.5.

3.2.20. Caracterización de sustratos por microscopía electrónica de barrido

La morfología de la microestructura de la cascarilla de soja antes y después de la sacarificación fueron evaluadas por microscopía electrónica de barrido o SEM (del inglés: *Scanning Electron Microscope*) (Quanta 200F FEG) en el Instituto de Física Rosario (IFIR-CONICET). Las muestras fueron liofilizadas y colocadas en un soporte de aluminio con un voltaje de aceleración de 2,3 kV. Las imágenes fueron tomadas usando el detector LFD (Large Field Detector).

3.2.21. Panificación y evaluación de la calidad del pan

La producción de pan francés así como también la evaluación de la calidad y de los parámetros sobre las harinas y los panificados se realizó en el laboratorio de OS S.A. Molino Venado Tuerto del grupo Moliser S.A. Se prepararon panes de harina de trigo 000 sin aditivos enzimáticos denominado “BASE” y con el agregado de los siguientes tres aditivos: “EEO”, FS del sistema combinado UCON/NaCit con PEG1450/NaCit denominado “SBA” y enzima comercial “Multizyme XT”.

El protocolo de calidad de la empresa OS S.A. Molino especifica el agregado de 140 ppm de la enzima comercial Multizyme XT como aditivo en la elaboración de pan francés de harina de trigo. Se determinó actividad enzimática xilanolítica, celulolítica, amilolítica de la muestra comercial y se agregó una cantidad de EEO o SBA equivalente en U de EX por gramo de producto de modo de mantener la relación enzimática empleada actualmente en el molino.

La masa para la elaboración del pan se preparó en una amasadora espiral (Brunetti). Se incorporó un kilo de harina de trigo 000 del molino antes mencionado, la cantidad adecuada de aditivo enzimático y 550 ml de agua potable. Se amasó por 40 segundos a velocidad intermedia y finalmente se agregaron 20 g de sal, 20 g de levadura seca activa instantánea para panificación y 14 g de mejorador de panadería Toupan 4x4. La masa se

amasó durante un período constante de 6 minutos a 20°C, luego se dejó descansar en la mesada a 20°C por 4 min. Se estiró la masa en un sobador (Servipan) con 4 vueltas y se dividió en piezas de 300 g. Las masas obtenidas por la armadora (Pastor), se ubicaron en una bandeja baguetera de aluminio enmantecada y se colocó en la fermentadora de ladrillos a 27°C por 1 h. efectuándose un corte en la superficie de las piezas de masa enrolladas con una cuchilla metálica, con el objetivo de orientar la expansión de la masa durante el horneado. Las piezas de pan se cocieron en un horno rotativo a gas (Servipan) durante 12 minutos a 230°C. Los panes se retiraron de las bandejas y se enfriaron durante 2 hs. a temperatura ambiente (20°C).

El análisis de calidad de los panes así obtenidos y la formulación de la harina de trigo se realizó en el molino por la Lic. Taddia y el Sr. Sergio Bersia encargado de calidad y formulación de harina del molino. Se evaluó la relajación de la masa después del mezclado, la forma, la miga, el corte y el color. También se determinó el peso y el volumen por el desplazamiento de semillas de colza (Jiang et al. 2005).

3.2.21.1. Determinación de gluten en harina de trigo

Se determinó el contenido de gluten de la harina de trigo por extracción por lavado en un equipo Glutomatic System 2200 marca Perten. Se colocaron 10 g de harina de trigo y 5 mL de agua destilada y se mezclaron durante 20 segundos. La masa se lavó con agua en agitación durante cinco minutos y se centrifugó a 6000 rpm durante un minuto. La masa sólida obtenida se pesó y se calculó el valor porcentual de gluten húmedo. Luego, se secó a 150°C durante cuatro minutos. La masa final obtenida fue pesada y se calculó el valor porcentual de gluten seco.

3.2.21.2. Determinación de humedad en harina de trigo

El contenido de humedad de la harina de trigo se determinó mediante el método termogravimétrico. Se colocaron 2 g de harina en un crisol, se calentó la muestra a 135°C durante 2 h y se determinó la humedad por la diferencia de peso debida a la pérdida por evaporación.

3.2.21.3. Prueba alveográfica

La prueba alveográfica determina parámetros de la harina que establecen su calidad, estos son: tenacidad (P o resistencia a la extensión), extensibilidad de la masa (L), la energía de deformación (W), la relación de configuración de la curva (P/L) y el índice de

elasticidad (Ie). Consiste en producir una muestra de masa que, al someterse a una presión de aire, se deforma en una burbuja. Este modo de extensión reproduce la deformación de la masa bajo la influencia del aumento de gas carbónico durante la fermentación.

Esta prueba se realizó en un Alveógrafo AlvéOlink (Chopin). Se incorporó 250g de harina de trigo al recipiente mezclador del Alveógrafo y a partir del valor de humedad que presentó la harina de trigo se le agregó la cantidad adecuada de una solución de NaCl al 2,5%P/V. El amasado se realizó constantemente por 8 minutos. Luego se extrajo la masa, se estiró, se cortó con un molde circular y se dejó reposar durante 15 minutos en la cámara para tal fin. Posteriormente se agregó aire para el hinchado automático hasta la explosión de la burbuja. Luego del proceso de insuflado con aire se generaron cinco gráficos, a partir de los cuales se obtuvo una curva promedio llamada Alveograma, sobre la cual se calculan los parámetros correspondientes.

3.2.21.4. Determinación de Micotoxinas y microorganismos en los extractos ricos en enzimas xilanolíticas

El análisis de micotoxinas del EEO y la fracción de la FS del sistema combinado UCON/NaCit con PEG1450/NaCit fue realizado en el Laboratorio GREEN LAB de la ciudad de Rosario. Las probables micotoxinas producidas por *A. niger* se determinaron por enzimoimmuno análisis (EIA) utilizando los kits de Ridascreen Fast específicos con los límites de detección (LD) indicados en cada caso para las siguientes micotoxinas: Fumonisinias con LD = 222 µg/kg, Aflatoxinas con LD = 1.7 µg/kg, Zearalenona con LD = 50 µg/kg, Ocratoxina A con LD = 2.5 µg/Kg.

El análisis bacteriológico se efectuó en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR. Se realizaron recuentos de bacterias aerobias mesófitas viables en Agar Plate Count durante 24 hs. a 37°C, enterobacterias en Agar Violeta-Rojo-Bilis-Glucosa durante 24 hs. a 37°C, bacterias coliformes totales en Agar Violeta-Rojo-Bilis-Lactosa durante 24 hs. a 37°C, *Escherichia coli* en Agar Levine durante 24 hs. a 42°C, *Pseudomonas aeruginosa* en Agar Cetrimida durante 24 hs. a 42°C y *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol Salado durante 48 hs. a 37°C.

Finalmente, se determinó ausencia de conidios y/o esporas fúngicas en los EEO y en la fracción de la FS del sistema combinado UCON/NaCit con PEG1450/NaCit, mediante el cultivo de las fracciones y sus respectivas diluciones seriadas, en placas de petri con 10mL de agar papa glucosado durante 10 días a 30°C.

3.2.22. Determinación del costo de la producción enzimática

Se determinó el costo de la producción del EEO como también el de la purificación de las enzimas del complejo xilanolítico en cada una de las operaciones unitarias propuestas en este trabajo de tesis. Se tuvieron en cuenta tanto los costos de los reactivos, insumos fungibles y no fungibles, equipamiento (precio de comercialización y amortización), la energía eléctrica y el costo operativo de los recursos humanos involucrados. El cálculo se realizó como el Costo por Unidad de Producto (CUP) en escala de laboratorio de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{CUP} = \frac{\text{Costo total}}{\text{Cantidad de producto total}} \quad \text{Ecuación 5}$$

3.2.23. Procesamiento de la información y Análisis estadístico

En todos los casos las determinaciones se realizaron por triplicado. Para el análisis estadístico de las muestras, se utilizó análisis de la variancia (ANOVA) con un nivel de significancia de 5%, a través del software Sigma Plot Versión 10.0, prueba de rangos múltiples (Tukey, $P \leq 0,05$) (Tukey 1949). Para el análisis del diseño estadístico experimental se utilizó el paquete informático Minitab versión 17.

CAPÍTULO 4 - Producción Fúngica de Enzimas Hidrolíticas

El género *Aspergillus* contiene alrededor de 14600 genes, de los cuales 200 están involucrados en la degradación de los polisacáridos. Los *Aspergillus spp.* se han descrito como productores de celulasas, xilanasas, amilasas y pectinasas (Amore, Giacobbe, and Faraco 2013).

Diferentes autores han demostrado que los desechos agroindustriales pueden ser excelentes fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento y la producción de enzimas por hongos filamentosos como *Aspergillus spp.* Por ejemplo, el salvado de trigo, la mazorca de maíz y la cáscara de arroz estimulan la producción de las enzimas del complejo celulolítico. (Nazir et al. 2010; Hanif, Yasmeen, and Rajoka 2004; Ghorri, Malana, and Jamil 2011). La torta de canola (Costa et al. 2010; Amore, Giacobbe, and Faraco 2013) o gramíneas como *Spartina argentinensis* (Carlos Martín Pellieri 2017) induce principalmente la producción de las enzimas del complejo xilanolítico. La cáscara de arroz, la mazorca de maíz, el salvado de trigo y la piel de papa se han empleado en la producción de las enzimas del complejo amilolítico (Farzana et al. 2016; Elaiyaraja et al. 2016). Por otra parte, la cáscara de cítricos como la naranja y mandarina, o la cascarilla de soja han resultado buenos sustratos para la producción de las enzimas del complejo pectinolítico (Li et al. 2020; Ahmed et al. 2016).

Con la finalidad de diseñar una metodología de producción enzimática de alto valor comercial que pueda aplicarse a escalas industriales, en la etapa de planeamiento, se evaluaron once fuentes alternativas de nutrientes (ver Tabla 3.1 de la sección 3.2.1.1 de materiales y métodos) capaces de ser degradadas por las enzimas producidas por el hongo filamentosos *A. niger* en FSm y FES. Para caracterizar el sistema de producción de proteínas exógenas de *A. niger* en los diferentes sustratos empleados para su cultivo, se evaluaron las actividades amilolíticas y pectinolíticas además de las xilanolíticas y celulolíticas en los extractos enzimáticos.

4.1. Evaluación de diversos sustratos en la producción de enzimas hidrolíticas de la cepa *Aspergillus niger* en fermentación sumergida

Inicialmente se caracterizó la FSm para la producción de enzimas xilanolíticas (EX), enzimas celulolíticas (EC), enzimas amilolíticas (EA) y enzimas pectinolíticas (EP),

en sistemas preparados según se indica en la sección 3.2.1.3 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4.1, su análisis se detalla para cada una de las enzimas en las siguientes secciones.

4.1.1. Enzimas Xilanolíticas

Se calcularon las actividades xilanolíticas (según se describió en la sección 3.2.2 de materiales y métodos) y se obtuvieron los perfiles de producción de las EX para cada uno de los sustratos. Puede observarse que la producción máxima de las EX varió de acuerdo al tiempo de incubación y a la biomasa empleada (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Actividades enzimáticas en el día de máxima producción de los cultivos sumergidos (FSm) a 30°C y 125 rpm de *A. niger* usando diferentes sustratos lignocelulósicos como fuente de carbono.

SL	EX (U/mL)	DMP	EC (U/mL)	DMP	EA (10 ³ U/mL)	DMP	EP (10 ³ U/mL)	DMP
CS	23,2 ± 0,8	4	9,6 ± 0,3	9	5,57 ± 0,06	4	3,4 ± 0,1	4
ST	15,8 ± 0,5	4	3,53 ± 0,06	7	5,57 ± 0,07	9	0,86 ± 0,03	4
AT	14,5 ± 0,3	5	1,99 ± 0,01	9	28,2 ± 0,1	5	0,23 ± 0,01	4
C	5,55 ± 0,03	4	4,1 ± 0,2	10	3,24 ± 0,03	6	0,46 ± 0,01	5
CN	4,5 ± 0,2	5	4,9 ± 0,1	10	ND	-	3,05 ± 0,08	3
A	3,88 ± 0,01	4	1,32 ± 0,02	8	ND	-	0,17 ± 0,01	5
SA	3,88 ± 0,08	4	1,93 ± 0,03	9	1,10 ± 0,02	4	0,72 ± 0,03	4
V	1,29 ± 0,03	9	0,81 ± 0,02	7	ND	-	0,63 ± 0,03	5
CG	1,27 ± 0,01	10	1,50 ± 0,02	9	ND	-	0,34 ± 0,01	5
HV	1,02 ± 0,06	7	1,98 ± 0,03	9	20,55 ± 0,09	2	0,86 ± 0,02	2
CM	0,81 ± 0,05	10	1,05 ± 0,01	9	ND	-	0,40 ± 0,01	5

SL: Sustrato Lignocelulósico, DMP: Día de Máxima Producción, ND: Actividad No Detectada. EX: enzimas xilanolíticas, EC: enzimas celulolíticas, EA: enzimas amilolíticas, EP: enzimas pectinolíticas. CS: cascarilla de soja, ST: salvado de trigo, AT: afrechillo de trigo, C: cebada, CN: cáscara de naranja, A: aserrín, SA: salvado de avena, V: viruta, CG: cáscara de girasol, HV: harina de vino, CM: cáscara de maní.

La mayor actividad en FSm fue alcanzada utilizando los sustratos cascarilla de soja (23,20 U/mL) al cuarto día de fermentación y fue seguido por los sustratos salvado de trigo (15,82 U/mL) y afrechillo de trigo (14,50 U/mL) en el cuarto y quinto día de incubación, respectivamente. En general, para el resto de los sustratos lignocelulósicos analizados, los

valores de actividad máxima de las EX fueron al menos tres veces inferiores a los observados para cascarilla de soja, salvado de trigo y afrechillo de trigo, alcanzándose los mencionados valores en un mayor tiempo de incubación, lo que indicaría mayor costo de producción enzimático en dichos sustratos (Tabla 4.1).

La variación en la producción enzimática debido a diferencias en el tamaño de la partícula puede ser observada al comparar los sustratos viruta y aserrín, ambos obtenidos de la mezcla homogénea de *Pinus* y *Cabralea oblongifoliola*, conocidos comúnmente como pino y Cancharana (Figura 4.1). El análisis de la actividad específica de las EX indica la relación que existe entre la cantidad de unidades de actividad de las EX (U) con respecto a la masa de proteínas totales (mg) del extracto. La actividad específica de las EX en aserrín (partícula más pequeña) es mayor que la producida cuando se emplea como sustrato viruta.

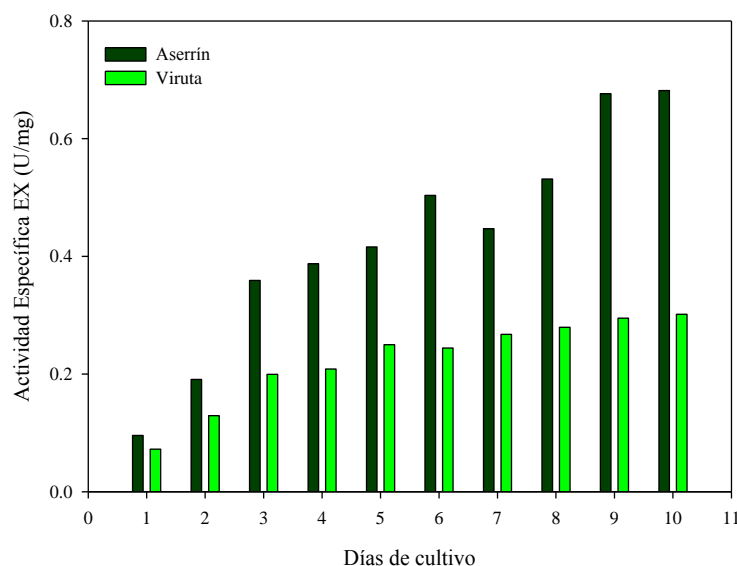


Figura 4.1: Comparación de la Actividad Específica de las EX producida por *A. niger* por FSm a 30°C y 125 rpm con fuente de carbono viruta y aserrín.

En la Figura 4.2 se comparan los valores de actividad y actividad específica de las EX obtenida en la FSm al emplear cebada como sustrato. Se observa una mayor actividad específica en comparación a la actividad de las EX, debido a la poca cantidad de otras proteínas presentes en el extracto. El mismo efecto se observó en los cultivos conteniendo cáscara de girasol, salvado de avena, cáscara de maní y cascarilla de soja (datos no mostrados).

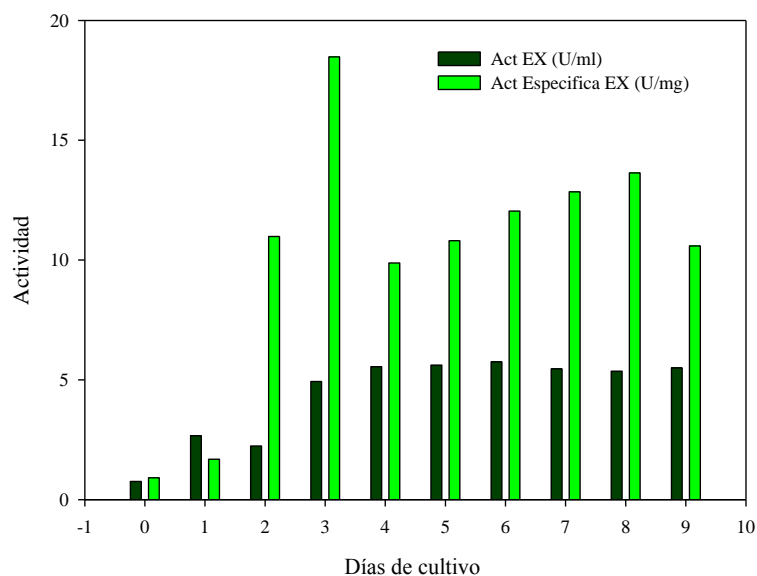


Figura 4.2: Comparación de la actividad y específica de las EX producida por *A. niger* por FSm a 30°C y 125 rpm conteniendo cebada como sustrato.

Sin embargo, en las fermentaciones conteniendo harina de vino, salvado de trigo, aserrín, viruta y cáscara de naranja, se observó una menor actividad específica de las EX en comparación con la actividad de las EX indicando que una mayor cantidad de proteínas son producidas por *A. niger* a partir de los mencionados sustratos. En la Figura 4.3 se representa la actividad total y específica de las EX producida por *A. niger* en FSm al utilizar harina de vino como sustrato.

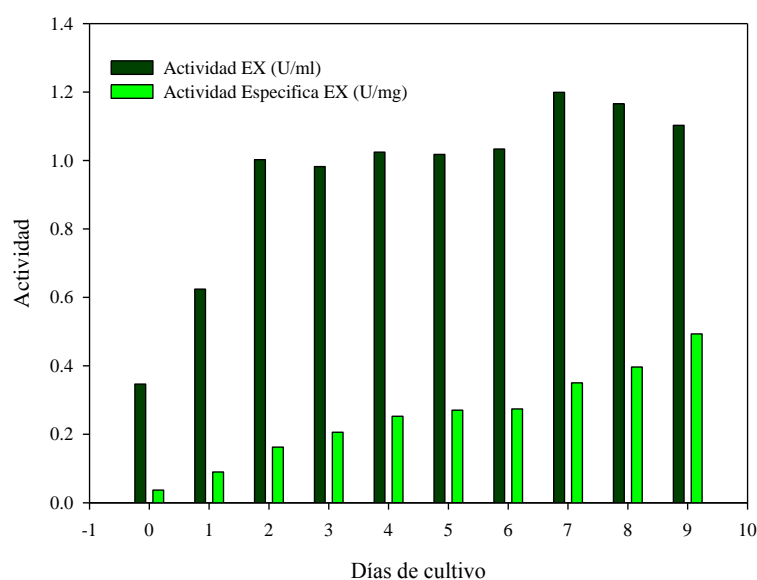


Figura 4.3: Comparación de la actividad y actividad específica de las EX producida por *A. niger* por FSm a 30°C y 125 rpm conteniendo harina de vino como sustrato.

4.1.2. Enzimas Celulolíticas

La producción de enzimas en la FSm mostró que la heterogeneidad de los sustratos lignocelulósicos condujo a la síntesis de celulasas en proporciones variables. La actividad de las EC se determinó según se describió en la sección 3.2.2 de materiales y métodos y se analizaron los perfiles de producción enzimática por un período de diez días.

En la Tabla 4.1 puede observarse que la actividad de las EC más alta (9,6 U/mL) se detectó en el noveno día de fermentación cuando se utilizó cascarilla de soja como sustrato, mientras que en los sustratos cáscara de naranja, cebada y salvado de trigo se detectó un moderado nivel de producción siendo las actividades 4,9 U/mL, 4,1 U/mL y 3,5 U/mL respectivamente. Por otra parte, en los cultivos sumergidos en los que se empleó afrechillo de trigo, harina de vino, salvado de avena, cáscara de girasol, viruta, cáscara de maní y aserrín como sustrato se observó un valor de actividad de las EC inferior a 2 U/mL que no presentó variación significativa ($p < 0,005$) en los diferentes días de fermentación.

La producción máxima de las EC, en la mayoría de los sustratos empleados, se observó a partir del séptimo día de cultivo en las condiciones ensayadas, mientras que, los valores de actividad máxima de las EX se observaron principalmente al cuarto día de fermentación.

Si bien la producción simultánea de las enzimas del complejo hemicelulolítico y celulolítico por hongos filamentosos contribuye a degradar sinérgicamente la pared celular vegetal, la regulación de la expresión de los genes que codifican para estas enzimas permite que se produzcan solo en condiciones en las que el hongo necesita usar los diferentes polisacáridos como energía y fuente de carbono. En *Aspergillus* ssp., la proteína XlnR, activa la transcripción de los genes del sistema xilanolítico *xlnA*, *xlnB*, *xlnC* y *xlnD* que codifican para las proteínas endoxilanasas A, B, y C y β -xilosidasa y de otras enzimas accesorias implicadas en la degradación de la hemicelulosa, como glucuronidasa A, acetilxilano esterasa A, la arabinoxilano, arabinofuranohidrolasa A y la feruloil esterasa A; así como también la transcripción de genes que codifican para endoglucanasas A y B (*eglA* y *eglB*), celobiohidrolasas (*eglA* y *eglB*) involucradas en la degradación de la celulosa (Figura 1.7 de la introducción), indicando una posible coordinación por XlnR en la regulación de las enzimas que conforman los complejos xilanolítico y celulolítico (Gutiérrez-Rojas, Moreno-Sarmiento, and Montoya 2015).

La mayoría de las enzimas del complejo celulolítico son correguladas con las xilanasas a partir de una sola molécula inductora (D-xilosa) en la especie *A. niger*. El

factor de transcripción XlnR es inducido por D xilosa. Sin embargo, este catabolito también puede inducir el represor catabólico por carbono CreA, mediante la represión catabólica se evita que el hongo sintetice una cantidad excesiva de enzimas cuando existe disponibilidad de otras fuentes más fácilmente asimilables. De este modo D-xilosa puede actuar tanto como un inductor o represor.

Este monosacárido es liberado gradualmente a partir de la hidrólisis del xilano, lo que lleva a una baja concentración inicial en el medio. Bajo estas condiciones la represión por D-xilosa es baja y se detectan niveles altos de expresión. Cuando los niveles de D-xilosa en el medio alcanzan concentraciones de 70 mM, la represión a través de CreA juega un papel más importante, resultando en una disminución de los niveles de expresión (Gutiérrez-Rojas, Moreno-Sarmiento, and Montoya 2015). De este modo, las EX se inducen en presencia de bajas concentraciones de D-xilosa, xilobiosa, arabinosa y L-arabitol, mientras que las EC se inducen principalmente en bajas concentraciones de glucosa y celobiosa (Aro, Pakula, and Penttilä 2005). Este comportamiento regulatorio permitiría explicar la producción temprana de las EX respecto de las EC.

La función regulatoria de los genes de *A. niger*, ya sea como reguladores positivos o negativos, es compleja implicando la activación, la modulación y la represión de muchos más genes de los mencionados, además de las enzimas del complejo xilanolítico y celulolíticos a través de redes complejas de regulación génica.

4.1.3. Enzimas Pectinolíticas

Las especies de hongos del género *Aspergillus* son la principal fuente de enzimas pectinolíticas. La síntesis de las EP extracelulares está muy influenciada por la fuente de carbono y la presencia de inductores en el medio de cultivo como la pectina y sus derivados (Blandino et al. 2001). La determinación de actividad enzimática pectinolítica se determinó según se describe en la sección 3.2.2 de materiales y métodos. En los sistemas en que se utilizó cáscara de naranja el perfil de producción indica que es un sustrato eficaz para la producción de dichas enzimas, siendo la actividad de las EP máxima al tercer día de fermentación ($3,05 \cdot 10^{-3}$ U/mL). Sin embargo, también se observó que al emplear cascarilla de soja como sustrato, la cual no ha sido evaluada por otros autores, la producción de las enzimas fue ligeramente superior ($3,4 \cdot 10^{-3}$ U/mL) al cuarto día de fermentación. Es importante destacar que en los sistemas ensayados no se incorporaron inductores como ácido galacturónico o pectina para la producción de las enzimas del complejo pectinolítico (Amore, Giacobbe, and Faraco 2013; Blandino et al. 2001).

4.1.4. Enzimas Amilolíticas

La actividad amilolítica de los extractos enzimáticos se determinó de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.2.3 de materiales y métodos. En la Tabla 4.1, puede observarse que la mayor actividad de EA se determinó al emplear afrechillo de trigo como sustrato, en el quinto día de FSm ($28,2 \cdot 10^{-3}$ U/mL) y comenzó a disminuir al sexto día. Por otro lado, en harina de vino la actividad máxima observada fue de $20,55 \cdot 10^{-3}$ U/mL al tercer día de cultivo y disminuyó dramáticamente al quinto día ($1,44 \cdot 10^{-3}$ U/mL). Se evaluó si dicha disminución correspondía a la presencia de proteasas, pero no se detectó actividad de las mismas en las alícuotas analizadas.

Las variaciones descritas pueden deberse a que la expresión de los genes que codifican para las enzimas amilolíticas se activan en presencia de fragmentos de almidón y maltosa, mientras que se inhiben en presencia de altas cantidades de glucosa y xilosa debido a la inducción del represor catabólico por carbono CreA, probablemente el incremento de xilosa en el medio de crecimiento conduzca a una disminución de la concentración de las EA. (Ruijter and Visser 1997). No se detectó actividad de las EA en los restantes sustratos empleados (cáscara de naranja, viruta, aserrín, cáscara de girasol y cáscara de maní).

4.2. Evaluación de diversos sustratos en la producción de enzimas hidrolíticas de la cepa *Aspergillus niger* en fermentación en estado sólido (FES)

La producción de enzimas hidrolíticas en función del tiempo se analizó también en FES con cascarilla de soja, salvado de trigo y afrechillo de trigo, que fueron los sustratos en los cuales se produjo mayor producción enzimática en la FSm. Estos sustratos no solo pueden proporcionar carbono y nutrientes durante el proceso, sino también una superficie de unión para la invasión del micelio en el soporte impregnado. La Tabla 4.2 muestra los perfiles de actividad enzimática de las EX, EC, EA y EP en el día de máxima producción usando los sustratos mencionados.

Tabla 4.2: Actividades enzimáticas en el día de máxima producción de los cultivos en medio sólido (FES) a 30°C de *A. niger* usando diferentes sustratos lignocelulósicos como fuente de carbono.

SL	EX (U)	DMP	EC (U)	DMP	EA (10 ³ U)	DMP	EP (10 ³ U)	DMP
CS	186 ± 3	5	80,7 ± 0,9	5	117 ± 1	2	77 ± 3	2
ST	555 ± 1	3	131,8 ± 0,5	3	31 ± 1	5	73,8 ± 0,8	3
AT	430 ± 7	4	120 ± 3	4	14 ± 1	5	62 ± 7	2

SL: Sustrato Lignocelulósicos, DMP: Día de Máxima Producción

Como puede observarse, la producción de EA y EP fue considerablemente menor que la obtenida para las EX y EC en los tres sustratos analizados ($p < 0.05$) y además que la mayor producción de las EX y EC se alcanzó en los sistemas fermentativos conteniendo salvado de trigo y afrechillo de trigo como sustratos.

Como se mencionó precedentemente en la introducción (sección 1.3), la composición química de la pared celular vegetal y su conformación tridimensional no son rígidas. Es una estructura dinámica y diversa compuesta por tres tipos principales de polímeros: celulosa, hemicelulosas y lignina, que a partir de los mismos elementos básicos de construcción puede generar distintas versiones. Las microfibrillas de celulosa están unidas al heteropolisacárido hemicelulosa, que a su vez está rodeado de lignina, la cual dificulta la accesibilidad enzimática a la celulosa y a la hemicelulosa (Banerjee et al. 2016). En consecuencia, al variar la especie vegetal, la estructura de la pared celular es diferente.

La Tabla 4.3 muestra la composición fisicoquímica de la cascarilla de soja, el salvado de trigo y el afrechillo de trigo. El salvado de trigo contiene un mayor porcentaje de celulosa y hemicelulosa que el afrechillo de trigo; y un mayor porcentaje de lignina lo cual dificultaría la degradación de la hemicelulosa en xilooligosacáridos responsables de la inducción de la producción de las EX (Aro, Pakula, and Penttilä 2005). Por lo tanto, el contenido de hemicelulosa y celulosa ligeramente menor en afrechillo de trigo que en salvado de trigo explicaría la disminución en la producción de las EX y EC.

Tabla 4.3: Composición química de CS, ST y AT, expresado en porcentaje.

SL	Materia seca (%)	Proteína cruda (%)	Nitrógeno no proteico (%)	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)
CS	91,94	7,91	19,86	19,05	45,80	0,59
ST	90,51	13,63	25,07	27,78	8,80	2,94
AT	91,12	13,85	34,15	23,77	8,00	2,46

SL: Sustratos lignocelulósicos

De todos los sustratos empleados en este trabajo, la cascarilla de soja, el salvado de trigo y el afrechillo de trigo exhibieron un contenido similar de hemicelulosa comparado con otros desechos agroindustriales como la paja de mostaza (48,5% de celulosa y 29,6% de hemicelulosa) y la paja de arroz (28,5% de celulosa y 24,7% de hemicelulosa) (Banerjee et al. 2016). Además, el contenido de lignina en los tres sustratos resultó más bajo que en otros sustratos lignocelulósicos como la hoja de piña (10,5%) o el tallo del banano (18,6%) (Khalil, Alwani, and Omar 2006). En este sentido, los contenidos de lignina observados en la CS, el ST y el AT, contribuye a una conformación tridimensional menos rígida, siendo por esta razón sustratos ideales para la producción de las EX y EC (Berlin et al. 2006; Botella et al. 2005). Sin embargo, este concepto no explica la menor producción de las EC al emplear cascarilla de soja respecto del afrechillo y el salvado de trigo. Otros factores deberían ser tenidos en cuenta como la conformación tridimensional que adopta la lignina y la celulosa en la cascarilla de soja, tanto como, el contenido de nitrógeno y su disponibilidad para el crecimiento fúngico y producción de enzimas.

En este sentido, en *A. niger* el regulador de nitrógeno AreA actúa en la transcripción de las enzimas del complejo xilanolítico y celulolítico y se ha demostrado que el crecimiento óptimo de los hongos depende mucho de la fuente y cantidad de nitrógeno proporcionada (Aro, Pakula, and Penttilä 2005). De este modo, la adición de nitrógeno al medio de cultivo fúngico, estimula e incrementa el crecimiento de estos microorganismos, como también la producción de las enzimas hidrolíticas de la pared celular vegetal.

Goyal evaluó el efecto de diversas sales como cloruro de amonio, nitrato de sodio y amonio, sulfato de amonio, urea y peptona sobre la producción de las EX por *Trichoderma viride* a 25°C y pH 4,0 y determinó que la mayor producción de las enzimas del complejo xilanolítico (2506 IU/L) se alcanzaban al utilizar nitrato de sodio como fuente de nitrógeno adicionalmente al sustrato (Goyal et al. 2008). Kheng y Omar determinaron que una

concentración de nitrato de sodio de 0,075% P/P era la cantidad y fuente de nitrógeno más adecuada para complementar la torta de palma en la producción de las EX por *A. niger* (Kheng and Omar 2005).

En las fermentaciones realizadas y analizadas en este capítulo los sistemas fermentativos están suplementados con *buffer* de cultivo conteniendo 3 g/L de nitrato de sodio, por lo expuesto precedentemente, sería interesante evaluar la cantidad adecuada de la fuente de nitrógeno adicional sobre el crecimiento y producción de enzimas.

4.3. Comparación de la producción de enzimas hidrolíticas en fermentación sumergida y sólida

Las fermentaciones sólidas fueron realizadas en las mismas condiciones de cultivo que las fermentaciones sumergidas, es decir manteniendo la misma relación de concentración de inóculo, cantidad de sustrato, pH, ausencia de inductor y temperatura. Para comparar ambas fermentaciones, las actividades enzimáticas se expresaron en unidades de actividad específica (U/mg) y se representaron para los sustratos la cascarilla de soja, salvado de trigo y afrechillo de trigo en la Figura 4.4.

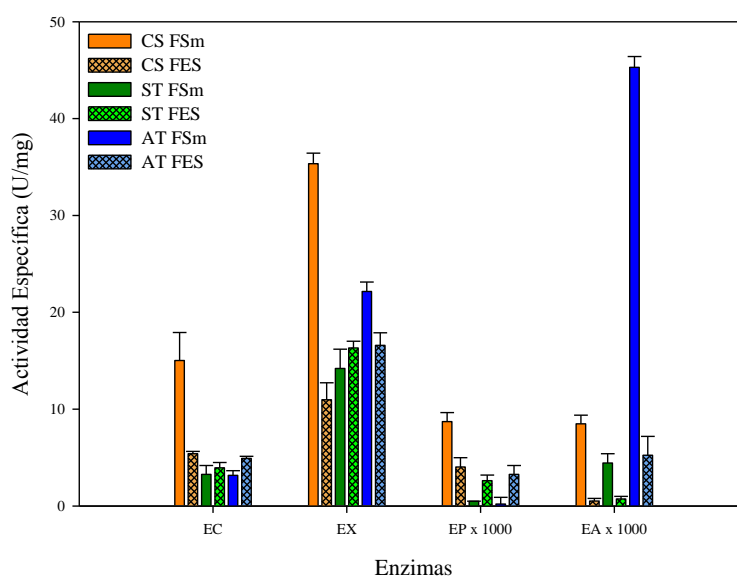


Figura 4.4: Comparación de las actividades específicas EX, EC, EP y EA de *A. niger* por FSm y FES a 30°C en los sustratos cascarilla de soja, harina de trigo y salvado de trigo.

Puede observarse que la actividad específica de las EX y EA en los extractos enzimáticos obtenidos en las fermentaciones sumergidas, en general, fueron mayores que en las fermentaciones sólidas.

Este comportamiento diferencial en la producción enzimática entre FSm y FES es consecuencia de las condiciones de cultivo en las cuales el hongo filamentoso se desarrolla. Mientras que en FSm, *A. niger* está expuesto a fuerzas hidrodinámicas que favorecen la aireación, en FES el crecimiento está restringido a la superficie de la matriz sólida y puede presentar dificultades en la regulación de variables como la humedad, pH y oxígeno libre en forma homogénea durante el proceso. Además, en la FES puede ocurrir una tendencia a la aglomeración del sustrato con el micelio y en consecuencia la formación de masas compactas que impliquen restricciones difusionales de los gases. Las características de crecimiento en tales sistemas dependen entonces de la disponibilidad de nutrientes y la transferencia de masa (Chen 2013). Probablemente una aglomeración de partículas de sustrato con las células durante el crecimiento microbiano dificulte la producción de enzimas durante FES. Si bien este tipo de fermentaciones puede realizarse en tambores rotatorios, un biorreactor de fermentación sólida con agitación permanente, (aunque sea suave), puede modificar la estructura del medio sólido y dependiendo de la naturaleza de la partícula del soporte sólido, esta agitación puede llegar a ser abrasiva causando daños al micelio (Ruíz-Leza et al. 2007).

4.3.1. Relación entre la producción de actividades de las EX y EC

Como se mencionó en la introducción, las diferentes aplicaciones de las EX dependen no solo de su pureza sino también del contenido de las EC en la muestra. La relación entre la actividad de las EX y EC puede considerarse como una medida de la producción enzimática selectiva, y de este modo permite identificar los sistemas que maximizan la producción de las EX minimizando los de las EC. Así la optimización del proceso de obtención de las EX se inicia en la producción de las mismas (*upstream*).

La Figura 4.5 muestra la relación de actividad de las EX/EC en el tiempo obtenida usando cascarilla de soja, salvado de trigo y afrechillo de trigo como sustratos en la fermentación en medio sumergido (A) y sólido (B). Algunos autores como Goyal y Senior han observado un efecto directo en la relación de las EX/EC vinculado con el contenido de hemicelulosa y celulosa en la producción enzimática, intrínsecamente asociado a la regulación de los complejos enzimáticos involucrados en la degradación de la pared celular vegetal como se ha mencionado precedentemente (Senior, Mayers, and Saddler 1989; Goyal et al. 2008). Esto explicaría las diferencias observadas en la relación EX/EC al utilizar durante las fermentaciones sustratos con un contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina tan diverso (Tabla 4.3).

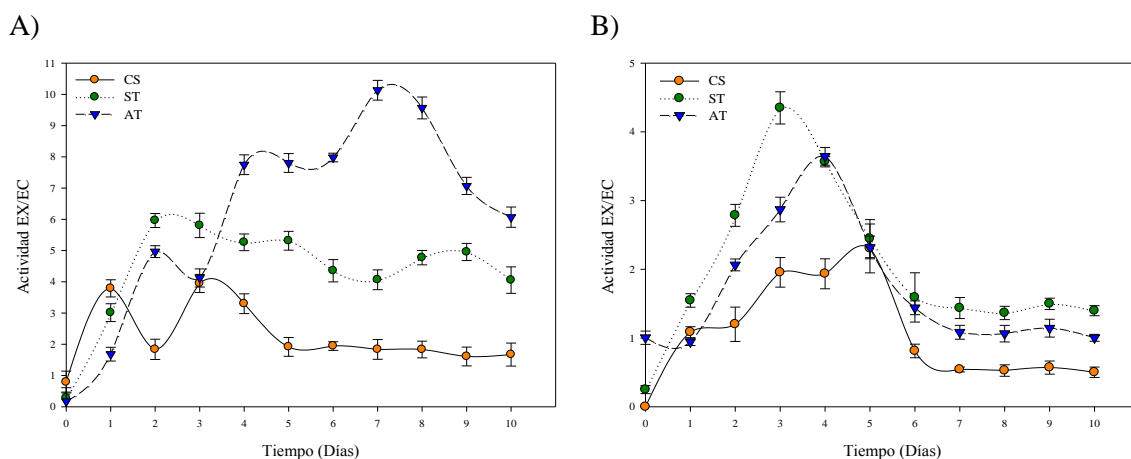


Figura 4.5: Efecto de los substratos cascarilla de soja, salvado de trigo y afrechillo de trigo en A) FSm y B) FES a 30°C, sobre la relación de Actividad EX/EC de *A. niger*.

En general puede observarse que la relación de las EX/EC es similar en la FSm y en la FES cuando se emplea salvado de trigo como sustrato, mientras que disminuye en la FES cuando se utiliza cascarilla de soja y afrechillo de trigo. Además, se aprecia que la relación más alta de las EX/EC se obtuvo en presencia de afrechillo de trigo como sustrato en FSm, y que dicho valor disminuyó cuatro veces al cambiar el tipo de fermentación.

En base a las observaciones realizadas se concluye que para poder definir las condiciones óptimas de producción enzimática por *A. niger* ambas fermentaciones deberían ser analizadas para los substratos cascarilla de soja, salvado de trigo y afrechillo de trigo, como también el tipo y concentración exógena de fuentes de nitrógeno.

Debido a la baja producción de enzimas amilolíticas y pectinolíticas en los trabajos posteriores solo se evaluó la actividad xilanolítica y celulolítica.

CAPÍTULO 5 - Optimización de la Producción de EX

A partir de los ensayos realizados en la etapa de planeamiento descrita en el capítulo precedente, fue posible definir algunas de las variables o factores a incluir en el diseño estadístico experimental para el cribado y optimización de la producción de las EX por el hongo *A. niger*.

Se seleccionaron como factores estadísticos los gramos de sustratos lignocelulósicos para una concentración constante de inóculo 1.10^6 conidios/mL, el volumen de solución del sistema fermentativo que si bien es una variable cuantitativa puede también ser interpretada como cualitativa por abarcar tanto a las fermentaciones sumergidas como sólidas y, finalmente, la concentración de NaNO_3 (N), dado que una adecuada relación en la composición del medio de cultivo permite maximizar la biosíntesis de metabolitos. De este modo se analizará tanto la influencia de la concentración de las fuentes de carbono como así también del nitrógeno sobre la producción enzimática. Además, se incluyeron otros dos factores: la regulación inicial del pH del sistema y el pre tratamiento alcalino de los sustratos. Esta última se incluyó dado que la hidrólisis enzimática de los sustratos lignocelulósicos es limitada debido a la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización, la superficie de contacto disponible y el contenido de lignina (Cortes Ortiz 2014). La hidrólisis alcalina conlleva a la degradación y descomposición de los polisacáridos, en particular de la lignina, de modo que la pared sea más accesible a las EX y EC. Si bien en los sustratos seleccionados el contenido de lignina resultó más bajo que en sustratos lignocelulósicos empleados por otros autores (Khalil, Alwani, and Omar 2006), el pre tratamiento alcalino contribuye a flexibilizar la conformación tridimensional que adoptan los polímeros en la pared celular vegetal.

5.1. Cribado de los factores que afectan la producción de las enzimas del complejo xilanolítico

Se llevó a cabo el diseño factorial fraccionado (DFF) en un solo bloque y dos réplicas, con cinco factores a dos niveles (2^{5-1}) y un total 18 experimentos. El mismo diseño se aplicó para los tres sustratos: cascarilla de soja (CS), salvado de trigo (ST) y afrechillo de trigo (AT). Los factores y niveles utilizados se definen en la Tabla 3.3 y el plan de experimentación del diseño propuesto por el programa Minitab, se resume en la Tabla 3.4. Los experimentos se llevaron a cabo de manera aleatoria para reducir la

probabilidad de que las diferencias en las condiciones de los mismos sesguen los resultados.

Las respuestas analizadas en cada diseño fueron la actividad de las EX producidas en la fermentación fúngica (Y1), la relación de actividades de las EX/EC (Y2) y la actividad específica de las EX (Y3), que se presentan en la Tabla 5.1 y se analizan a continuación para cada sustrato.

Tabla 5.1: Resultados del DFF para la producción de las EX a partir de A. niger en fermentaciones a 30°C utilizando como sustrato cascarilla de soja (CS), salvado de trigo (ST) y afrechillo de trigo (AT).

Corrida	CS			ST			AT		
	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
1	353,44	5,94	1,95	773,31	5,85	3,90	1283,56	3,00	6,17
2	100,22	3,64	8,88	274,43	6,13	12,63	454,81	7,14	16,65
3	470,88	5,59	19,26	196,18	2,48	5,24	205,35	1,95	6,56
4	350,08	5,63	1,95	1013,78	8,46	4,27	1291,39	10,04	5,67
5	152,11	12,00	8,88	122,36	2,26	2,25	144,95	1,42	2,29
6	306,01	10,53	19,26	294,56	4,88	7,08	144,78	3,60	11,92
7	26,40	2,59	2,96	69,52	1,78	0,25	44,56	6,44	0,24
8	338,89	13,29	8,98	229,73	4,59	4,37	431,28	4,10	7,73
9	33,11	2,81	2,68	143,79	2,11	0,64	28,45	2,18	0,19
10	171,80	7,73	0,61	240,43	4,70	10,67	43,66	2,49	6,58
11	8,05	25,00	38,27	46,26	4,77	0,60	25,77	6,13	0,55
12	34,45	8,95	5,09	67,73	14,23	1,00	16,82	24,74	0,33
13	271,79	3,81	2,48	1136,81	11,23	37,22	1227,63	10,22	23,29
14	304,67	5,31	1,43	59,68	5,85	2,59	392,63	5,61	14,97
15	399,29	1,22	48,32	242,04	10,04	0,57	181,86	4,60	0,58
16	44,74	25,00	18,19	180,52	2,00	0,54	47,65	1,34	0,19
17	297,07	6,14	17,80	358,98	5,94	11,53	379,65	5,70	14,12
18	219,22	4,16	22,45	724,32	2,92	3,42	724,32	2,92	3,42

Y1: Actividad EX (U); Y2: Relación Actividad EX/EC; Y3: Actividad específica EX (U/mg).

5.1.1. Sustrato: Cascarrilla de soja

El diagrama de Pareto permite organizar datos mediante un orden de prioridades y facilita la visualización de los factores significativos del modelo. En la Figura 5.1 se presenta el gráfico de Pareto obtenido para la variable respuesta actividad de las EX (U) al emplear como sustrato CS. El valor p del modelo fue 0,006 indicando que el mismo es significativo y solo hay un 0,6% de probabilidad de que las variaciones en las respuestas obtenidas se deban a ruido instrumental. Los factores N ($p=0,015$), NaOH ($p=0,002$) y Medio ($p=0,001$), tanto como la interacción C*pH ($p=0,005$), resultaron significativos para este modelo, dado que con un grado de confianza del 95% sus respectivos valores de probabilidad (p) fueron menores a 0,050.

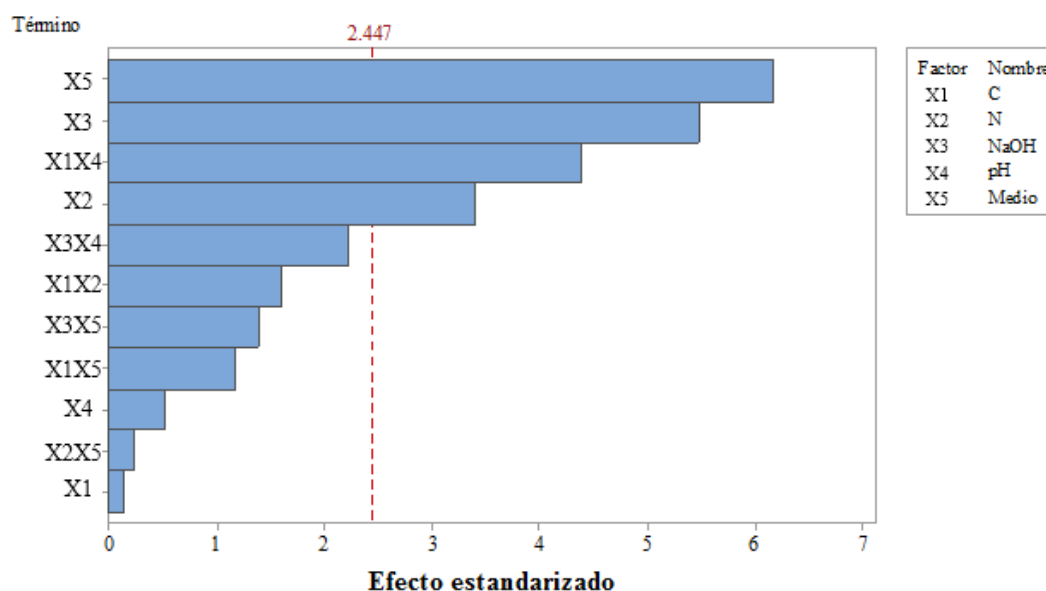


Figura 5.1: Gráfico de Pareto para la respuesta actividad EX producida por fermentación de *A. niger* a 30°C utilizando como sustrato CS ($\alpha=0,05$).

Para el análisis de la respuesta relación entre actividades EX/EC el modelo resultó significativo ($p=0,019$) como también los factores N ($p=0,025$), NaOH ($p=0,005$) y pH ($p=0,014$) (Figura 5.2). El factor Medio presentó un valor $p=0,055$ muy cercano al límite de significancia por lo cual no puede ser considerado como no significativo. De las interacciones entre factores tanto C*NaOH ($p=0,020$) como C*Medio ($p=0,013$), N*NaOH ($p=0,015$), N*pH ($p=0,006$), NaOH*pH ($p=0,017$) y NaOH*Medio ($p=0,015$) resultaron significativas.

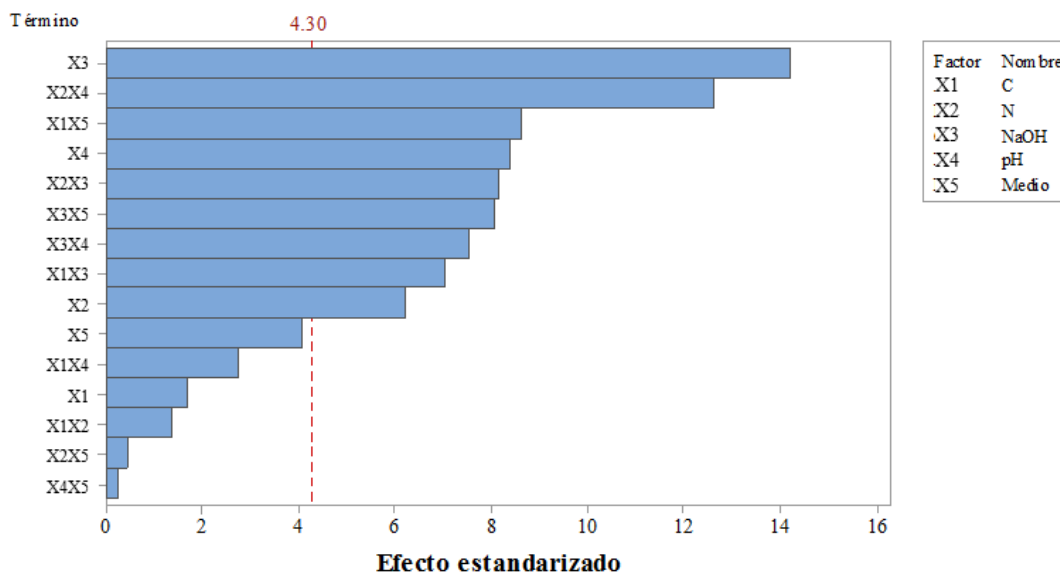


Figura 5.2: Gráfico de Pareto para la respuesta EX/EC producida por fermentación de *A. niger* a 30°C utilizando como sustrato CS ($\alpha=0,05$).

Finalmente, el modelo para el análisis de la respuesta actividad específica de las EX no fue significativo ($p>0,05$).

5.1.2. Sustrato: Salvado de trigo

Cuando en los sistemas fermentativos se utilizó salvado de trigo como sustrato, el análisis de la variancia de la variable respuesta actividad EX indicó que el valor de p del modelo fue significativo ($p=0,003$). Además, resultaron significativos los factores N ($p=0,025$); NaOH ($p=0,000$) y Medio ($p=0,002$) y la interacción entre NaOH*Medio ($p=0,016$) (Figura 5.3).

Por otra parte, para el análisis del modelo, la respuesta relación entre actividades EX/EC resultó significativo ($p=0,020$), para la cual los factores N ($p=0,004$), pH ($p=0,012$), C*Medio ($p=0,010$) y N*pH ($p=0,047$) resultaron significativas (Figura 5.4).

Al igual que en las fermentaciones en las que se empleó CS, al utilizar ST el modelo no fue significativo para la respuesta actividad específica EX.

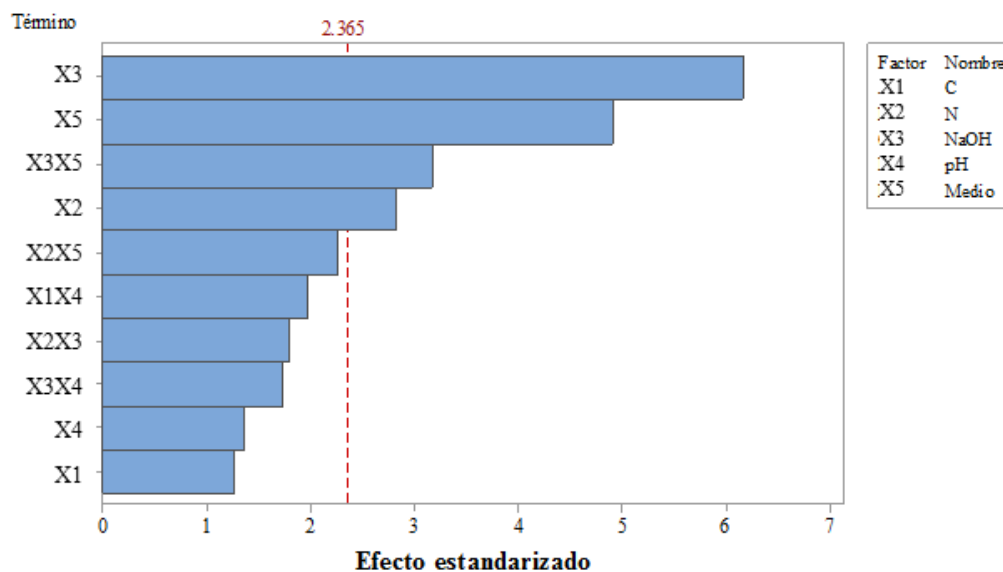


Figura 5.3: Gráfico de Pareto para la respuesta actividad EX producida por fermentación de *A. niger* a 30°C utilizando como sustrato ST ($\alpha=0,05$).

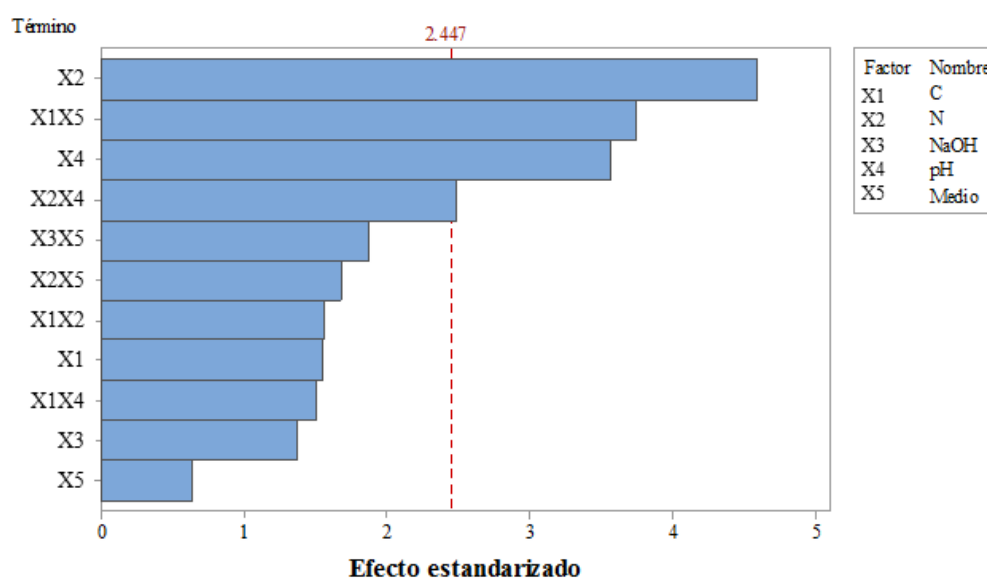


Figura 5.4: Gráfico de Pareto para la respuesta EX/EC producida por fermentación de *A. niger* a 30°C utilizando como sustrato ST ($\alpha=0,05$).

5.1.3. Sustrato: Afrechillo de trigo

En las fermentaciones fúngicas en las que se empleó AT como sustrato, se observó que el valor de p del modelo fue significativo ($p \leq 0,05$) para las tres variables respuestas.

Como puede observarse en la Figura 5.5, los factores NaOH ($p=0,002$) y Medio ($p=0,004$), como las interacciones N*pH ($p=0,049$) y NaOH*Medio ($p=0,045$) resultaron significativas para la variable respuesta actividad EX. Mientras que para el análisis de la

respuesta relación entre las actividades EX/EC, todos los factores ensayados y sus interacciones resultaron significativos.

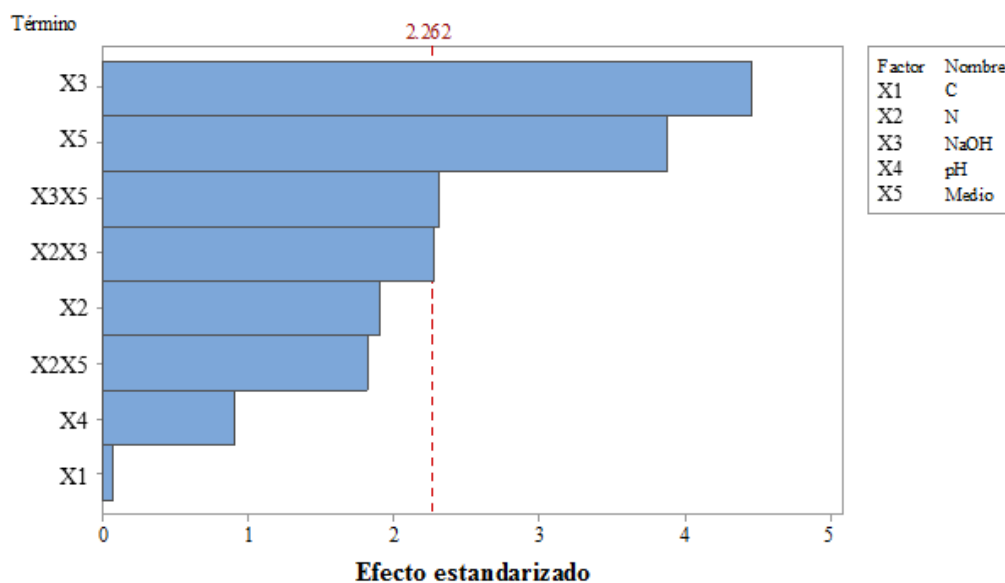


Figura 5.5: Gráfico de Pareto para la respuesta actividad EX producida por fermentación de *A. niger* utilizando como sustrato AT ($\alpha=0,05$).

A diferencia de los otros sustratos, el valor p del modelo para la variable respuesta actividad específica de las EX fue 0,017, siendo los factores C ($p=0,008$), N ($p=0,015$), NaOH ($p=0,003$) y el pH inicial del sistema ($p=0,022$) significativos. En este caso en particular, el factor volumen de la solución de cultivo (Medio) posee un valor de $p=0,076$ muy cercano al límite de significancia y en consecuencia no debería ser considerado como no significativo (Figura 5.6).

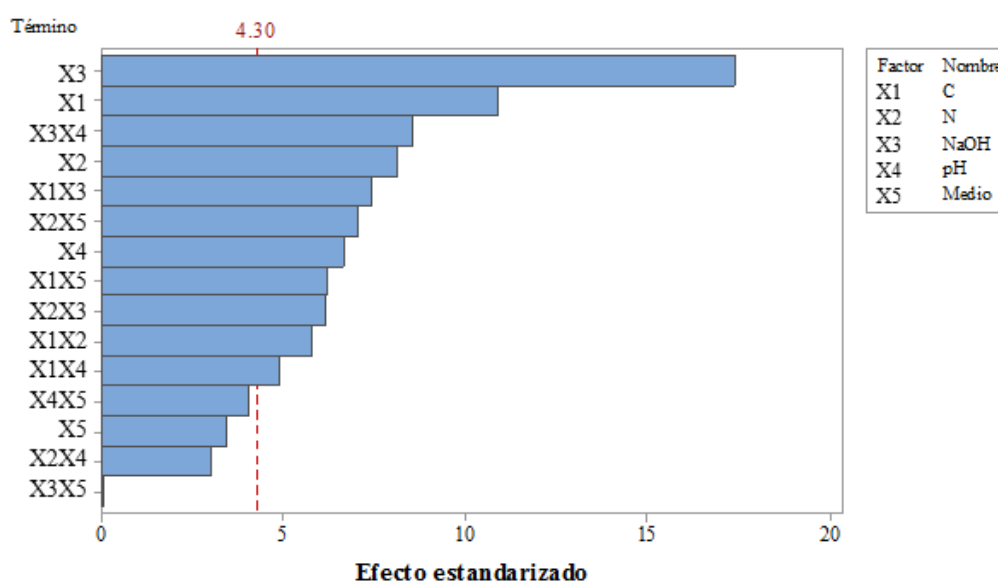


Figura 5.6: Gráfico de Pareto para la respuesta actividad específica EX producida por fermentación de *A. niger* utilizando como sustrato AT ($\alpha=0,05$).

En la Figura 5.7 se representa el gráfico de superficie de respuesta al variar los factores NaOH y pH para la respuesta actividad específica de EX empleando AT como sustrato en la fermentación. Puede observarse que ambos factores son significativos y que la respuesta es máxima cuando el sustrato AT no se sometió a tratamiento previo con NaOH (indicado en el gráfico como concentración de NaOH = 0 M), sugiriendo que no sería necesario realizar dicho tratamiento. Por otro lado, la respuesta también fue máxima cuando el pH inicial de la fermentación fue máximo (pH= 6,50) y no es factible de ser aumentado ya que un incremento por encima de este valor no favorece el crecimiento fúngico.

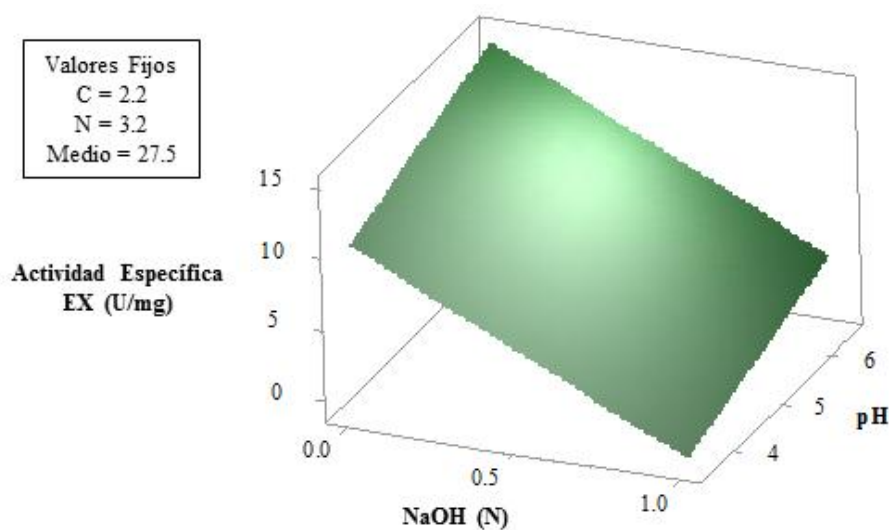


Figura 5.7: Gráfica de superficie para la respuesta actividad específica EX producida por fermentación de *A. niger* utilizando como sustrato AT para las variables NaOH y pH.

Del cribado de los factores que afectan la producción de las EX se obtuvo un valor superior de actividad de las EX y un alto valor de la relación de las actividades de las EX/EC al emplear AT, por lo que dicho sustrato se seleccionó para continuar con la optimización de las condiciones de fermentación de *A. niger*, sin tratamiento alcalino y manteniendo el pH inicial de la fermentación en 6,50 en consecuencia a lo observado en la Figura 5.7.

5.2. Optimización de los factores que afectan la producción de las EX utilizando afrechillo de trigo

Para estudiar las correlaciones entre los factores significativos determinados en el cribado y poder establecer el nivel óptimo de cada uno, se empleó una metodología de superficie de respuesta mediante un diseño central compuesto (DCC), los factores considerados fueron X1 o cantidad de sustrato (C); X2 o concentración de NaNO₃ (N) y

X5 o el volumen del sistema fermentativo (Medio). Los factores y sus niveles se encuentran detallados en la Tabla 3.5 y el plan de experimentación del diseño se resume en la Tabla 3.6. Las respuestas a analizar fueron las mismas que en el cribado: actividad de las EX totales producidas en el cultivo (Y1), la relación de las actividades EX/EC (Y2) y la actividad específica EX (Y3). Los resultados del diseño se detallan en la Tabla 5.2.

La Tabla 5.3 presenta el análisis de la variancia ANOVA (del inglés: *ANalysis Of VAriance*) que surge del análisis del DCC. Se puede observar que el valor de p del modelo para las tres variables respuesta analizadas es inferior a 0,05 indicando que todos los modelos son significativos.

Tabla 5.2: Resultados del diseño experimental de la optimización usando diseño central Compuesto.

Corrida	X1	X2	X5	Y1		Y2		Y3	
				Predicho	Actual	Predicho	Actual	Predicho	Actual
1	3,70	4,50	27,50	1016,52	1012,77	21,20	7,63	13,03	15,22
2	0,83	6,58	14,12	352,19	462,49	17,97	5,20	8,66	10,08
3	1,90	4,50	5,00	385,80	102,90	-2,41	2,36	7,44	5,91
4	1,90	4,50	27,50	654,44	529,59	6,87	4,21	8,34	7,28
5	2,97	2,42	40,89	1099,70	973,63	5,96	8,05	7,70	6,64
6	1,90	4,50	27,50	654,44	613,48	6,87	5,36	8,34	7,08
7	1,90	4,50	27,50	654,44	508,90	6,87	4,59	8,34	7,11
8	2,97	6,58	14,12	731,65	696,25	3,46	9,65	10,00	9,25
9	1,90	8,00	27,50	772,83	748,81	1,94	6,75	7,90	8,54
10	1,90	1,00	27,50	916,20	706,87	1,57	6,39	10,05	8,90
11	1,90	4,50	27,50	654,44	740,99	6,87	9,15	8,34	9,44
12	1,90	4,50	27,50	654,44	702,40	6,87	6,48	8,34	8,18
13	2,97	6,58	40,89	1014,46	1003,83	6,18	10,97	10,54	8,84
14	1,90	4,50	27,50	654,44	871,29	6,87	9,75	8,34	11,02
15	2,97	2,42	14,12	816,89	1129,09	3,25	7,48	9,68	9,79
16	1,90	4,50	50,00	861,43	910,99	2,15	7,00	8,07	9,07
17	0,83	2,42	14,12	437,43	659,90	17,75	6,56	14,05	16,11

18	0,10	4,50	27,50	378,35	148,76	45,59	68,79	17,42	14,71
19	0,83	6,58	40,89	634,99	744,90	20,68	8,86	11,40	11,65
20	0,83	2,42	40,89	720,24	797,47	20,47	11,73	14,27	15,38

Y1: Actividad EX (U); Y2: Relación Actividad EX/EC; Y3: Actividad específica EX (U/mg).

Sin embargo, para la respuesta relación de las actividades EX/EC, el valor de p de la prueba de falta de ajuste (FA) fue inferior a 0,05 lo que indica que la falta de ajuste del modelo es significativa, es decir, el modelo no ajusta a los datos experimentales, y en consecuencia no puede describir de forma adecuada la relación entre los factores (variables dependientes) y las variables respuestas (o independientes). La FA no fue significativa para las variables respuestas actividad EX (Y1) y actividad específica EX (Y3).

En el cuadro ANOVA se observa que el valor F del modelo para la variable respuesta Y1 es 3,97 con un valor de probabilidad del modelo de 0,018 y para Y3 es 3,69 con un valor de p -modelo de 0,027 lo cual indica que el mismo es significativo y solo hay un 2,7% de probabilidad de que las variaciones en las respuestas obtenidas se deban a ruido instrumental. Además, la proximidad de los valores indica que el análisis estadístico mediante DCC es la metodología más adecuada para la optimización de la producción de las EX a partir de *A. niger*.

Tabla 5.3: Análisis de la variancia (ANOVA) del modelo cuadrático para el DCC.

Respuesta	Fuente	GL	SC Ajust	CM Ajust	F	P
(U)	Modelo	6	860582	143430	3,97	0,018
	X1	1	491621	491621	13,62	0,003
	X2	1	24810	24810	0,69	0,422
	X5	1	273072	273072	7,56	0,017
	Cuadrado	3	71079	23693	0,66	0,593
	X1,X1	1	3331	3331	0,09	0,766
	X2,X2	1	65084	65084	1,80	0,202
	X5,X5	1	1711	1711	0,05	0,831
	Error	13	469298	36100		
	FA	8	374307	46788	2,46	0,168
	Error puro	5	94991	18998		
	Total	19	1329881			

Y2	Modelo	6	2267,13	377,85	3,43	0,030
	X1	1	718,49	718,49	6,53	0,024
	X2	1	0,16	0,16	0,00	0,970
	X5	1	25,14	25,14	0,23	0,641
	Cuadrado	3	1523,34	507,78	4,61	0,210
	X1,X1	1	1267,79	1267,79	11,52	0,277
	X2,X2	1	47,07	47,07	0,43	0,525
	X5,X5	1	88,24	88,24	0,80	0,387
	Error	13	1431,07	110,08		
	FA	8	1403,32	175,41	31,60	0,001
	Error puro	5	27,76	5,55		
	Total	19	3698,20			
Y3 (U/mg)	Modelo	9	139,597	15,5108	3,69	0,027
	X1	1	23,299	23,2991	5,54	0,040
	X2	1	5,555	5,5546	1,32	0,277
	X5	1	0,488	0,4884	0,12	0,740
	Cuadrado	3	88,371	29,4568	7,01	0,008
	X1,X1	1	85,414	85,4135	20,31	0,001
	X2,X2	1	0,729	0,7288	0,17	0,686
	X5,X5	1	0,626	0,6257	0,15	0,708
	Interacción	3	21,885	7,2949	1,73	0,223
	X1,X2	1	16,296	16,2961	3,88	0,077
	X1,X5	1	2,419	2,4190	0,58	0,466
	X2,X5	1	3,170	3,1698	0,75	0,406
	Error	10	42,048	4,2048		
	FA	5	29,363	5,8725	2,31	0,189
	Error puro	5	12,685	2,5370		
	Total	19	181,645			

GL: grados de libertad, SC Ajust: suma de cuadrados ajustada, CM Ajust: cuadrados medios ajustados.

Por otra parte, el valor p de falta de ajuste para Y1 fue 0,168 y para Y3 0,189 indicando que la FA no es significativamente relativa al error puro en ninguno de los dos casos. La variable respuesta Y1 presentó dos factores significativos X1 y X5, mientras que para Y3 el factor X1 (gramos de AT) y los términos cuadráticos X1* X1 y X1* X2 fueron

significativos con un grado de confianza del 95%. Por lo tanto, se eligió la variable respuesta Y3 con el modelo cuadrático para finalizar el estudio de optimización. A continuación, se representa la expresión matemática del modelo en función de los factores analizados. Es una ecuación polinómica donde los términos de la fórmula se expresan en unidades no codificadas para la respuesta actividad específica EX.

$$\text{Actividad específica EX} = Y3 = 25,76 - 11,12 C - 2,61 N + 2,125 C * C$$

En la Figura 5.8, se representa una interpretación visual de las ubicaciones de las condiciones óptimas en un gráfico de superficie y contorno 3D para la respuesta actividad específica EX y dos factores manteniendo el tercer factor constante en su valor central. En la Figura 5.8 A y D el factor constante fue X5 o Medio y el valor medio fue 27,5 mL. En la Figura 5.8 B y E, el factor constante fue X2 o concentración de NaNO₃ y el valor medio 4,5 g/L y finalmente en la Figura 5.8 C y F, el factor constante fue X1 o cantidad de sustrato y su valor medio 3,7 g.

En las regiones elípticas de esta gráfica se observa el valor máximo de actividad específica EX que podría obtenerse para un rango de cantidad del sustrato AT (X1) inferior a 0,5 g, a una concentración de NaNO₃ (X2) inferior a 4,5 g/L y para un volumen de solución del sistema fermentativo (X5) la respuesta es satisfactoria cuando los valores intermedios del rango analizado se encuentran entre 20 y 30 mL.

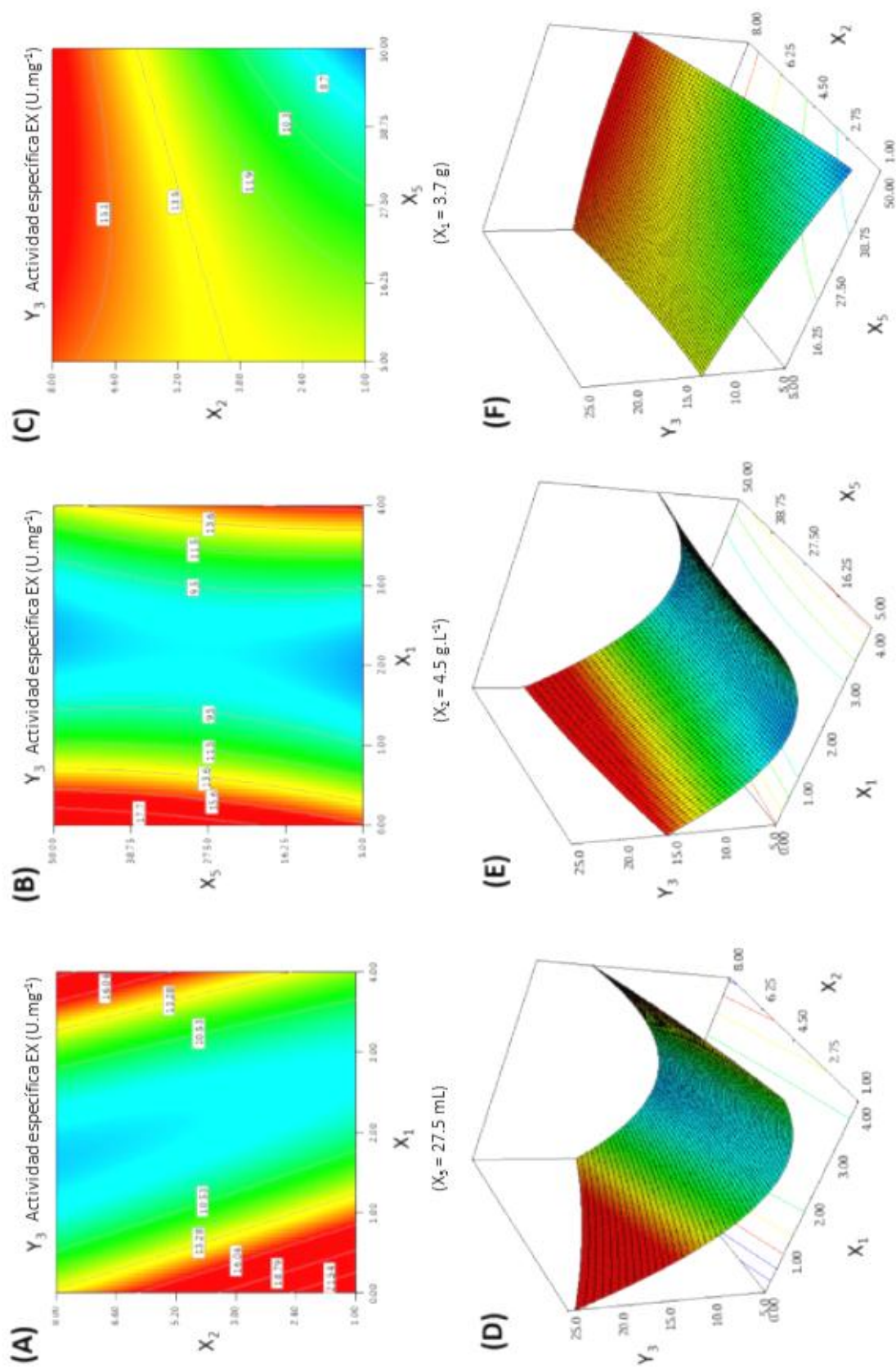


Figura 5.8: Diagramas de superficie para la respuesta estudiada actividad específica EX en función de dos factores experimentales manteniendo el tercer factor en su valor central.

La gráfica de función deseabilidad (Figura 5.9) permite obtener las condiciones óptimas predichas; la cual tiene los siguientes valores críticos: 0,1 g de AT como fuente de carbono (C); 1 g/L de NaNO₃ (N) y 29,09 mL de solución del sistema fermentativo (Medio). El valor de actividad específica EX prevista para estas condiciones fue 23,17 U/mg.

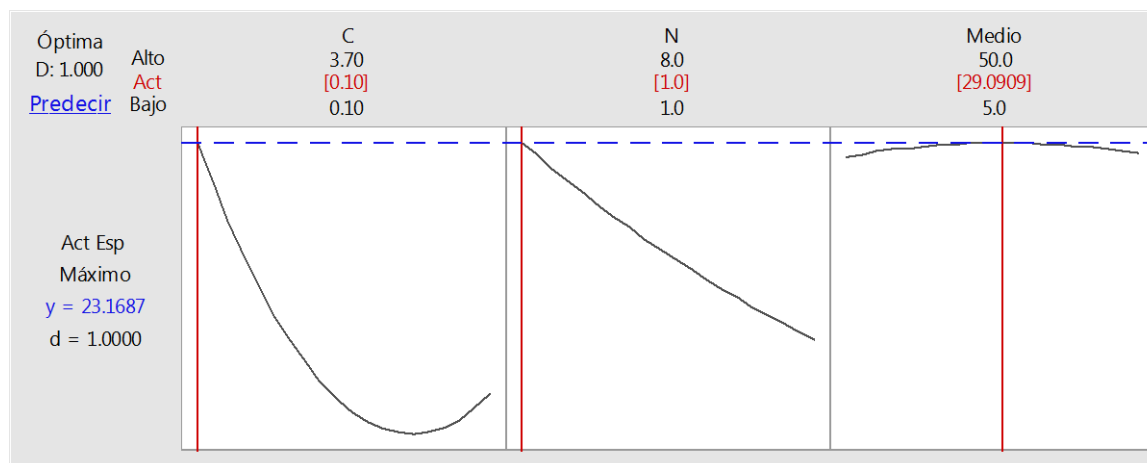


Figura 5.9: Representación gráfica de la función Deseabilidad del sistema optimizado para la respuesta actividad específica EX producida por fermentación de *A. niger* en AT a 30°C.

5.3. Validación

La validación del modelo estadístico ajustado a partir de la función de deseabilidad propuesta, se llevó a cabo mediante la realización de cinco experimentos independientes en las condiciones óptimas indicadas por el sistema. El promedio de los valores de actividad específica EX obtenida fue de 24 ± 1 U/mg, el cual se encuentra incluido en los rangos de validación informados.

5.4. Escalado de la fermentación optimizada

El escalado consecutivo de la producción de las enzimas del complejo xilanolítico se realizó manteniendo constante la geometría y relación diámetro/volumen del líquido lo cual permitió que la aeración del sistema fermentativo en todos los casos sea adecuada y constante. Como puede observarse en la Tabla 5.4 el volumen de fermentación se escaló 40 veces, manteniendo el valor de actividad específica EX prácticamente constante.

Tabla 5.4: Resultados del escalado de la fermentación de *A. niger* a 30°C y 125 rpm empleando afrechillo de trigo.

Volumen Cultivo (ml)	Actividad específica EX (U/mg)	Diámetro/altura líquido
30	24,03	6,4
60	23,10	4,8
120	23,07	4,8
600	25,05	4,8
1200	25,42	4,7

5.5. Reutilización de los residuos de la fermentación optimizada

La bioeconomía surge como un nuevo paradigma que comprende la convergencia de las nuevas tecnologías en los sectores productivos tradicionales, implicando una etapa de transición que sustituiría los modelos de industrialización existentes. En la actualidad, el foco de las discusiones se orienta a incrementar las productividades en el marco de una mayor sostenibilidad económica, social y ambiental. Esta nueva perspectiva propone desarrollar bucles de reaprovechamiento de los flujos de materia y energía derivados de los procesos productivos, conduciendo al uso más eficiente de la energía, como también en la transformación de los residuos generados hacia otras formas de productos.

Durante un proceso productivo en cada una de las etapas se generan desechos. Este trabajo de tesis se enmarca en el concepto de economía circular, y por este motivo en cada etapa se procuró analizar la factibilidad de reutilizar los residuos generados dentro de la misma cadena productiva o para su aprovechamiento en otros sectores industriales.

En esta sección, se evaluó la reutilización del residuo sólido obtenido de la filtración del extracto enzimático producto de la fermentación optimizada (EEO). Estos residuos pueden ser tratados mediante un proceso de compostaje con el fin de obtener compost, un producto estable y rico en nutrientes capaz de devolver al suelo sus características orgánicas. Otras estrategias consisten en su utilización como alimento animal ya que se encuentra enriquecido en proteína y parcialmente hidrolizado facilitando su digestión.

Sin embargo, con el objetivo de promover un mayor valor agregado, se incubó el residuo sólido obtenido de la producción de enzimas, el cual contiene además del material

lignocelulósico parcialmente hidrolizado por la acción enzimática, micelios y conidios de *A. niger* de la fermentación previa. Se evaluaron dos sistemas, con y sin re-inoculación.

En los sistemas sin inoculación no se observó crecimiento fúngico mientras que en los sistemas re-inoculados se observó crecimiento del micelio. Sin embargo, en estos últimos sistemas, no fue posible determinar actividad enzimática incluso hasta el séptimo día de fermentación, probablemente debido a que la germinación de los conidios de *A. niger* depende de las características del sustrato empleado para el crecimiento, cuanto mayor es la cantidad de disacáridos y monosacáridos presentes en el sistema, como se describió en el capítulo precedente, pueden actuar como inhibidores de la producción de enzimas que hidrolizan los polímeros de la pared celular (Gutiérrez-Rojas, Moreno-Sarmiento, and Montoya 2015)

Al presente, investigadores de nuestro instituto, analizan la estabilidad de la formulación de detergentes elaborados con biosurfactantes para su empleo en detergentes comerciales y jabones. La producción de biosurfactantes se basa en la fermentación de *Bacillus subtilis* empleando medios de cultivo de bajo costo conteniendo subproductos de la industria regional. El crecimiento de esta especie requiere del agregado de *Saccharomyces cerevisiae* como fuente de micronutrientes y se está evaluando su sustitución por el residuo sólido obtenido de la producción del EEO obtenido en este trabajo de tesis.

CAPÍTULO 6 - Caracterización del Extracto Enzimático Optimizado

6.1. Caracterización fisicoquímica

El sistema de identificación morfológica para clasificar las especies del género *Aspergillus*, propuesto por Klich y Pitt, describe dentro de las principales características macroscópicas la presencia de pigmentos difusibles (Klich and Pitti 1988). El EEO obtenido en este trabajo es translúcido y de color rosa pálido debido a pigmentos secretados por *A. niger* durante su crecimiento. La densidad del EEO fue 1,003 g/L, el pH fue 5,00 y la conductividad 0,411 S/m, siendo la actividad de las EX 5,02 U/mL y las EC 0,87 U/mL.

6.2. Espectrometría de masa

Algunos autores como Lu y Shi han descrito las proteínas que componen el secretoma de *A. niger*, sin embargo, no se han encontrado trabajos previos que lo describan para extractos enzimáticos obtenidos como producto de la fermentación en afrechillo de trigo (Shi et al. 2016; Lu et al. 2010). En este caso, en el EEO fueron detectadas un total de 73 enzimas, siendo muchas de ellas enzimas hidrolíticas involucradas en la degradación, de polímeros como la lignocelulosa o el almidón.

En la Tabla 6.1 se resumen las proteínas extracelulares identificadas como enzimas hidrolíticas implicadas en la degradación de los polímeros de las células vegetales del subproducto de la industria harinera empleado en las fermentaciones. Se incluyen doce enzimas del complejo xilanolítico y nueve pertenecientes al complejo celulolítico.

Además de las proteínas extracelulares descritas anteriormente, se identificaron seis proteínas intracelulares, cada una de ellas con una abundancia relativa menor al 1%. Por ejemplo, se identificó la enzima β -1,3-glucanosiltransferasa responsable del alargamiento de las cadenas de 1,3- β -glucano durante la síntesis de la pared celular fúngica y la enzima Catalasa R que protege las células contra el daño oxidativo, involucrada en la biodegradación de la lignina. Ambas proteínas intracelulares cumplen importantes funciones en el metabolismo proteico y energético, esenciales para la función fisiológica fúngica normal.

La presencia de proteínas intracelulares, sugiere un daño durante la división celular o durante la obtención del EEO. Las mismas enzimas intracelulares fueron encontradas en

los extractos obtenidos de la fermentación de *A. niger*, en harina de canola y salvado de trigo por otros autores como Shi y sus colaboradores (Shi et al. 2016).

Tabla 6.1: Enzimas hidrolíticas del EEO de *A. niger* identificadas por espectrometría de masa.

N° de acceso	Proteína	PM [kDa]	pI	Abundancia relativa (%)
Enzimas xilanolíticas				
A2Q7I0	endo- β -1,4-xilanasa B (xlnB)	24,0	5,45	0,5
A2QFV7	endo- β -1,4-xilanasa C (xlnC)	35,5	6,65	6,0
A2QA27	exo- β -1,4-xilosidasa xlnD (xlnD)	87,2	4,89	0,9
A2QFV9	α -L-arabinofuranosidasa axhA (axhA)	35,8	4,86	15,2
A2R511	α -L-arabinofuranosidasa B (abfB)	52,5	4,44	2,4
A2R3X3	α -glucuronidasa A (aguA)	93,7	5,38	0,1
A2QAN3	β -galactosidasa A (lacA)	109,6	5,21	1,5
A2QEJ9	α -galactosidasa B (aglB)	48,8	5,08	1,6
A2QSY5	feruloil esterasa A (faeA)	30,5	4,55	1,9
A2R0Z6	feruloil esterasa B (faeB)	57,2	5,2	0,2
A2QYU7	feruloil esterasa C (faeC)	28,6	5,02	0,7
A2QTU5	α -xilosidasa A (axlA)	82,5	5,66	0,1
Enzimas celulolíticas				
A2QQ99	glucanasa (An08g01760)	42,1	4,31	0,3
A2R322	endo- β -1,4-glucanasa A (eglA)	25,9	4,64	1,0
A2QPC3	endo- β -1,4-glucanasa B (eglB)	36,5	4,55	0,7
A2R5N0	endo- β -1,4-glucanasa D (eglD)	42,0	5,63	0,1
A2RAL4	β -glucosidasa A (bglA)	93,2	4,78	4,2
A5ABF5	β -glucosidasa M (bglM)	82,1	4,74	2,4
A2QPG2	β -1,4-D-glucan celobiohidrolasa A (cbhA)	48,2	4,32	0,1
A2QAI7	β -1,4-D-glucan celobiohidrolasa B (cbhB)	56,2	4,3	4,0
A2QYR9	β -1,4-D-glucan celobiohidrolasa C (cbhC)	48,1	4,53	0,1

Número de acceso: corresponde al identificador único asignado a la proteína mediante la base de datos utilizada para generar el informe. PM: peso molecular. pI: punto isoeléctrico.

6.3. Análisis de la estabilidad de las enzimas del EEO

El empleo de las enzimas el complejo xilanolítico, como se mencionó en la introducción, incluye la bioconversión de material lignocelulósico y residuos agroindustriales en azúcares solubles, el tratamiento de jugos, la producción de vino y cerveza, extracción de aceite y mejora de la digestibilidad del alimento para animales

(Biely, Markovič, and Mislovičová 1985; Bajpai 2014; Bhardwaj, Kumar, and Verma 2019), por ese motivo es importante analizar el efecto de la temperatura, pH, sales o cosolutos (estabilizantes) cuyo agregado es clave para su comercialización y almacenamiento.

6.3.1. Efecto de la temperatura

Se incubó el EEO a diferentes temperaturas durante 96 hs., las determinaciones de actividad enzimática se realizaron a los 30 min y cada 24 hs. (Figura 6.1).

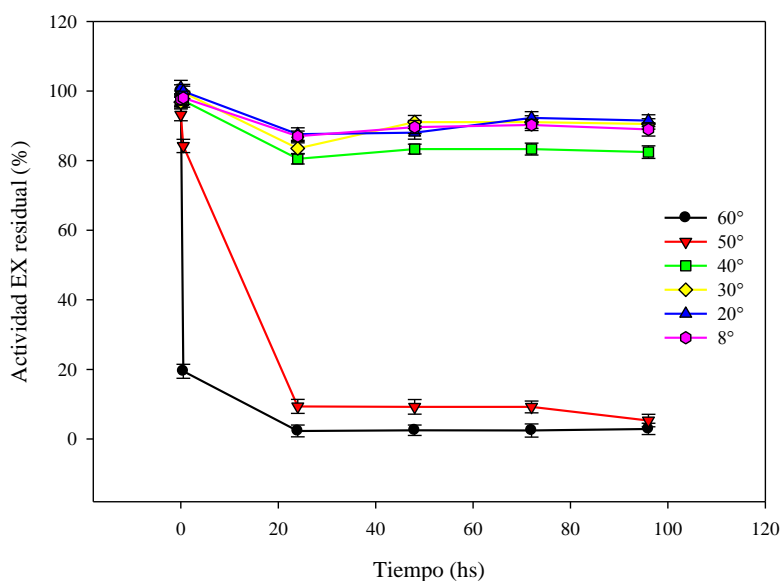


Figura 6.1: Efecto de la temperatura sobre la estabilidad térmica de las EX del EEO de *A. niger*.

Puede apreciarse que la actividad de las EX disminuye aproximadamente un 20% dentro de las primeras 24 hs. y luego se mantiene constante hasta las 96 hs. de incubación entre los 8°C y 40°C. Sin embargo, a mayores temperaturas se evidencia una disminución de la actividad enzimática respecto del valor inicial, decae un 30% a los 30 minutos y un 90% a partir de las 24 hs. de incubación a 50°C, mientras que la disminución de la actividad enzimática respecto del valor inicial fue de 90% a los 30 minutos de incubación a 60°C.

Estas observaciones se correlacionan con trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, en los que se analizaron los espectros de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano (190 - 240 nm) de la enzima endo- β -1,4-xilanasas de *A. niger* comercial (Megazyme) en *buffer* KPi 50 mM pH 6,00 a diversas temperaturas. Se observó que a 25°C la enzima posee una estructura predominante de tipo lámina β con una banda positiva a 197-201 nm

y una banda negativa a 215-225 nm característica de la mencionada glicohidrolasa. El aumento de temperatura hasta 50°C no provocó cambios apreciables en los espectros de la enzima, indicando que la proteína conserva su estructura lámina β . Sin embargo, por encima de 60°C se pudo apreciar un cambio en la forma de los espectros, evidenciando una alteración de la estructura secundaria de la proteína con una pérdida de actividad superior al 95% de la actividad inicial (D. B. D. B. Loureiro, Romanini, and Tubio 2016). Probablemente la disminución de actividad de las EX en el EEO se deba a que a mayor temperatura las enzimas del complejo xilanolítico pierden parte de su integridad biológica y en consecuencia su estabilidad por cambios conformacionales que podrían afectar su sitio activo.

La actividad de las EX en el EEO a 60°C fue superior a la observada para la enzima endo- β -1,4-xilanasa comercial, principal componente del complejo xilanolítico, debido a un probable efecto estabilizante del resto de las proteínas presentes en el EEO. Un comportamiento similar fue observado por Dobrev en un extracto enzimático producido por la cepa de *A. niger* B03 (Dobrev et al. 2009).

6.3.2. Cinética de inactivación térmica

La inactivación térmica es un efecto progresivo. El decaimiento de la actividad enzimática en función del tiempo a una temperatura presenta un comportamiento exponencial, que se caracteriza con la constante de velocidad de desactivación térmica de primer orden (K_d). En este trabajo, se determinó K_d para las EX a diferentes temperaturas y se observó que aumentaba indicando que las enzimas son menos termoestables al aumentar la temperatura (Tabla 6.2).

Otra característica importante en la estabilidad de una enzima es la vida media ($t_{1/2}$), parámetro que indica el tiempo requerido para que la actividad enzimática decaiga a la mitad del valor inicial bajo las condiciones de experimentación. Entre los 8 y 30°C el valor de dicho parámetro fue superior a los 100 días, mientras que por encima de 40°C disminuyó hasta los 15 min (Tabla 6.2). Otros autores como Díaz han observado que las EX producidas por *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 tienen un tiempo de vida media a 50°C de 2,75 hs. y a 60°C de tan solo 7,21 minutos (Belén et al. 2011). En consecuencia, las EX del EEO analizadas en este trabajo se muestran más estables a altas temperaturas que las mismas enzimas producidas por otra especie del género *Aspergillus*.

Tabla 6.2: Parámetros asociados al proceso de inactivación térmica.

Temperatura (°C)	K_d (min^{-1})	$t_{1/2}$	D (min)	ΔH° (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)	ΔS° (kJ/molK)
20	$1,345 \times 10^{-6}$	358 días	1711381	212,14	112,62	0,339
30	$3,731 \times 10^{-6}$	129 días	617075	212,05	113,98	0,323
40	$2,027 \times 10^{-5}$	24 días	113552	211,97	113,42	0,314
50	$1,226 \times 10^{-3}$	10 hs.	1878	211,89	106,11	0,327
60	$4,708 \times 10^{-2}$	15 min	49	211,80	99,38	0,337

El tiempo de reducción decimal (D) requerido para reducir un 90% la actividad inicial de las EX fue superior a los 20°C, disminuyendo considerablemente conforme aumentaba la temperatura. Por otra parte, el valor de la temperatura necesaria para reducir D un ciclo logarítmico (Z) se relaciona inversamente con la sensibilidad al calor de las enzimas, en general para las EX fue 8,62°C sugiriendo que en el EEO poseen una sensibilidad relativa al aumento de la temperatura.

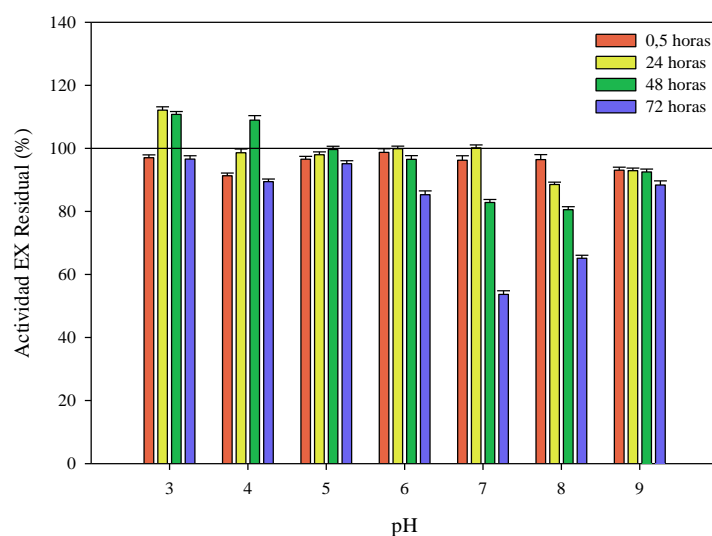
La energía de termoinactivación (E_d) de las EX fue 214,58 kJ/mol y el rango de desnaturalización entálpico (ΔH°) 212,14 - 211,80 kJ/mol entre los 20 y 60°C, indicando una ligera tendencia a disminuir con el aumento de la temperatura en el rango analizado. Los altos valores de ΔH° obtenidos para la inactivación térmica de las EX indican que las mismas experimentan un cambio considerable en la conformación durante la desnaturalización, conforme lo analizado en la sección precedente. El hecho de que el valor de ΔH° disminuya con el aumento de la temperatura revela que se necesita menos energía para desnaturalizar la enzima a las mayores temperaturas ensayadas. El valor de la energía libre de desnaturalización térmica (ΔG°) para las EX fue de 112,62 kJ/mol a 20°C, disminuyendo con el aumento de la temperatura.

6.3.3. Efecto del pH

Para determinar la influencia del pH sobre la estabilidad de las EX y EC se incubó el EEO a 20°C en diferentes soluciones amortiguadoras durante 72 hs., determinándose la actividad residual a los 30 min y cada 24 hs. Algunos autores como Díaz (Belén et al. 2011) han observado que tanto las EX como las EC del género *Aspergillus*, son estables en

el rango de pH 3 a 10 por 30 minutos (Belén et al. 2011). Sin embargo, en las condiciones en las que se llevó a cabo este experimento a pHs superiores a 7, se observaron actividades residuales superiores al 80 % hasta las 48 horas para las EX, y hasta las 24 hs. para las EC. A pHs superiores a 7 y a tiempos mayores a los indicados, se apreciaron disminuciones más notorias en la actividad (< 50 %). En general, puede concluirse que ambas enzimas resultaron estables en el rango de pH analizado y por un período de tiempo amplio, representando una ventaja considerable en múltiples aplicaciones como en la clarificación de jugos naturales, donde el pH debe variarse considerablemente (Pal and Khanum 2011).

A)



B)

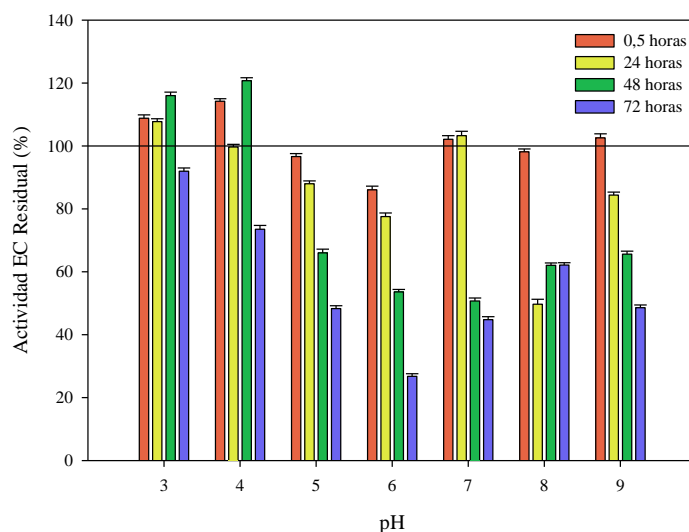


Figura 6.2: Efecto del pH sobre la estabilidad de A) EX y B) EC del EEO de *A. niger* a 20°C.

6.3.4. Efecto de sales

En concordancia a lo reportado por otros autores, se observó que la actividad de las EX disminuyó en presencia de 0,1 M de las sales KCl, CuSO₄, FeSO₄ y (NH₄)₂SO₄, mientras que se mantuvo constante en el resto de las sales ensayadas (Figura 6.3) (Dobrev et al. 2009; Belén et al. 2011). Por otra parte, la actividad de las EC decreció hasta un 50% en presencia de CaCl₂ y aumentó para el resto de las sales, en particular para NaCl, KCl, FeSO₄ y (NH₄)₂SO₄. En general, la actividad residual fue superior al 80 %, salvo en CuSO₄ para las EX y en CaCl₂ para las EC.

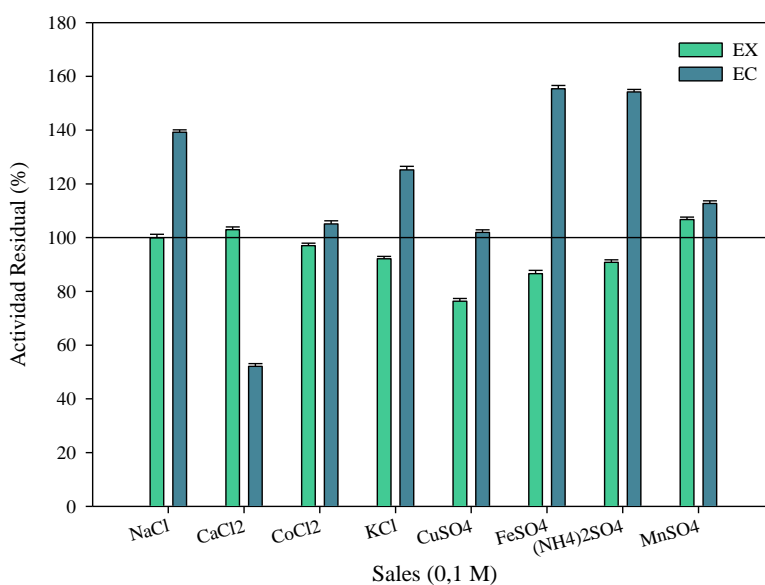
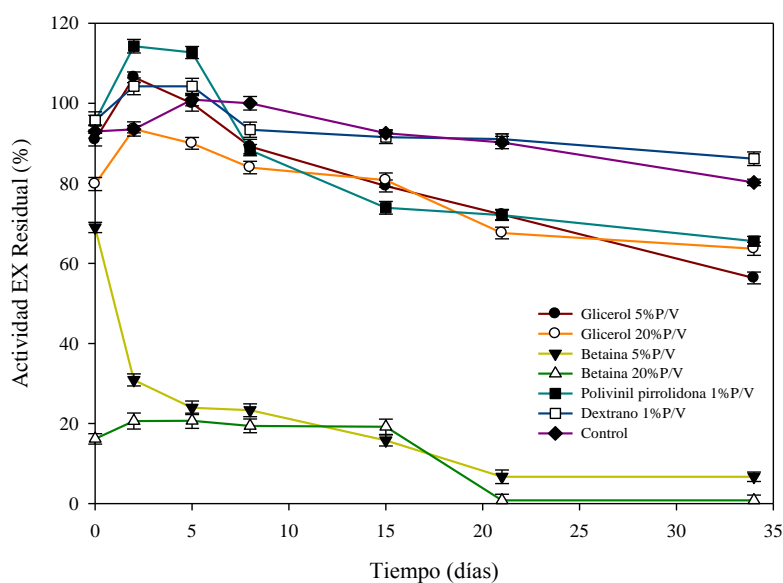


Figura 6.3: Efecto de la presencia de sales sobre la estabilidad de las EX y EC del EEO de *A. niger* a los 30 min de incubación a 20°C.

6.3.5. Efecto de estabilizantes

Con el objetivo de diseñar una estrategia para la conservación y comercialización de las enzimas del EEO se analizó el comportamiento de diversos estabilizantes como: glicerol, betaína, polivinilpirrolidona y dextrano a diferentes concentraciones y se determinó la actividad enzimática por un periodo de 34 días.

A)



B)

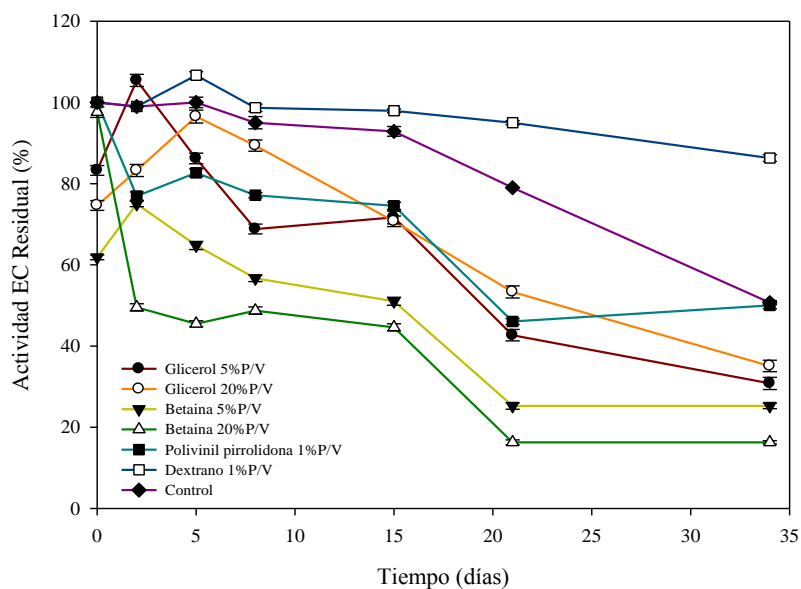


Figura 6.4: Efecto de la presencia y concentración de estabilizantes sobre actividad A) EX y B) EC del EEO de *A. niger* a diferentes tiempos de incubación a 20°C.

En la Figura 6.4 A se observa que la actividad de las EX en presencia de dextrano se mantiene prácticamente constante y ligeramente superior al control (en ausencia de estabilizante) después de los 20 días de incubación. El agregado de glicerol o polivinil pirrolidona mostró una disminución del 20% de la actividad de las EX respecto de la actividad inicial a partir de los 15 días de incubación. En presencia del 5%P/V de betaína, se observó una disminución del 80% de la actividad al segundo día de incubación mientras que al 20%P/V disminuyó la actividad y no fue posible determinarla transcurridos los 20 días.

Los solutos analizados afectaron también la actividad EC (Figura 6.4 B). En ausencia y presencia de los estabilizantes la actividad decayó en forma sostenida después de 15 días, sin embargo, se destaca un efecto estabilizador del dextrano.

En consecuencia, no se requiere el agregado de estabilizantes para las EX, pero si para las EC presentes en la muestra.

6.3.6. Estudio la estabilidad de la EX del EEO en presencia de la Fase superior e inferior de SBA PCF/NaCit.

Se determinó la influencia de la composición de la fase inferior y superior de un sistema bifásico compuesto por UCON y NaCit y también de un sistema formado por PEG1450 y NaCit cuya composición se describe en la sección 3.2.11.5 en la actividad de las EX haciendo su seguimiento a través del tiempo. En la Tabla 6.3 se muestran los resultados del ensayo. Se observa que no hay diferencias considerables entre las actividades medidas en fase superior e inferior al inicio de la incubación. Además, la actividad de las EX permanece constante en ambas fases durante el período ensayado, salvo en la FI del sistema UCON/NaCit en la cual a partir de los 27 días de incubación se presenta una disminución de la actividad del 27%. Estos resultados sugieren que los sistemas bifásicos acuosos formados por PEG y NaCit serían más adecuados para la extracción y purificación de las EX a partir del EEO.

Tabla 6.3: Efecto de la incubación a en fase superior e inferior de SBA UCON/NaCit y PEG1450/NaCit sobre la estabilidad de las EX del EEO de *A. niger* a 20°C.

Días	UCON/NaCit		PEG1450/NaCit	
	FS	FI	FS	FI
0	4,19±0,01	4,34±0,01	4,6±0,1	4,34±0,07
2	4,35±0,09	4,27±0,07	4,8±0,1	4,43±0,07
5	4,29±0,08	3,96±0,05	4,64±0,03	4,62±0,02
12	4,53±0,04	3,87±0,03	4,96±0,02	4,41±0,02
16	4,43±0,03	3,83±0,03	4,89±0,02	4,18±0,02
21	4,39±0,02	3,79±0,02	4,98±0,05	4,16±0,01
27	4,51±0,01	3,17±0,04	4,96±0,02	4,18±0,04

De la caracterización del EEO se puede concluir que es rico en las enzimas que componen tanto al complejo xilanolítico como al celulolítico. Además, se observó que son estables hasta los 40°C sin pérdida de actividad hasta cinco días aproximadamente. Siendo más estables que la enzima endo- β -1,4-xilanasa hasta los 60°C lo cual fue corroborado por la cinética de inactivación térmica.

Además, el EEO resulto estable en el rango de pH 3,00-9,00 a 20°C hasta aproximadamente 72hs. no requiriendo el agregado de cosolutos.

El análisis de la estabilidad en los SBAs compuestos por 15%P/P UCON/7%P/P NaCit y 15,5%P/P PEG1450/13,6%P/P NaCit indica que los mismo podrían ser empleados para la extracción de proteínas a partir del EEO ya que no afectan las propiedades catalíticas de las mismas.

6.4. Determinación de los parámetros cinéticos

Se llevó a cabo la caracterización cinética de las EX y EC del EEO y de la enzima endo- β -1,4-xilanasa y endo- β -1,4-glucanasa de *A. niger* comercializadas por Megazyme con el fin de poder determinar y analizar similitudes en sus parámetros cinéticos. Se realizaron mediciones de actividad en presencia de diferentes concentraciones de xilano de haya y carboximetilcelulosa según corresponda.

La velocidad de reacción inicial exhibió una respuesta hiperbólica rectangular respecto de la concentración de sustrato utilizada verificando el cumplimiento del modelo cinético de Michaelis-Menten (curva de saturación) y su respectiva linealización de Lineweaver-Burk, tanto para las enzimas del complejo xilanolítico como para las del celulolítico. A partir de las gráficas obtenidas, fue posible determinar los parámetros cinéticos de la reacción: velocidad máxima (V_{max}) y constante de Michaelis-Menten (K_m). En la Figura 6.5 A y B puede observarse la cinética de saturación de xilano de haya para la reacción enzimática catalizada por las EX del EEO y por endo-1,4- β -xilanasa comercial.

Para las EC y EX del EEO los parámetros cinéticos aparentes de la reacción fueron V_{max} = 3,16 y 0,76 $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$ y K_m = 27,34 y 3,71 g/L respectivamente. Los valores de V_{max} y K_m para endo- β -1,4-xilanasa fueron 1,5 y 2,2 veces superior que para las EX del EEO, esta diferencia es debida a que se están comparando valores correspondientes a una mezcla compleja (EEO) con los de la enzima pura. Sin embargo, el valor de K_m aparente para EX del EEO observado en este trabajo, es similar al informado por otros autores como Guo (3,00 g/L) y Dobrev (8,19 g/L) y además se incluye en el rango 2,95 - 8,19 g/L

publicado en la base de datos de información molecular y bioquímica sobre enzimas y rutas metabólicas BRENDA del Centro Nacional de Biotecnología de Alemania (Guo et al. 2013; Centro Nacional de Biotecnología Alemán 1987; Dobrev et al. 2009).

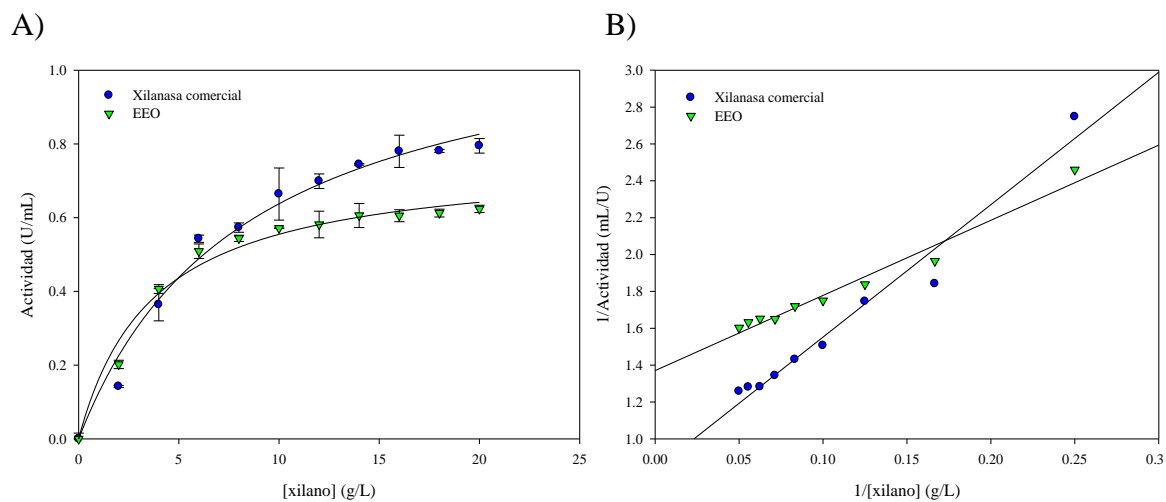


Figura 6.5: Gráficos que muestran la cinética de saturación de xilano de haya para la reacción enzimática catalizada por EX del EEO y endo-1,4- β -xilanasas. A) Gráfico de Michaelis-Menten B) Gráfico de Lineweaver-Burk.

CAPÍTULO 7 - Caracterización de la Extracción de EX

El desarrollo de técnicas y métodos para la separación y purificación de macromoléculas biológicas como las proteínas ha sido un requisito previo importante para muchos de los avances realizados en biociencia y biotecnología en las últimas décadas. Para desarrollar un proceso eficiente y económico que permita obtener proteína en cantidad y calidad suficientes, deben seleccionarse las operaciones unitarias más adecuadas para cada etapa del proceso de manera que estén integradas y de modo que el producto final esté suficientemente purificado a un costo mínimo, generando residuos que no provoquen impactos ambientales negativos.

En este capítulo se caracterizan la precipitación salina, la extracción líquido-líquido empleando sistemas bifásicos acuosos y la cromatografía iónica para diseñar una estrategia extractiva integrada y eficiente que maximice el rendimiento y el factor de purificación minimizando el número de operaciones unitarias y el tiempo del proceso.

7.1. Precipitación salina de las EX

Cuando se desea aislar una proteína a partir de suspensiones biológicas, es común realizar un paso inicial de clarificación consistente en la eliminación de todo el material particulado. Esto puede ser llevado a cabo por decantación espontánea, por agregado de agentes clarificantes, por filtración o centrifugación. La precipitación fraccionada por sal se emplea sobre el extracto enzimático crudo o clarificado, para obtener una purificación inicial.

La sal más utilizada es el sulfato de amonio, debido a su alta solubilidad en agua (aproximadamente 4 M en la saturación), bajo calor de solución, menor densidad de las soluciones saturadas (1,235 g/mL) que la de las proteínas, lo que permite su recolección por centrifugación, y la naturaleza esencialmente inocua a las proteínas de sus iones constituyentes. Las concentraciones de la sal se expresan en términos de porcentaje de saturación (Cutler 2004).

El EEO se precipitó fraccionalmente con sulfato de amonio. La precipitación se llevó a cabo en cuatro etapas consecutivas con una saturación del 20% al 80% de la sal. En la sección 6.3.4 podría afectar la estabilidad de las enzimas del EEO e incluso podría interferir con las determinaciones de actividad, por ello, las muestras fueron dializadas para remover la sal (Prado-Barragán et al., 1999; Nelson & Cox, 2008). Se determinó la actividad de las EX y EC, como también la concentración de PT en los sobrenadantes

recuperados, obteniéndose los rendimientos (%R) y el factor de purificación (FP) que se presentan en la Tabla 7.1.

Puede observarse que en las fracciones correspondientes a la precipitación con sulfato de amonio en el rango de 20-60% de saturación, el contenido de proteínas totales, así como de las EX y EC fueron menores que en la fracción de precipitación con 80%. En esta última tanto el %R como el FP para las EC fueron superiores a los de EX, indicando que coexisten en una misma fracción y que la técnica posee baja selectividad en la separación.

El rendimiento de las EX (50,8%) y el FP (1,45) de la precipitación directa al 80% de saturación fue superior al observado en la misma fracción durante la precipitación consecutiva. Estas observaciones fueron corroboradas por el análisis de SDS PAGE (Figura 7.1). En todos los casos se detectó una banda principal indicada por la flecha horizontal la cual puede corresponder a las enzimas endo- β -1,4-xilanasas (35.500 Da) y endo- β -1,4-glucanasas (36.500 Da), coincidentes con los datos obtenidos por GC-masa (Tabla 6.1). De acuerdo a lo esperado, en la fracción de precipitación al 80% de saturación (línea 5), se aprecia un mayor número de bandas correspondientes a las proteínas provenientes del EEO, respecto a las líneas 2 a 4 (precipitaciones del 20 al 60% de saturación).

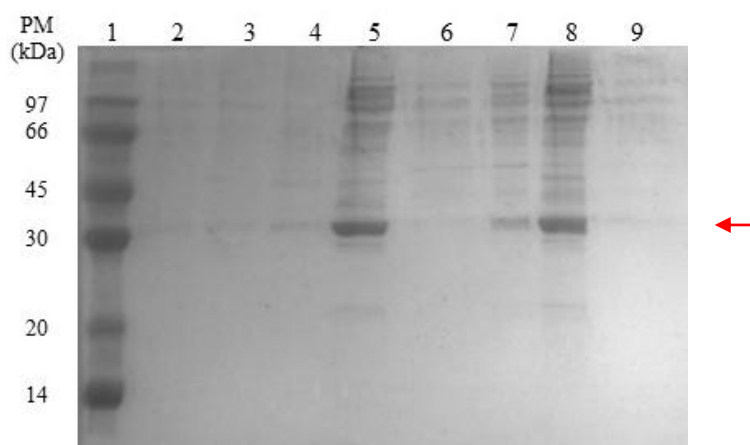


Figura 7.1: Análisis SDS-PAGE de las proteínas precipitadas con sulfato de amonio. Línea: 1- Marcadores de PM; 2- 20%; 3- 40%; 4- 60%; 5- 80%; 6- sobrenadante de la fracción 80%; 7- EEO; 8- precipitación directa 80%; 9- sobrenadante de la precipitación directa 80%.

Tabla 7.1: Resumen de purificación de las EX utilizando precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Temperatura 4°C

	PT			EC					EX				
	(mg/mL)	(mg)	%R	(U/mL)	(U)	A. E. (U/mg)	%R	FP	(U/mL)	(U)	A. E. (U/mg)	%R	FP
EEO	0,28	2,84	100	1,81	18,05	6,36	100	1,00	4,72	47,16	16,60	100	1,00
20%	0,06	0,06	2,04	0,66	0,66	11,20	3,65	1,76	0,09	0,09	1,55	0,19	0,093
40%	0,09	0,11	2,25	0,78	0,78	12,18	4,32	1,92	0,46	0,46	7,18	0,97	0,43
60%	0,13	0,13	4,57	0,82	0,82	6,31	4,54	0,99	0,84	0,84	6,46	1,78	0,38
80%	0,80	0,80	28,16	9,10	9,10	11,37	50,41	1,78	18,25	18,25	22,81	38,69	1,37
SN	0,13	1,80	63,38	0,45	6,39	3,55	35,44	0,55	1,97	27,59	15,32	58,50	0,92

A.E: Actividad Especifica. SN: sobrenadante.

La precipitación salina fraccionada propuesta implica dos pasos principales, la precipitación con sulfato de amonio y el desalado el que puede realizarse por diálisis con un paso extra de acondicionamiento para obtener la concentración de la enzima requerida, o por ultrafiltración, mediante la cual es posible eliminar la sal y concentrar en un único paso. Sin embargo, la integración de los mismos involucra un período de tiempo de procesamiento superior a 10 horas con un bajo FP_{EX} (0,9), R_{EX} (50%) y capacidad separativa siendo necesario prever el tratamiento de los descartes con alto contenido de sulfato de amonio. En consecuencia, sería apropiado evaluar otras técnicas de extracción que permitan integrar operaciones unitarias mejorando la performance de purificación.

7.2. Extracción líquido - líquido empleando sistemas bifásicos acuosos de EX

La etapa de clarificación puede omitirse en la extracción con SBAs, ya que el material sólido tiende a acumularse rápidamente en la interfase por un fenómeno de tensión interfacial. Sin embargo, es importante mencionar que el EEO optimizado no presentó material particulado que pudiese precipitar en la interfase de los SBA.

7.2.1. Extracción de los pigmentos del EEO

Los sistemas bifásicos acuosos empleados para analizar el efecto de diferentes variables sobre el patrón de reparto de las enzimas del EEO fueron seleccionados a partir de diagramas binodiales presentes en la bibliografía. Se consideraron diferentes sistemas bifásicos acuosos PCF/sal, formados por UCON o PEGs de diferentes pesos moleculares y las sales NaCit o KPi. En todos los SBAs formados por UCON, luego de separadas las fases, se observó que la FS rica en dicho polímero se encontraba coloreada, mientras que la FI rica en sal era incolora, sugiriendo que los pigmentos presentes en el EEO se reparten principalmente hacia la FS.

Las observaciones fueron corroboradas realizando espectros de absorción de la fase superior del SBA compuesto por 15%P/P UCON/7%P/P NaCit al que se agregó agua en vez de EEO y el cual se utilizó como control, y de la FS luego de realizado el reparto de 0,5%P/P de EEO. La Figura 7.2 representa el espectro diferencial. Se observa un pico de absorción a 350 nm atribuible a los pigmentos presentes en la FS rica en UCON. El espectro de la FI no presentó alteraciones (datos no mostrados).

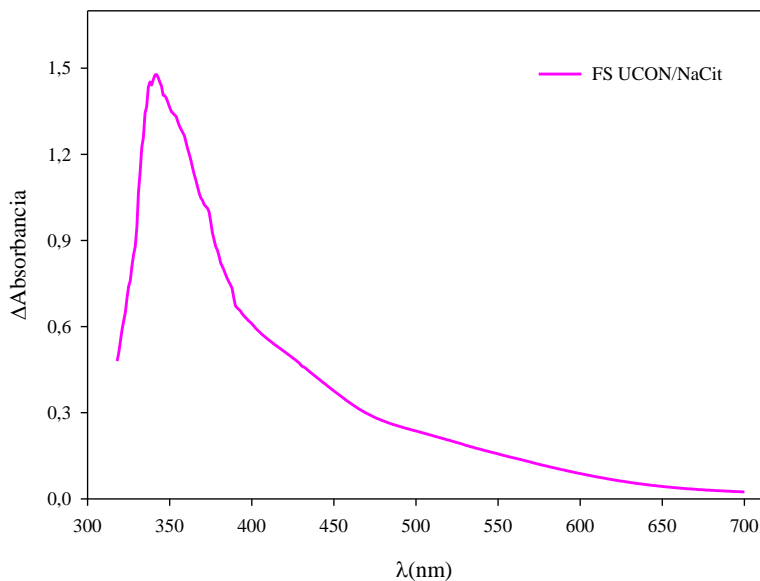


Figura 7.2: Espectro diferencial de absorción de la FS del sistema UCON/NaCit con EEO respecto de la misma FS sin EEO. Temperatura 20°C.

7.2.2. Determinación de los parámetros que afectan el reparto de EX, EC y PT

La distribución desigual de proteínas entre dos fases acuosas se produce debido a un delicado juego de interacciones entre las proteínas y las otras especies químicas presentes en las dos fases que coexisten en equilibrio (Rito-Palomares and Benavides 2017). Algunas propiedades de las fases, como la naturaleza química de los componentes, la masa molar, las concentraciones de sal y polímero, el pH, la temperatura y las longitudes de las líneas de unión influyen en las interacciones moleculares y, en consecuencia, son determinantes para los valores de los coeficientes de reparto de las proteínas.

Inicialmente se evaluó el reparto enzimático del EEO de actividad xilanolítica 5,02 U/mL y celulolítica 0,87 U/mL. Se utilizaron SBAs formados por los polímeros de cadena flexible UCON y PEG1450 como también las sales NaCit y KPi. Las composiciones totales iniciales empleadas fueron determinadas acorde a los diagramas binodiales y se indican para cada sistema en particular (Tubio et al. 2009; Tubio, Pellegrini, Nerli, and Pico 2006; D. B. D. B. Loureiro, Romanini, and Tubio 2016). Además, se analizó el efecto de la concentración de EEO liofilizado y el agregado de NaCl. Para cada sistema se utilizó la misma LLU (35%P/P) y una relación de V_{sup}/V_{inf} igual a la unidad. En la Tabla 7.2 se resumen las composiciones totales iniciales de los sistemas y los valores de rendimiento obtenidos en cada una de las fases de los SBAs ensayados.

7.2.3. Efecto del PCF

En los sistemas formados por el polímero UCON, no fue posible determinar la concentración de EC en la fase superior debido a un desplazamiento casi unilateral de dichas enzimas del equilibrio de reparto hacia la FI rica en sal. Las EX tuvieron un comportamiento similar a las EC, mientras que otras proteínas presentes en el EEO se repartieron hacia la fase superior del SBA con un %R próximo al 25% el cual disminuye conforme aumenta la concentración de liofilizado empleado. De este modo fue posible concentrar las EX y EC en la FI del sistema 1,62 veces aproximadamente respecto del EEO.

Tabla 7.2: Composiciones iniciales de los SBAs empleados y rendimiento en las fases superior e inferior para PT, EC y EX. $V_{sup}/V_{inf}=1$. Temperatura 22°C – LLU 35 %P/P.

SBA	Concentración (%P/P)			Rendimiento (%)					
	PCF	SAL	EEO	PT		EC		EX	
				FS	FI	FS	FI	FS	FI
UCON/NaCit			0,5	25,6	70,5	*	102,5	0,2	99,2
			1	21,5	73,6	*	95,2	1,5	97,8
			1,5	8,1	82,6	*	98,7	8,6	88,5
UCON/Pi	15,0	7,0	0,5	25,9	75,2	*	78,7	0,8	106,9
			1	18,5	78,6	*	82,8	0,2	102,1
			1,5	9,7	82,7	*	101,5	0,4	105,9
PEG1450/NaCit	15,5	13,6	0,5	27,3	74,5	46,1	56,9	83,8	22,5
			1	31,2	70,0	45,1	55,2	70,9	33,1
PEG1450/Pi	16,3	12	0,5	45,5	61,1	40,3	55,3	68,4	29,7
			1	32,3	62,0	42,2	55,1	52,1	41,3

* n/d: no determinado por presentar valores inferiores al límite de detección.

En los sistemas formados por PEG y NaCit se observa que el equilibrio de reparto de PT y EC se encuentra más desplazado hacia la FI, mientras que el de EX lo está hacia la FS, enriquecida en PEG, siguiendo un comportamiento similar al de otras proteínas en SBAs en sistemas formados por PEG y sal (Porfiri et al. 2011; Pérez et al. 2015).

De este modo, el sistema UCON/sal resulta muy adecuado para extraer los pigmentos del EEO en la fase superior y concentrar las proteínas de interés en la fase inferior con rendimientos de EX y EC cercanos al 100%, mientras que el sistema formado por PEG/sal sería más adecuado para separar las EX del resto de las proteínas.

7.2.4. Efecto de la sal

El efecto de la sal que forma el sistema sobre el rendimiento de las EX, EC y PT en la extracción líquido-líquido se puede observar en la Tabla 7.2. En general, los valores de %R tanto para PT como para las EX y EC, en todos los SBA ensayados no se observaron variaciones significativas con el empleo de la sal NaCit o KPi. Sin embargo, en los sistemas formados por PEG1450 se observa un comportamiento diferencial de acuerdo a la sal que forma el sistema.

El empleo de la sal NaCit condujo a valores de K_{rEX} mayores con respecto a los sistemas formados con KPi, (datos no mostrados), lo que conduce a una mayor capacidad separativa de las EX respecto del resto de las proteínas ($\beta_{EX/PT}$) y en particular de EC ($\beta_{EX/EC}$). Datos similares se obtuvieron en nuestro laboratorio en el reparto de extractos fúngicos provenientes de cultivos de *A. niger* al emplear como única fuente de carbono la gramínea *Spartina argentinensis* (la cual crece abundantemente en nuestra zona) (Pellieri 2017). Los resultados obtenidos sugieren que la sal que forma el sistema influye en el reparto de las EX cuando se utiliza PEG como PCF, obteniéndose los mejores resultados al emplear NaCit respecto del KPi, que además cuenta con la ventaja de ser una sal biodegradable y no tóxica, siendo un factor importante a tener en cuenta al escalar esta técnica bioseparativa (Cunha and Aires-Barros 2002).

7.2.5. Efecto de la cantidad de EEO

La preparación de un SBA para su utilización en el reparto de moléculas biológicas, implica una serie de pasos que comprende el agregado de una dada cantidad de polímero, de la solución de sal, y de EEO necesarias para alcanzar la composición del sistema deseado. Se analizó el efecto de repartir diferentes cantidades de EEO liofilizado, sobre los parámetros del proceso de purificación en los sistemas PCF/sal ensayados precedentemente (Tabla 7.2). Puede apreciarse que las cantidades de biomasa ensayadas, prácticamente no afectan el porcentaje de proteína blanco recuperada en los sistemas UCON/sal, mientras que en los sistemas PEG1450/sal, el aumento de biomasa

produce una disminución en el rendimiento alcanzado, en consecuencia, en los experimentos posteriores se empleó una concentración de EEO de 0,5%P/P.

7.2.6. Efecto de la longitud de la línea de unión

El aumento en la LLU de un SBA está asociado a un incremento en la diferencia entre las concentraciones de equilibrio superior e inferior de PCF y sal respectivamente. Trabajos previos (Pellegrini Malpiedi, Picó, and Nerli 2011; Tubio et al. 2009) han mostrado que este tipo de variaciones en la LLU conducen a un desplazamiento unilateral del equilibrio de reparto.

Para aquellos SBAs donde la proteína que se reparte presenta afinidad por la FI (K_r menor a la unidad), un aumento de la LLU potenciaría la tendencia de la proteína a repartirse hacia dicha fase. En consecuencia, el K_r debería adoptar valores cada vez más pequeños cuanto mayor sea el valor de la LLU. Por el contrario, en aquellos SBAs donde la proteína tiene mayor afinidad por la FS, (K_r mayores a la unidad), un incremento en la LLU debería dar como resultado valores de K_r mayores. En general, un ligero efecto como el descrito precedentemente fue observado en los SBAs ensayados. Sin embargo, en el sistema PEG1450/NaCit el aumento de la LLU de 35 a 45 % no condujo a un aumento significativo en el K_{rEX} , probablemente debido a que la variación de la composición de fases en el equilibrio no se modifica considerablemente de un sistema a otro.

Tabla 7.3: Composiciones totales de los SBAs empleados y K_r para PT, EC y EX. $V_{sup}/V_{inf}=1$. Temperatura 22°C.

SBA	LLU (%P/P)	Concentración (%P/P)		Kr		
		PCF	SAL	PT	EC	EX
UCON/NaCit	25	14,6	5,4	0,19	*n/d	0,04
	35	15,0	7,0	0,13	*n/d	0,04
	45	22,3	6,4	0,09	*n/d	0,03
PEG1450/NaCit	25	15,6	12,1	0,41	0,88	3,10
	35	15,5	13,6	0,36	0,87	3,60
	45	20,4	13,2	0,28	0,81	3,65

* n/d: no determinado por presentar valores inferiores al límite de detección.

7.2.7. Efecto de la presencia de NaCl

La presencia de sales también puede afectar el valor del K_r modificando el término electrostático de la ecuación de Albertsson (Albertsson 1986) afectando la estructura del agua y las interacciones hidrofóbicas de distinta manera. En la Tabla 7.4 puede observarse el efecto del aumento de la concentración de NaCl para los sistemas PCF/NaCit a pH 5,20.

Tabla 7.4: Efecto de la fuerza iónica del medio sobre el coeficiente de reparto para PT, EC y EX, y capacidad separativa de EX en sistemas PCF/NaCit -LLU 35% P/P pH 5,20. $V_{sup}/V_{inf} = 1$. Temperatura 22°C.

SBA	NaCl (%P/P)	Kr			β	
		PT	EC	EX	EX/EC	EX/PT
UCON/NaCit	0	0,13	0,06	0,04	0,66	0,31
	4	0,09	0,07	0,05	0,68	0,05
	8	0,18	0,16	0,33	1,80	1,83
PEG1450/NaCit	0	0,36	0,87	3,60	4,15	10,02
	4	0,41	0,96	3,80	4,05	9,26
	8	0,49	0,99	3,99	4,03	8,14

Puede apreciarse que la presencia de NaCl en general, provocó un desplazamiento del equilibrio de reparto de PT y las enzimas analizadas hacia la fase superior. Esto concuerda con un efecto de *salting out* que ejerce el NaCl en la fase inferior y que desplaza el equilibrio hacia la fase enriquecida en PEG (D. P. Harris et al. 1998). En los SBA formados por UCON, se observaron variaciones muy notorias de K_r cuando la concentración de NaCl alcanzó el 8%P/P del sistema, sin embargo, su empleo no permitiría recuperar cuantitativamente a las EX como en el sistema PEG1450/NaCit en ausencia de NaCl, el cual fue el que mostró la mejor capacidad separativa respecto del conjunto de proteínas ($\beta_{EX/PT}=10$) como también de las EC ($\beta_{EX/EC}=4,15$).

7.2.8. Efecto del peso molecular del PEG

Para caracterizar el sistema extractivo PEG/NaCit se ensayaron SBAs formados por PEG de pesos moleculares promedios: 600, 1450, 2000 y 4600 y la sal NaCit a pH 5,2 a 22°C. Se seleccionaron aquellos sistemas con la mayor capacidad de recuperar EX

libre de EC, ya que esto permitiría en su principal aplicación en la industria panadera al lograr un adecuado relajamiento de la masa con mayor volumen y apropiada esponjosidad.

Las composiciones iniciales totales y de equilibrio de cada sistema PEG/NaCit ensayado, expresadas en %P/P, se encuentran detalladas en la Tabla 7.5, para cada sistema se utilizó la misma LLU (35%P/P), y una $V_{sup}/V_{inf}=1$. Los sistemas fueron denominados según el peso molecular del polímero que compone el sistema. La información fue extraída de diagramas binodiales reportados en la bibliografía (Tubio, Pellegrini, Nerli, and Pico 2006; D. B. D. B. Loureiro, Romanini, and Tubio 2016). Como puede observarse la fracción de PEG es mayor en la fase superior independientemente del PM y los valores del contenido de agua son parecidos para los diferentes PM, tanto en la FS como en la FI, siendo ligeramente mayores en esta última.

Tabla 7.5: Composiciones iniciales y de equilibrio de sistemas formados por PEG/NaCit de diferentes pesos moleculares empleadas en el reparto del EEO, a pH 5,20. Temperatura 22°C y LLU 35%P/P.

Polímero	Composición total (%P/P)			FS (%P/P)			FI (%P/P)		
	Polímero	NaCit	Agua	Polímero	NaCit	Agua	Polímero	NaCit	Agua
PEG600	20,07	14,90	65,03	35,41	6,14	58,45	4,73	23,67	71,6
PEG1450	15,5	13,6	70,9	33,25	4,81	61,94	2,05	20,29	77,66
PEG2000	17,28	10,78	71,94	33,44	3,59	62,97	1,13	17,97	80,90
PEG4600	17,01	9,17	73,82	33,68	2,83	63,49	0,35	15,50	84,15

En la Figura 7.3 se representan los valores de K_{rEX} y K_{rEC} , en los sistemas previamente descritos, aquellos valores superiores a la unidad estarían indicando una alta afinidad de las enzimas por la FS rica en polímero. Puede observarse que el aumento del peso molecular del polímero condujo a un incremento en el reparto de las proteínas hacia la FI rica en sal (el coeficiente de reparto de las enzimas disminuyó). Este comportamiento se debe a que polímeros de alto peso molecular tienen un mayor volumen excluido efectivo, como se describió en la introducción (sección 1.9.4) que dificulta la disolución de la proteína en la fase donde el polímero predomina (superior) desplazándose su reparto hacia la fase contraria (inferior), pobre en polímero (Forciniti, Hall, and Kula 1991).

Las EX se concentran mayoritariamente en la FS en todos los sistemas ensayados, exceptuando el sistema formado por PEG4600, para el cual el K_r fue inferior a la unidad (0,44). Mientras que para la enzima EC, en todos los sistemas formados por PEG de peso molecular iguales o superiores a 1450, el valor de K_r es menor a la unidad.

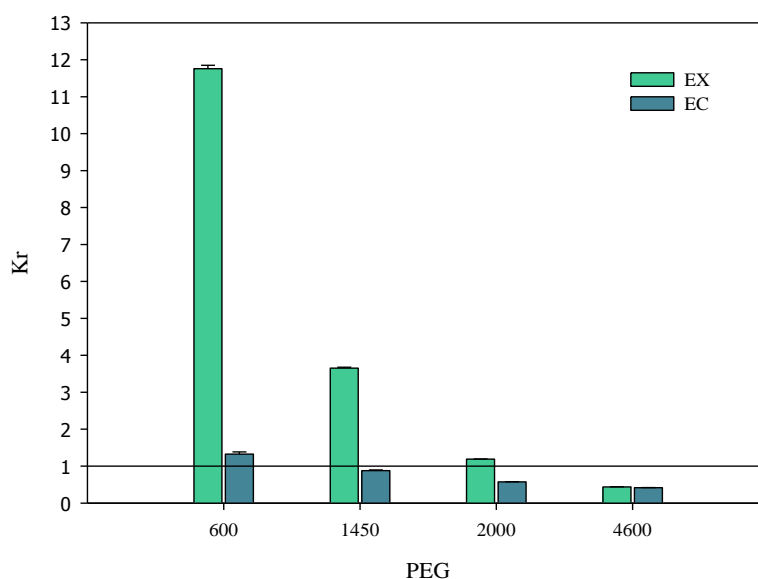


Figura 7.3: Efecto del PM del PEG sobre el K_{rEX} y K_{rEC} en sistemas PEG/NaCit-Temperatura 22°C.

En las Figura 7.4 se representan los valores de $\%R_{EX}$ y $\%R_{EC}$ en las FI y FS mediante un gráfico de barras, que sumados representan el rendimiento total del sistema. Los valores de $\%R$ para ambas enzimas se mostraron dependientes del peso molecular del polímero, siendo mayores en la FS cuando menor es el tamaño del PEG.

El $\%R_{EX}$ en la FS alcanza altos valores, superiores al 80 %, para el PEG600 y PEG1450, los que luego decrecen conforme aumenta el PM del PEG. Por otra parte, para las EC, si bien se observa un comportamiento similar al de las EX, la disminución es

menor. El comportamiento diferencial de las EX puede deberse a su mayor hidrofobicidad superficial respecto de las EC, producto de una mayor cantidad de residuos aminoacídicos apolares en su estructura (D. B. Loureiro 2017).

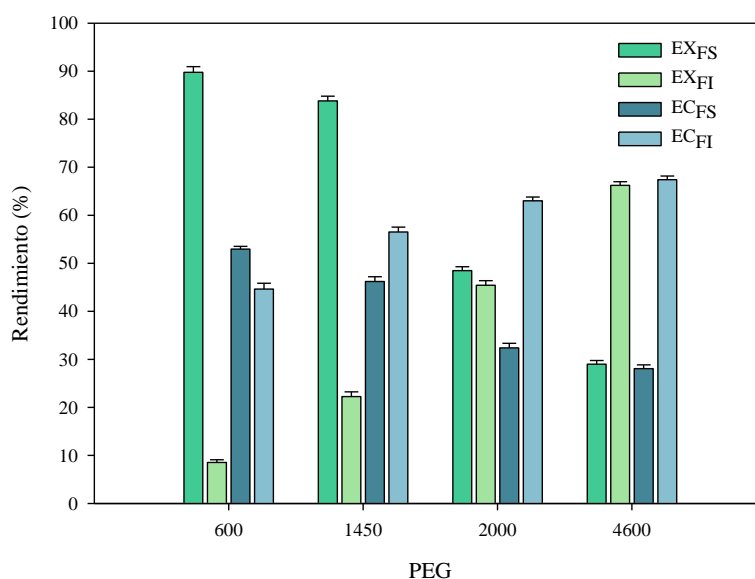


Figura 7.4: Efecto del PM del PEG sobre el %R_{EX} y %R_{EC} en sistemas PEG/NaCit.

Los resultados precedentes fueron corroborados mediante SDS PAGE de las muestras (fases) provenientes de los SBA ensayados, comparando los perfiles obtenidos con aquellos correspondiente al EEO.

La Figura 7.5 muestra las imágenes de SDS-PAGE obtenidos por Tinción con Coomassie (A) y con nitrato de plata (B). Se puede observar la presencia de la enzima endo- β -1,4-xilanasas (35.500Da) y endo- β -1,4-glucanasas (36.500 Da) en el EEO indicada por la flecha horizontal. De acuerdo a lo esperado, en las FSs de los SBAs de peso molecular inferior a 2000, se aprecia una banda principal compatible con la presencia de endo- β -1,4-xilanasas y endo- β -1,4-glucanasas, y un mayor número de bandas respecto de las bandas proteicas observadas en la FI debidas a las proteínas provenientes del EEO presentes en dicha fase.

Además, puede apreciarse que la FS del sistema PEG600 (línea 3), está altamente enriquecida en un mayor número de proteínas que la FS del resto de los sistemas. De todos ellos, el sistema PEG1450 (línea 5), contiene mayoritariamente una banda coincidente con un peso molecular aproximado de 35.000 Da, la cual podría deberse principalmente a endo- β -1,4-xilanasas y no a endo- β -1,4-glucanasas dado que la actividad de las EX en dicha fase fue 1,85 U/mL y de las EC de 0,31 U/mL. Adicionalmente puede observarse que dicha fracción se halla prácticamente libre de otras proteínas

contaminantes, siendo por esto una mezcla apta para diversos usos industriales. Además, como se mencionó en el capítulo 6, la estabilidad de las enzimas en las fases del mencionado sistema contribuye a que se lo considere como al más conveniente en proceso de prepurificación primaria de las EX.

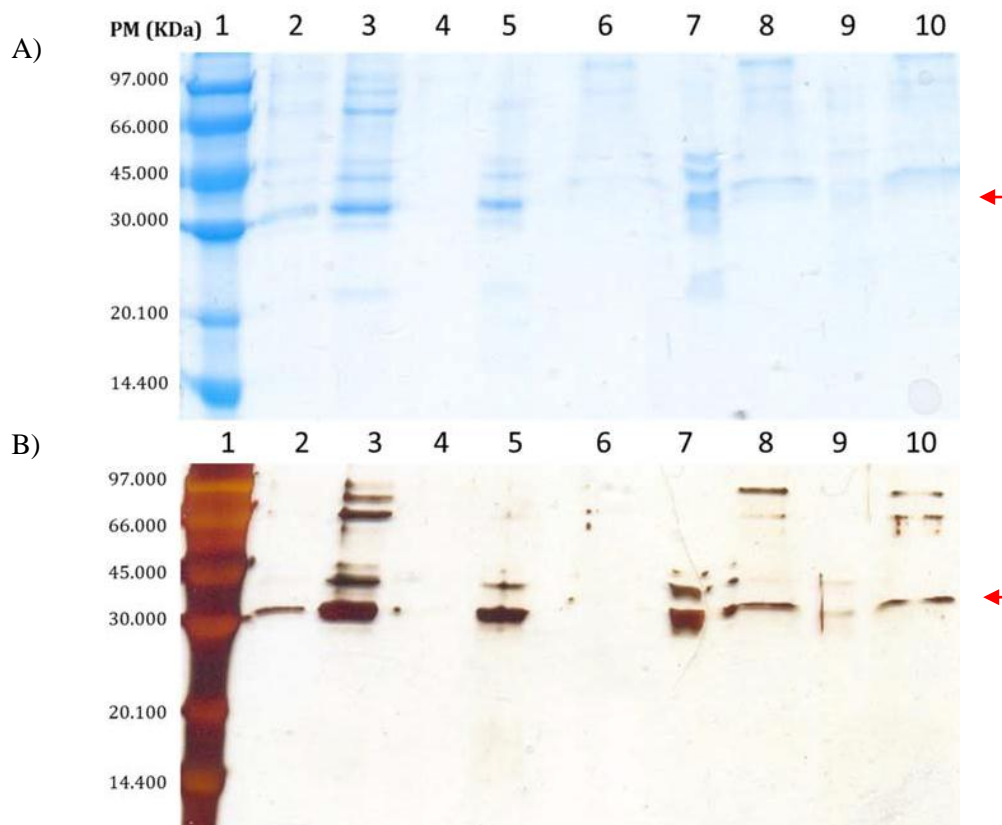


Figura 7.5: Análisis SDS-PAGE de las proteínas en las fases de los SBAs PEG/NaCit A) tinción con coomasie B) tinción con nitrato de plata. Líneas: 1-Marcadores de pesos moleculares, 2-EEO, 3-FS PEG600, 4-FI PEG600, 5-FS PEG1450, 6-FI PEG1450, 7-FS PEG2000, 8-FI PEG2000, 9-FS PEG4600, 10-FI PEG4600.

7.2.9. Extracción combinada por sistemas UCON/NaCit y PEG/NaCit

En base a los resultados anteriores, se diseñó un protocolo de dos pasos de extracción que permita mejorar la recuperación de las EX a partir del SBA optimizado formado por UCON y NaCit. En la Figura 7.6 se representa el protocolo empleado.

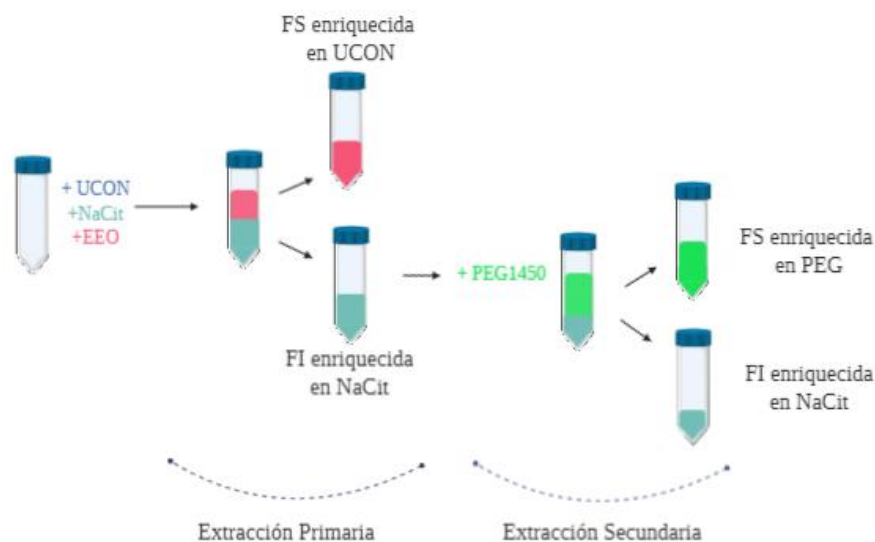


Figura 7.6: Diagrama de la metodología propuesta para el proceso de extracción enzimática líquido-líquido empleando dos pasos consecutivos.

La primera extracción (extracción primaria) se realizó en el sistema UCON 15%P/P/NaCit 7%P/P, con un V_{sup}/V_{inf} igual a la unidad y una LLU de 35%P/P. Al utilizar este sistema, como se observó en el apartado 4.2.1, aproximadamente la totalidad de las EX sin pigmentos se distribuyen hacia la fase inferior rica en sal, concentrándose las enzimas 1,62 veces (Tabla 7.2). Los resultados fueron corroborados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en medio desnaturizante teñido con nitrato de plata (Figura 7.7). Puede apreciarse que la FI del sistema UCON/NaCit, concentra prácticamente la totalidad de las proteínas provenientes del EEO y la FS (enriquecida en el PCF y pigmentos), prácticamente no contiene proteínas.

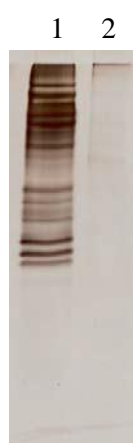


Figura 7.7: Análisis SDS-PAGE de las proteínas de las fases del SBA UCON/NaCit. Líneas: 1-FI del SBA UCON/NaCit, 2-FS del SBA UCON/NaCit.

El segundo paso de extracción (extracción secundaria) se realizó en sistemas PEG/NaCit con una relación de volúmenes de fase unitaria y una longitud de línea de

unión de 35% P/P pH 5,2. Estos sistemas se prepararon a partir de la FI del sistema UCON/NaCit, en la cual se cuantificó el anión citrato y se agregó la cantidad necesaria de NaCit y PEG para obtener el sistema de composición final deseada.

En la Figura 7.8 se representan los valores de los K_{rEX} y K_{rEC} para la segunda extracción en sistemas ensayados, pudiéndose observar el mismo patrón de reparto que en una sola extracción (Figura 7.3). Por otro lado, y tal como fue mencionado precedentemente para la extracción en una sola etapa, el equilibrio de reparto de las EX mostró estar más desplazado hacia la FS (enriquecida en PEG) que para las EC.

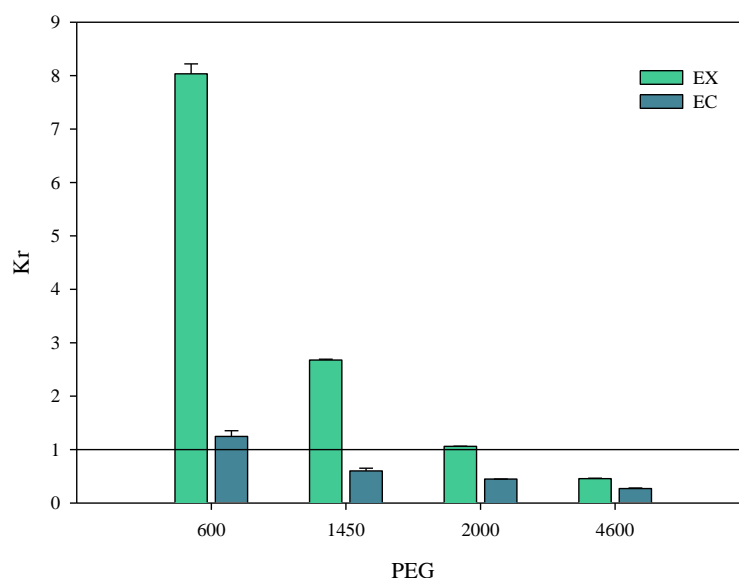


Figura 7.8: Efecto del PM del PEG sobre el reparto de EX y EC en sistemas combinados UCON/NaCit - PEG/NaCit - Temperatura 22 °C.

7.2.10. Comparación de la extracción por SBA simples y combinados

Los SBAs no solo es una técnica de separación simple, selectiva y de bajo costo, sino que además es sencilla de escalar, haciéndola válida para ser adoptada por las industrias que intentan modificar sus metodologías volviéndolas más amigables con el medio ambiente. Para ello es un factor relevante conseguir una buena performance entre el rendimiento y el factor de purificación que se priorice en la selección de SBAs con la mejor capacidad separativa. Tanto en los sistemas individuales como en los combinados puede observarse que el valor de $\beta_{EX/EC}$ disminuye conforme aumenta el peso molecular del PEG. El valor de $\beta_{EX/EC}$ en los SBA de extracción única, fueron un 15% inferior a los SBAs combinados (UCON/NaCit – PEG /NaCit), indicando que en estos sistemas es mayor la separación que cuando la extracción se realizó en un único paso (Figura 7.9).

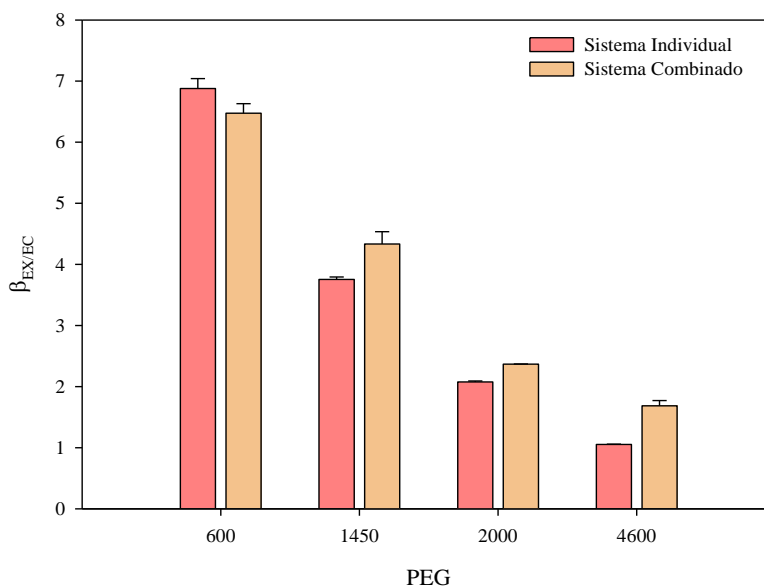


Figura 7.9: Efecto del PM del PEG sobre la capacidad separativa de EX y EC en sistemas combinados UCON/NaCit - PEG 1450/NaCit- Temperatura 22°C.

El sistema formado por PEG600 presenta la mayor $\beta_{EX/EC}$, pero como se observó en los geles de electroforesis (Figura 7.5), la FS donde se recuperan las EX posee un mayor contenido de otras proteínas y el K_{REC} es mayor a uno, lo que indica que posee mayor cantidad de EC en la fase superior con respecto a la inferior. Por estos motivos, el sistema combinado UCON/NaCit – PEG1450/NaCit pH 5,20 con las composiciones correspondientes a la LLU 35% fue el elegido como el más adecuado para la extracción y recuperación de las EX.

7.2.11. Evaluación de la V_{sup}/V_{inf} en la extracción combinada por sistemas UCON/NaCit y PEG 1450/NaCit

El efecto de V_{sup}/V_{inf} sobre los parámetros de purificación ha sido abordado en diferentes trabajos previos (Pellegrini Malpiedi, Picó, and Nerli 2011; Porfiri et al. 2011). Sin embargo, al presente, no es posible establecer una regla de cumplimiento general que permita predecir el sentido de dicho efecto, siendo imprescindible recurrir a la experimentación. De acuerdo a la termodinámica clásica, la modificación de este cociente sólo produciría un desplazamiento en los equilibrios de reparto (principio de Le Chatelier) sin modificación de la respectiva constante de equilibrio. Cuando se trabaja con mezclas complejas, las múltiples interacciones que se establecen entre sus componentes, alejan al sistema del comportamiento ideal, haciendo que K_r , lejos de comportarse como una verdadera constante termodinámica, se convierta en un coeficiente fenomenológico, muy dependiente de las condiciones de trabajo.

Las ecuación 4 que se explicita a continuación (Zaslavsky 1995), permite deducir que un aumento en la relación entre los volúmenes de fases V_{sup}/V_{inf} conducirá a un incremento del rendimiento en fase superior y aun efecto contrario en la fase inferior.

$$\%R_{FS} = \frac{K_r \frac{V_{sup}}{V_{inf}}}{1 + K_r \frac{V_{sup}}{V_{inf}}} \quad \text{Ecuación 6}$$

En la Tabla 7.6 se muestran los rendimientos porcentuales y FP de las EX para el sistema combinado con V_{sup}/V_{inf} comprendidos entre 0,33 y 3,0. Puede observarse que cuando el volumen de la FS es 3 veces superior al de la fase inferior, el $\%R_{EX}$ y FP_{EX} en FS, es mayor a las otras relaciones ensayadas incrementándose hasta 1,4 veces, mientras que en FI los valores de $\%R_{EX}$ presentaron una tendencia a disminuir conforme se incrementa la relación V_{sup}/V_{inf} . Complementariamente se calculó la capacidad separativa de las EX respecto de las EC y de PT resultando 4,58 y 2,33 respectivamente cuando V_{sup}/V_{inf} es 3.

Tabla 7.6: Rendimientos y factores de purificación para cada sistema, variando la relación de volúmenes de fase de los SBAs ensayados.

V_{sup}/V_{inf}	$\%R_{EX}$ Total		FP_{EX} Total	
	FS	FI	FS	FI
0,33	54,4	49,2	2,8	1,7
1	72,2	27,9	2,2	1,8
3	80,6	22,5	3,8	1,5

7.2.12. Composición de las fases superior e inferior en la extracción combinada por sistemas UCON/NaCit y PEG 1450/NaCit

La composición proteica de cada una de las fases obtenidas en la segunda extracción, fue corroborada por GC-masa. Las proteínas identificadas provenientes del reparto del EEO de *A. niger* se muestran en la Tabla 7.7. Los informes completos se encuentran en el anexo. El número de acceso corresponde al identificador único asignado a la proteína mediante la base de datos utilizada para generar el informe.

Fueron detectadas un total de 25 enzimas en la FS, de las cuales nueve se identificaron como enzimas hidrolíticas implicadas en la degradación de los polímeros de la pared celular vegetal, perteneciendo seis de ellas (de las doce presentes en el EEO)

al complejo xilanolítico (endo- β -1,4-xilanasas B y C, α -L-arabinofuranosidasas axh A y B y feruloil esterasas A y C) y tres al complejo celulolítico (endo- β -1,4-glucanasas A, 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas B y C).

Por otra parte, en la FI fueron detectadas 70 proteínas, siendo 18 las involucradas en la degradación de los polímeros de la pared celular vegetal. Algunas de las enzimas del complejo xilanolítico que se encuentran en FS del sistema combinado, también se encuentran, aunque en menor proporción, en la FI. Por ejemplo, endo- β -1,4-xilanasas C (xlnC) presenta una abundancia relativa de 35,7% en FS y 3,4% en FI.

El análisis general de las enzimas del complejo xilanolítico indica que la abundancia relativa en FS es de 66,1% y en la FI del 20,5% resultando en un coeficiente de reparto de 3,22. Mientras que la abundancia relativa del complejo celulolítico en la FS es de 19,2% y en la FI de 22,2%, correspondiéndole un coeficiente de reparto de 0,8. Estos valores están en concordancia con los valores de los coeficientes de reparto calculados por actividad.

Los resultados obtenidos indicaron que la extracción líquido-líquido empleando los sistemas bifásicos acuosos combinados UCON/NaCit - PEG 1450/NaCit pH 5,20 con las composiciones correspondientes a la LLU 35%P/P a 22°C y con una relación de volúmenes de fases de 3 permitieron obtener las EX en FS con un rendimiento del 80,61%, un factor de purificación de 3,77 y una abundancia relativa del 66,1%.

Tabla 7.7: Enzimas hidrolíticas de la FS y FI del sistema combinado, identificadas por espectrometría de masa.

N° de acceso	Proteína	PM [kDa]	pI	Abundancia relativa (%)	
				FS	FI
Enzimas xilanolíticas					
A2Q7I0	endo- β -1,4-xilanasas B (xlnB)	24	5,45	2,4	-
A2QFV7	endo- β -1,4-xilanasas C (xlnC)	35,5	6,65	35,7	3,4
A2QA27	exo- β -1,4-xilosidasas xlnD (xlnD)	87,2	4,89	-	1,6
A2QFV9	α -L-arabinofuranosidasas axhA (axhA)	35,8	4,86	9,4	10,8
A2R511	α -L-arabinofuranosidasas B (abfB)	52,5	4,44	1,3	2,2
A2R3X3	α -glucuronidasas A (aguA)	93,7	5,38	-	0,7
A2QAN3	β -galactosidasas A (lacA)	109,6	5,21	-	0,6

A2QEJ9	α -galactosidasa B (aglB)	48,8	5,08	-	0,8
A2QSY5	feruloil esterasa A (faeA)	30,5	4,55	14,5	-
A2R0Z6	feruloil esterasa B (faeB)	57,2	5,2	-	0,3
A2QYU7	feruloil esterasa C (faeC)	28,6	5,02	2,8	-
A2QTU5	α -xilosidasa A (axIA)	82,5	5,66	-	0,1

Enzimas celulolíticas

A2QQ99	glucanase (An08g01760)	42,1	4,31	-	2,1
A2R322	endo- β -1,4-glucanasa A (eglA)	25,9	4,64	18,4	1,7
A2QPC3	endo- β -1,4-glucanasa B (eglB)	36,5	4,55	-	0,8
A2R5N0	endo- β -1,4-glucanasa D (eglD)	42	5,63	-	0,4
A2RAL4	β -glucosidasa A (bglA)	93,2	4,78	-	8,6
A5ABF5	β -glucosidasa M (bglM)	82,1	4,74	-	1,6
A2QPG2	β -1,4-D-glucan celobiohidrolasa A (cbhA)	48,2	4,32	-	0,7
A2QAI7	β -1,4-D-glucan celobiohidrolasa B (cbhB)	56,2	4,3	0,4	5,6
A2QYR9	β -1,4-D-glucan celobiohidrolasa C (cbhC)	48,1	4,53	0,4	0,7

7.2.13. Extracción de EX empleando cromatografía de intercambio iónico

El fraccionamiento de proteínas por cromatografía de intercambio iónico depende de las diferencias en las cargas de las proteínas, las que dependerá del número y el tipo de aminoácidos con cadenas laterales ionizables que contenga. Debido a que proteínas diferentes poseen una composición de aminoácidos distinta, tenderán a tener diferentes cargas a un mismo pH, de este modo las EX y EC podrían ser separadas por este principio.

La afinidad de las proteínas por la resina de intercambio iónico puede modificarse ya sea variando el pH de la fase móvil o su concentración salina, siendo esta última propiedad la utilizada como método para eluir las proteínas de la columna dado que el aumento de la fuerza iónica de la fase móvil debilita las interacciones electrostáticas responsables de la unión de las proteínas a la columna. Las corridas se realizaron siguiendo los protocolos detallados en materiales y métodos. Durante la cromatografía se monitoreó la absorbancia a 280 nm para identificar las fracciones conteniendo proteína.

Se evaluaron las columnas de intercambio catiónico HiTrap SP, FF y XL, para la purificación de EX. Las mismas se equilibraron con *Buffer A* (acetato de sodio 50 mM), con un flujo de 1 mL/min. Luego de inyectar la FS rica en PEG1450 del sistema combinado, se realizó la elución mediante un gradiente lineal con *Buffer B* (acetato de sodio 50 mM y NaCl 1M).

La condición de corrida descrita se realizó a pH 5,0 con el objetivo de separar las endo- β -1,4-xilanasas B y C de la endo- β -1,4-glucanasa cuyos PI son 5,45, 6,65 y 4,64 respectivamente. En todas las fracciones en las que se identificaron proteínas a 280 nm se determinó actividad enzimática, sin embargo, solo en la fracción de lavado se detectó actividad EX (1,09 U/mL). Estos resultados son contrarios a los esperados ya que a pH 5,0 o menores las enzimas endo- β -1,4-xilanasas B y C (pI= 5,45 y 6,65 respectivamente) con carga positiva deberían estar unidas a la matriz de intercambio catiónica. La alta fuerza iónica (0,22 S/m) de la fase en la que se encuentran las enzimas sería la responsable de la elución prematura durante el lavado.

Posteriormente se evaluó la cromatografía de intercambio aniónico con las columnas HiTrap DEAE-Sepharosa y Q-Sepharosa XL. La columna DEAE-Sepharosa contiene una amina terciaria como grupo ionizable, encontrándose cargada positivamente a pH neutro y actuando como intercambiador de aniones. Por otra parte, el grupo cargado de la columna Q-Sepharosa es una amina cuaternaria que contiene una carga positiva no titulable, por lo que esta resina puede ser utilizada a pH alcalino donde la carga positiva del grupo DEAE estaría neutralizada. Ambas columnas se equilibraron con *Buffer A* (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0), siendo las proteínas eluidas al utilizar un gradiente lineal de *Buffer B* (Tris-HCl 20 mM pH 8,0 y 1M NaCl) con un flujo de 1 mL/min.

Como se muestra en la Figura 7.10, al emplear la columna HiTrap DEAE-Sepharosa se observó un aumento de absorbancia 280 nm en la fracción de lavado y en las fracciones comprendidas entre los 19 y 22 minutos. Para la FS del sistema combinado resultante del reparto de EEO (muestra M1) se determinó actividad de las EX (0,95 U/mL) solo en la fracción de lavado, mientras que para la FS con xilanasas comercial (24 μ M) (muestra M2) se determinó actividad de las EX tanto en la fracción de lavado (12,49 U/mL) como en la fracción de los 21 minutos (4,05 U/mL).

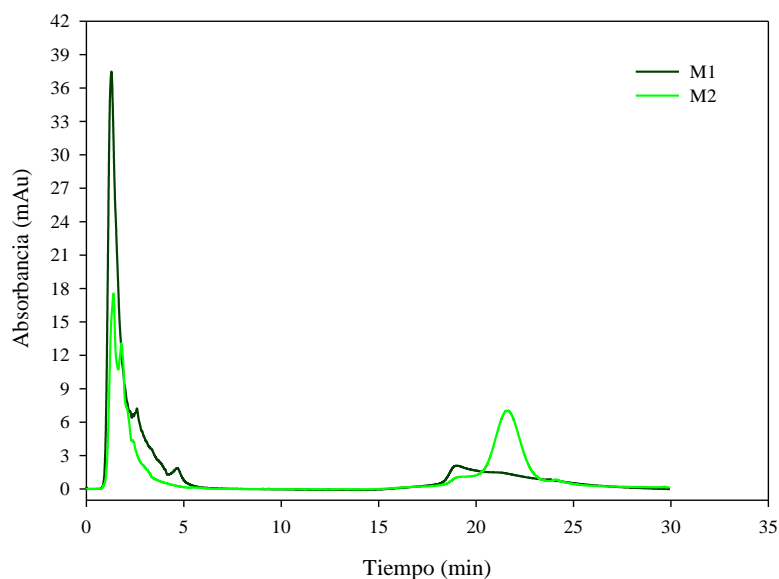


Figura 7.10: Cromatograma de DEAE Sheparosa FF. Gradiente de elución 20 min, tiempo de lavado 10 min. Flujo 1 mL/min. Volumen de muestra 500 μ L. M1: FS sistema combinado resultante del reparto de EEO, M2: FS con Xilanasa comercial (24 μ M). Elución de proteínas medida por absorbancia a 280 nm.

Por otra parte, al emplear la columna HiTrap Q-Sepharosa XL se inyectaron 500 μ l de FS rica en PEG1450 del sistema combinado, realizándose el lavado en diferentes períodos de tiempo (dos y en diez minutos) a dos diferentes flujos (0,5 y 1,0 mL/min). En todos los casos se observó un patrón de elución similar al cromatograma correspondiente a la columna DEAE Sheparosa FF (Figura 7.10), en el que disminuía ligeramente la actividad de las EX en la fracción de lavado y se incrementaba en la fracción de 20 minutos (datos no mostrados).

En consecuencia, se evaluó la inyección de un volumen de 100 μ l variando el tiempo del gradiente de elución en 2, 5, 10, 15 y 20 minutos. En el cromatograma (Figura 7.11) se observa el mismo patrón de elución para cada condición con dos picos característicos, el primero en la fracción de lavado y el segundo entre los 10 y 20 minutos. Además, se percibe una disminución del ancho y un aumento de la altura del segundo pico a medida que el gradiente de elución se realiza en menor tiempo.

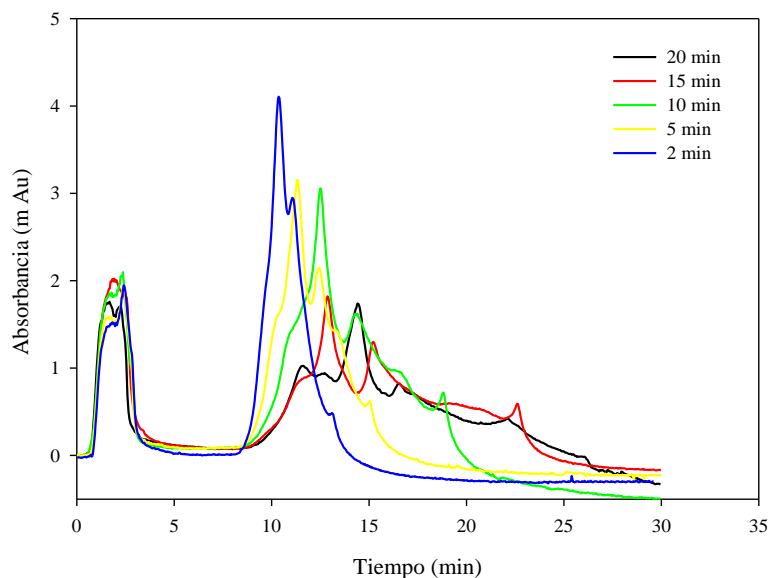


Figura 7.11: Cromatograma de Q Sheparosa XL. Gradiente de elución 20 a 2 min, tiempo de lavado 5 min. Flujo 1 mL/min. Volumen de muestra 100 μ l. M1: FS sistema combinado resultante del reparto de EEO. Elución de proteínas medida por absorbancia a 280 nm.

En la Figura 7.12 se presenta el cromatograma correspondiente a la condición óptima lograda con la columna Q Sheparosa XL, siendo el volumen de inyección de 100 μ l, el tiempo de lavado 1 de 5 minutos y gradiente de elución en 2 min con *buffer* B, luego se mantiene la elusión constante con el mismo *buffer*. Se determinó actividad de las EX (0,49 U/mL) solo en la fracción de elución de los 10 minutos y actividad EC (0,16 U/mL) solo en la fracción de lavado logrando separar las proteínas. Se determinó la presencia de PEG por el método descrito en la sección 3.2.7 de materiales y métodos, en la fracción de lavado. El %R_{EX} de esta etapa de purificación fue de 99,2% con un factor de purificación de 2,92.

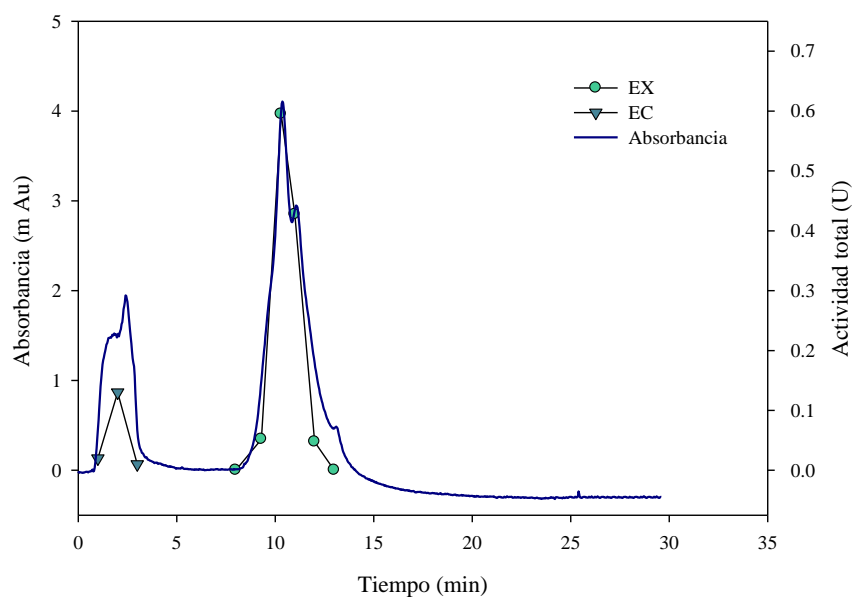


Figura 7.12: Cromatograma de *Q Sheparosa XL* y Actividad de las EX y EC. Gradiente de elución 2 minutos, tiempo de lavado 5 minutos. Flujo 1 mL/min. Volumen de muestra 100 μ L. M1: FS sistema combinado resultante del reparto de EEO. Elución de proteínas medida por absorbancia a 280 nm.

La calidad de la fracción purificada empleando la columna *Q Sheparosa XL* fue corroborada por GC-masa, solo dos proteínas fueron identificadas, las que se describen en la Tabla 7.8. Los datos obtenidos indicaron que la fracción purificada contiene endo- β -1,4-xilanasas C y B con una abundancia relativa total de 100%.

Tabla 7.8: Enzimas recuperadas de la elución cromatográfica empleando la columna *Q Sheparosa XL* e identificadas por espectrometría de masa.

N° de acceso	Proteína	PM [kDa]	pI	Abundancia relativa (%)
A2QFV7	endo- β -1,4-xilanasas C (xlnC)	35,5	6,65	82,4
A2Q710	endo- β -1,4-xilanasas B (xlnB)	24	5,45	17,6

A partir de las consideraciones previas establecidas en este capítulo, se establece que tanto la extracción consecutiva de los sistemas UCON/NaCit y PEG1450/NaCit, como también la cromatografía de intercambio iónico son técnicas prometedoras que pretenden obtener $\%R_{EX}$ y FP_{EX} superiores a los de la precipitación salina con $(NH_4)_2SO_4$. De este modo se convierten en dos metodologías potencialmente aplicables para diseñar una estrategia integrada que permita la recuperación de xilanasas a partir de un EEO.

CAPÍTULO 8 - Diseño de una Estrategia Integrada de Purificación

En el diseño de una estrategia integrada de purificación, se busca obtener la mayor cantidad de proteínas puras reduciendo la cantidad de proteínas contaminantes, de este modo el rendimiento y la pureza son dos parámetros que deben maximizarse. No obstante, frecuentemente aquellas operaciones unitarias que proveen el mayor rendimiento (%R) conducen a obtener una proteína con menor grado de pureza (FP) o viceversa. De esta forma, en la selección del sistema más adecuado (o combinación de ellos) debe privilegiarse alguno de los mencionados indicadores o llegar a una solución de compromiso entre ambos que tenga en cuenta la aplicación final de la proteína de interés, su disponibilidad, etc. En nuestro caso, en la selección de los SBAs con la mejor capacidad separativa, se priorizó la combinación de valores de pureza más elevados.

En la Tabla 8.1 se analizan los rendimientos y factores de purificación para la estrategia que integra la extracción líquido-líquido mediante SBA y la cromatografía de interacción aniónica. Puede observarse que el agregado de PEG1450 sobre la fase inferior del SBA UCON/NaCit origina un SBA en el cual las EX (presente originalmente en la fase inferior) se redistribuyen hacia la fase superior de este nuevo sistema. Si bien en esta etapa se registra una ligera reducción en el rendimiento tanto de las EX, EC como de PT, se incrementa el FP_{EX} aproximadamente 3 veces con una drástica disminución en el contenido de NaCit de acuerdo a las composiciones de las fases, desde 10,90%P/P en la FI de la sistema UCON/NaCit a 1,91%P/P en la FS del sistema PEG1450/NaCit, lo cual puede resultar deseable si desea emplear esta última solución de las EX en ciertas aplicaciones.

Asimismo, el SBA combinado implica una operación unitaria de dos pasos, con la ventaja de que la muestra no requiere pretratamiento, los materiales y reactivos empleados presentan bajos costos, es posible tratar grandes volúmenes y requiere bajo costo en los recursos humanos que precisa. También es importante mencionar que este sistema presenta buena reproducibilidad, ya que el tiempo de proceso requerido es corto (3 hs.) siendo posible reciclar los polímeros utilizados.

La combinación de la extracción líquido-líquido con cromatografía permitió obtener endo- β -1,4-xilanasa libre de endoglucanasa con un $\%R_{EX}$ del 79,9% y un factor de purificación próximo a 11. Si bien el empleo de la separación cromatográfica

aplicado a extractos enzimáticos suele requerir tratamientos previos de precipitación con sulfato de amonio y desalación en este caso, no fueron utilizados reduciendo el tiempo de procesamiento. Debe tenerse presente que en la actualidad el aumento de escala, costos de material, baja capacidad de procesamiento y alto costo de mano de obra han dejado de ser un impedimento debido al desarrollo tecnológico cromatográfico.

Los resultados obtenidos indican que el procedimiento de purificación integrado fue exitoso ya que se obtuvo un alto rendimiento general de actividad de las EX próximo al 80%, mediante el empleo de un número pequeño de operaciones unitarias con alto grado de purificación. También se puede observar, que la cantidad de endo-1,4- β -xilanas representaba aproximadamente el 6,5% del total de proteínas presentes en el EEO (Tabla 6.1), lográndose mediante la extracción líquido-líquido una abundancia relativa en la FS del sistema combinado del 38%, resultando un factor importante para decidir la primera operación unitaria del proceso. El diseño de la estrategia integrada de purificación en su forma final ha sido optimizado en cada uno de sus pasos y se puede completar en 1 día lográndose obtener endo- β -1,4-xilanas con una abundancia relativa en el extracto final de 100% y libre de endoglucanasa.

Tabla 8.1: Tabla de purificación extracción integrada de endo- β -1,4-xilanasas de *A. niger*.

	Volumen		PT		EC					EX				
	(mL)	(mg/mL)	(mg)	%R	(U/mL)	(U)	A.E. (U/mg)	%R	FP	(U/mL)	(U)	A.E. (U/mg)	%R	FP
EEO	4,7	0,38	1,8	100	0,70	3,29	1,82	100	-	2,38	11,19	6,22	100	-
FI-UCON/NaCit (SBA combinado)	3,5	0,43	1,52	84,5	1,09	3,29	2,51	100	1,4	3,17	11,09	7,38	99,2	1,2
FS-PEG1450/NaCit (SBA combinado)	4,9	0,09	0,45	24,5	0,31	1,51	3,43	46,1	1,9	1,85	9,02	23,5	80,6	3,8
Cromatografía Q Sepharsa XL	18,37	0,007	0,13	7,1	ND	-	-	-	-	0,49	8,95	68,8	79,9	11,1

A.E: Actividad Especifica; *ND:* actividad no determinada.

8.1. Reciclado de los componentes de las fases de los SBA

En la sección 5.5 de resultados, se describió el interés de reciclar los componentes empleados en cada una de las etapas del proceso de purificación de enzimas xilanolíticas. En la etapa de purificación, durante la extracción primaria, se genera una FS rica en UCON y pigmentos.

Cuando soluciones de UCON son calentadas por encima de una determinada temperatura denominada temperatura de separación de fases (TSF), se origina un sistema heterogéneo formado por dos fases, una enriquecida en el PCF y la otra fundamentalmente acuosa muy pobre en el PCF. Como se mencionó en la introducción, el UCON es un copolímero de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO). Según la proporción EO/PO en la molécula se tendrán TSF distintas, tanto menores cuanto mayor sea el contenido de PO. Este comportamiento puede ser explicado por el incremento del carácter hidrofóbico de la molécula debido a la presencia de grupos PO que conduce a un incremento en la interacción repulsiva neta entre los segmentos del polímero, y así a la separación de fases a menores temperaturas.

Estos PCFs, denominados termosensibles por tener temperaturas de separación de fases relativamente bajas, son muy útiles en la separación de moléculas biológicas dado la posibilidad de recuperarlos al final del proceso vía reciclado.

Se determinó la TSF para el UCON utilizado en este trabajo de tesis. Se evaluó la aparición de turbidez con el aumento de temperatura (Figura 8.1) para soluciones de UCON entre el 5 y 30% y para la FS del sistema UCON/NaCit, cuya composición de acuerdo al diagrama binodial es 34,4%P/P de UCON y 1,7%P/P de NaCit. Las TSF de las diluciones de UCON disminuyen a medida que la concentración aumenta. Cuando analizamos la TSF de la FS rica en UCON (TSF=31°C), se observa que es inferior en relación a la de la dilución del 30%P/P UCON (TSF=40°C). Esto se debe a la presencia de sal en la solución, la cual genera la pérdida del agua estructurada alrededor del polímero, este efecto se ve favorecido por la presencia de sales de aniones kosmotrópicos como el citrato, capaz de rodearse de moléculas de agua por su alta densidad de carga y pequeño tamaño (Karlström, Carlsson, and Lindman 1990).

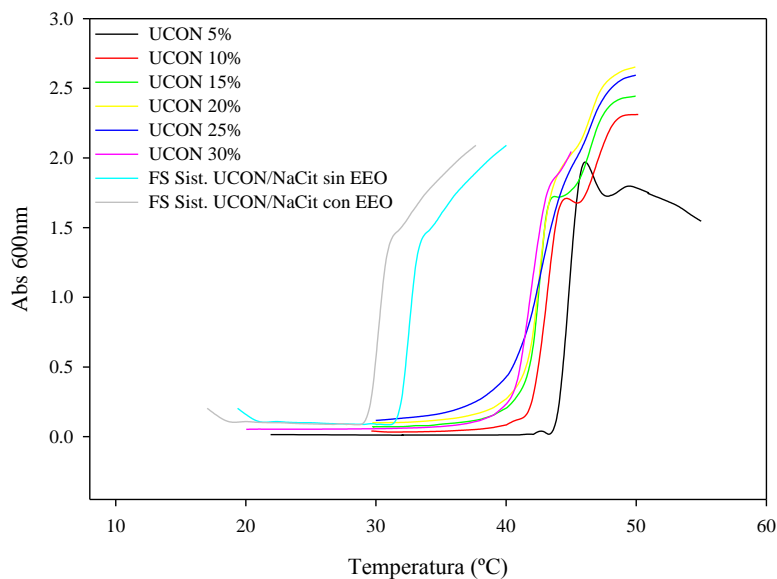


Figura 8.1: Determinación TSF de soluciones de UCON y FS del sistema UCON/NaCit pH 5,20 temperatura de obtención del sistema pH 22°C.

Para la FS del sistema en el cual se realizó el reparto de EEO, la TSF fue de 29°C, menor aun a la observada para la FS sin EEO, probablemente debido a la presencia de sales provenientes del EEO. De este modo, a temperaturas mayores a 29°C es posible inducir separar una fase acuosa rica en sales, y en otra fase altamente enriquecida en UCON, la cual fue reutilizada en la preparación de nuevos SBAs UCON/NaCit.

El sistema bifásico PEG1450/NaCit se emplea en la extracción secundaria permitiendo recuperar las enzimas del complejo xilanólico en la FS, la cual fue utilizada posteriormente en cromatografía iónica. La fase inferior de dicho sistema rica en NaCit y conteniendo proteínas, fue ultrafiltrada con un corte de 3KDa, de este modo fue posible recuperar una solución de NaCit de concentración de 23,5% P/P libre de proteínas que fue reutilizada en la preparación de nuevos SBAs PEG1450/NaCit.

8.2. Análisis de costos de operaciones unitarias desarrolladas

El desarrollo de producción enzimática a partir de residuos agroindustriales queda encuadrado dentro de la Economía Verde y de los Objetivos de Desarrollo Sostenible 2030 de la Organización de Naciones Unidas, promoviendo la explotación de recursos que no compitan con los cultivos alimentarios. Esta tendencia brinda mejoras el bienestar del ser humano, contribuyendo a la equidad social, a la vez que reducir significativamente los riesgos ambientales y ecológicos. En consecuencia, una economía verde sería aquella que tiene bajas emisiones de carbono, utiliza los recursos de forma eficiente y es socialmente incluyente. El aumento de los ingresos y la creación de empleos deben derivarse de

inversiones públicas y privadas destinadas a reducir las emisiones de carbono y la contaminación, a promover la eficiencia energética, así como en el uso de los recursos, y a evitar la pérdida de diversidad biológica y de servicios de los ecosistemas (Aurelio, Mora, and Trujillo 2017; Naciones Unidas 2020b). El diseño propuesto en este trabajo de tesis, no solo se enmarca en la economía verde sino también bajo el concepto de Economía Azul, la cual propone funcionar con los recursos disponibles en la región y busca tener impacto socioeconómico en el territorio.

Nuestro país posee un enorme potencial para lanzar nuevas actividades económicas y transformar su economía en base a los recursos disponibles según el informe “Plan A. La Transformación de la Economía Argentina, 2017” del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación (actual Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable). En particular en la región centro-este de Argentina, una de las materias primas localmente accesibles y en abundancia, son los hongos tanto para consumo como para la producción de moléculas orgánicas (Gunter 2017).

Se realizó el análisis de costo para el proceso de obtención de endo- β -1,4-xilanasa de acuerdo a las diferentes estrategias de purificación que permitirá evaluar la sostenibilidad de los mismos y la elección de la mejor alternativa de acuerdo a la pureza necesaria para su aplicación.

El diseño de un bioproceso para la producción de enzimas incluye una serie de etapas previas al proceso de síntesis, las cuales se conocen como *upstream* y etapas posteriores o de separación conocidas como *downstream*. En el *upstream* del proceso se incluyen operaciones como la formulación y preparación del medio del cultivo, la esterilización del medio del cultivo y del biorreactor, la calibración de los sensores y el mantenimiento y propagación del inóculo a emplear. Posterior a estas operaciones se encuentra el proceso fermentativo o de síntesis enzimática propiamente dicho, el cual incluye el cultivo y propagación del microorganismo en biorreactores para la producción e inducción de la enzima. El *downstream* del proceso, comprende todas aquellas etapas del proceso posteriores a la producción, tendientes a la recuperación y formulación del producto de interés biotecnológico (Chávez-González, Balagurusamy, and Aguilar 2020; Rito-Palomares and Benavides 2017). En este trabajo, se incluyen dos operaciones unitarias (con la elección correcta de sus etapas) necesarias para lograr un producto de alta pureza.

En la determinación económica del costo operativo del proceso completo, no se tuvieron en cuenta los gastos indirectos como limpieza, energía eléctrica general y gastos fijos de la infraestructura, ya que todas las estrategias contempladas se realizaron en el

mismo contexto. La Tabla 8.2, muestra el costo operativo calculado en base a los insumos, equipamientos, recursos humanos y energía utilizados en cada operación unitaria de producción y purificación y sus combinaciones para la obtención de endo- β -1,4-xilanasas de *A. niger*, el cual se expresa en dólares estadounidenses.

Tabla 8.2: Estimación de costos operativos de producción y purificación de endo- β -1,4-xilanasas de *A. niger* a escala de laboratorio. Precios actualizados a septiembre de 2019.

Descripción	Upstream		Downstream		Producción y Purificación	
	EEO	SBA	FPLC	EEO+SBA	EEO+SBA+FPLC	
Insumos	48,36	320,37	10681,96	368,73	11050,69	
Equipamiento	1,16	0,07	1240,91	1,22	1242,12	
Horas/hombre	13,33	78,19	4717,19	91,52	4808,71	
Energía	6,07	0,09	30,88	6,16	37,04	
TOTAL u\$	68,92	398,7	16670,94	467,6	17138,55	
mL generados	720	1408	2833,15	1408	2833,15	

En la Tabla 8.3 se muestran los indicadores que relacionan la cantidad de unidades de actividad obtenidas y los costos totales calculados. Este indicador se denomina Costo por Unidad de Producto (CUP) y representa el valor monetario (en dólares estadounidenses) de una unidad de producto obtenido (endo- β -1,4-xilanasas). El CUP es un indicador de la eficiencia de cada proceso de producción enzimático.

Tabla 8.3: Indicadores económicos de la eficiencia de costos operativos de producción y purificación de endo- β -1,4-xilanasas de *A. niger* a escala de laboratorio. Precios actualizados a septiembre de 2019.

	Precio Total u\$/mL	%R	FP	Unidades/mL	CUP (u\$/U)
EEO	0,09	100	1,0	5,02	0,019
EEO+SBA	0,33	81,0	3,7	1,86	0,177
EEO+SBA+FPLC	6,03	79,9	11,1	0,49	12,081

En Argentina es posible adquirir endo- β -1,4-xilanasas de *A. niger* purificada a partir de *Aspergillus aculeatus* la cual es elaborada por la empresa Megazyme Ltd., y es comercializada por la empresa Granotec Argentina S.A ubicada en Garin, Buenos Aires. El producto es una suspensión que posee 8.000 U de enzima pura líquida, con una

concentración aproximada de 1 U/mL. El costo actual de venta es de 211 u\$ a los que deben adicionarse 350 u\$ de gastos de importación.

También es posible adquirir hemicelulasa de *A. niger* (mezcla inespecífica de enzimas del complejo xilanolítico) elaborada por la empresa Sigma Aldrich. El producto contiene 150.000 U de la mezcla enzimática sólida y cuesta 167 u\$. La misma empresa provee la enzima xilanasa de *A. oryzae* producida por tecnología recombinante con 25.000U, siendo su costo de 274 u\$, la compra de productos en Sigma Aldrich no requiere gastos de importación.

Para procesos en los cuales se requiere un pool de enzimas como lo es la panificación industrial, se pueden encontrar en el mercado de Argentina formulaciones enzimáticas, sin especificaciones detalladas, como por ejemplo Multizyme XT comercializada por Nutring, cuyo costo de comercialización es de 30 u\$/kg, con un valor de actividad de las EX de 736 U/g, el cual fue determinado en nuestro laboratorio.

Esta información resulta solo de referencia dado que los valores informados son de venta, no siendo comparables con los valores de CUP calculados para la producción del EEO o la obtención de endo- β -1,4-xilanasa de *A. niger* mediante SBAs o cromatografía, tanto como por la estrategia integrada.

CAPÍTULO 9 - Eficiencia de las enzimas xilanolíticas

9.1. Sacarificación

La obtención de azúcares de alto valor comercial es posible mediante el proceso de sacarificación, utilizando enzimas hidrolíticas y a partir de residuos agroindustriales. Estos azúcares son de gran interés para la producción de vinos y otras bebidas dulces. Por otra parte, este proceso también se emplea en la conversión de la biomasa lignocelulósica en biocombustibles y en la producción de alimento animal. La formación de cócteles enzimáticos que pueden actuar sobre una amplia gama de residuos agrícolas es uno de los mejores métodos para mejorar la eficiencia de la sacarificación. La complementación del cóctel enzimático con las EX es una estrategia importante para aumentar los rendimientos de azúcares (Thomas, Parameswaran, and Pandey 2016).

Para analizar la eficiencia de las enzimas hidrolíticas obtenidas mediante la optimización del sistema fermentativo, se incubó cascarilla de soja y EEO, con actividad de las EX de 5,5 U/mL y de las EC 0,95 U/mL, el cual fue comparado con la enzima comercial endo- β -1,4-xilanasa de Megazyme. Cada sistema fue incubado con la cantidad equivalente de 50 U de las EX.

La cascarilla de soja utilizada fue susceptible a la hidrólisis enzimática utilizando las dos muestras enzimáticas, incrementándose la producción de azúcares reductores conforme aumentó el período de incubación. En la Figura 9.1 A. se observa una mayor liberación de azúcares reductores utilizando el EEO en comparación con la enzima comercial debido a la sinergia que presenta la acción conjunta de las enzimas del extracto enzimático capaces de hidrolizar la pared celular vegetal (Tabla 6.1).

También se analizó la cantidad de glucosa y xilosa liberada en la degradación del sustrato lignocelulósico (Figura 9.1 B). Puede observarse que, como se preveía, no fue posible determinar glucosa al utilizar la enzima comercial en la hidrólisis de la cascarilla de soja, dado que la enzima endo- β -1,4-xilanasa no degrada la celulosa. Por el contrario, que se observó una alta liberación de glucosa utilizando EEO. La cantidad de xilosa en el sistema conteniendo las enzimas del EEO fue inferior a la cantidad de glucosa determinada debido a que en la cascarilla de soja el contenido de celulosa es próximo al 50% mientras que el contenido de hemicelulosa es del 19% (Tabla 4.3).

Además, se observó una mayor cantidad de xilosa liberada en la sacarificación utilizando el EEO en comparación con la misma cantidad de unidades de actividad

enzimática de la xilanasa comercial. Esto puede deberse a la acción sinérgica de las enzimas del complejo xilanolítico las cuales actúan hidrolizando el xilano en su totalidad en comparación con la actividad individual de la enzima endo- β -1,4-xilanasa la cual actúa en la hidrolisis de la cadena principal de xilano como se mencionó en la sección 1.4.1 de la introducción.

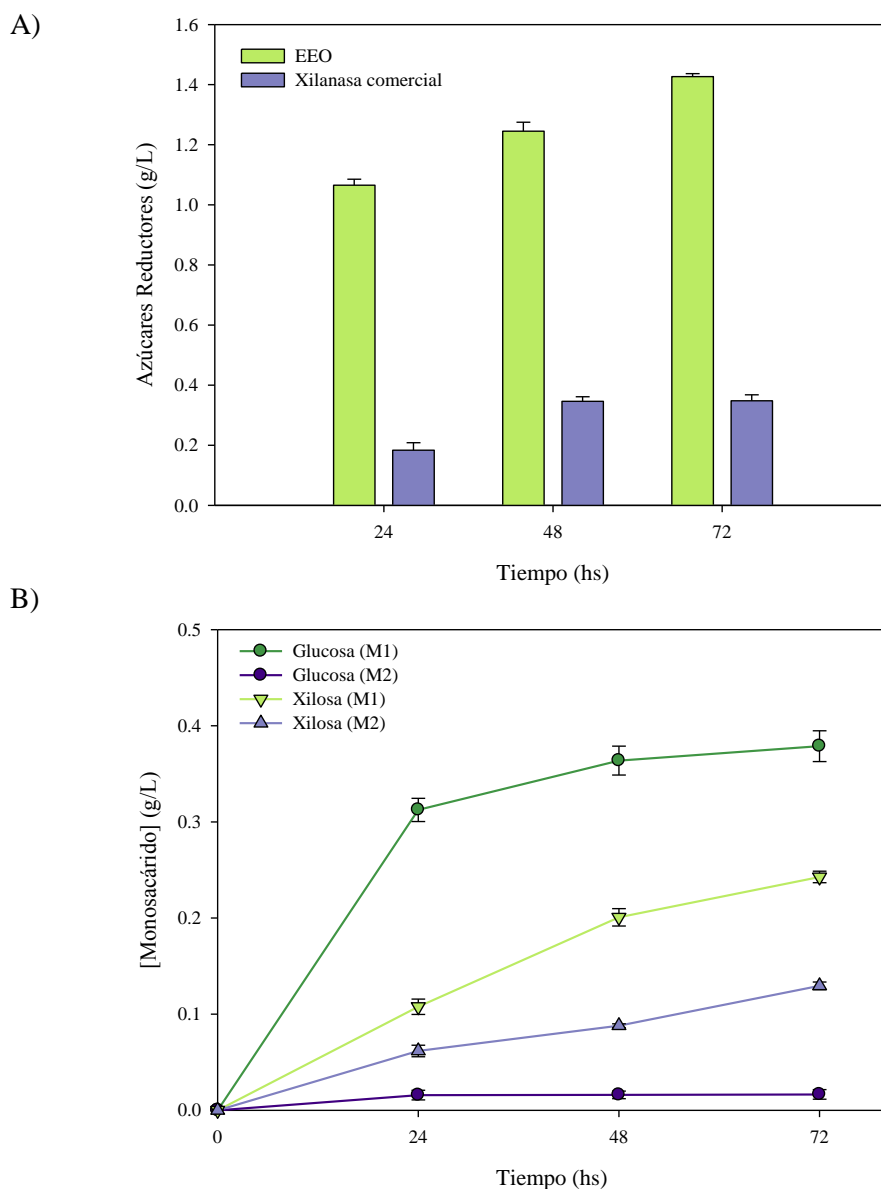


Figura 9.1: Gráfico de sacarificación de cascarilla de soja utilizando el EEO y Xilanasa comercial. A) azúcares reductores liberados, B) xilosa y glucosa liberada. M1: EEO, M2: Xilanasa comercial.

Posteriormente, se analizaron los cambios en la morfología superficial de la cascarilla de soja después de la sacarificación con EEO durante 72 hs. utilizando microscopía electrónica de barrido o SEM. La Figura 9.2 A muestra imágenes SEM sin tratamiento enzimático (control) y en la Figura 9.2 B se observaron los cambios

estructurales significativos después del tratamiento enzimático con EEO, donde se evidencia la deformación y degradación de las células empalizadas de la cascarilla. Otros autores como Sutay Kocabas obtuvieron resultados similares cuando analizaron los cambios en la superficie morfológica de las mazorcas de maíz después de agregar un extracto enzimático crudo obtenido por fermentación sumergida de *Scytalidium thermophilum* (Sutay Kocabaş, Güder, and Özben 2015).

Estos resultados confirman que el conjunto de enzimas hidrolíticas del EEO es altamente activo en la degradación de la hemicelulosa y celulosa de la cascarilla de soja.

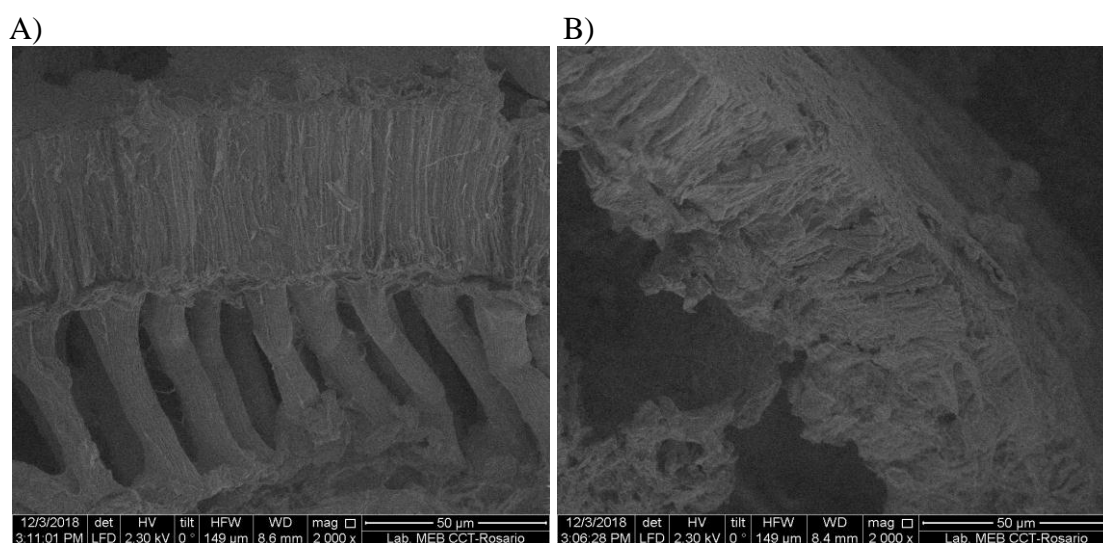


Figura 9.2: imagen de microscopia SEM de cascarilla de soja. A) Control sin tratamiento B) Tratado con EEO

9.2. Elaboración de panes

Los métodos tradicionales de elaboración de pan se han basado en la presencia de enzimas endógenas en la masa que se obtiene a partir de la mezcla de la harina con el agua. Actualmente, las harinas de trigo se suplementan con α -amilasas, xilanasas y lipasas; enzimas que mejoran el proceso de fabricación del pan, su sabor, volumen, textura, tamaño de poro en la miga y calidad de la corteza (Houben, Höchstötter, and Becker 2012). Esta suplementación se realiza para satisfacer la demanda de la industria y de la exportación de manera tal de proveer un producto de idénticas características en forma consistente y homogénea en el tiempo y de una calidad específica según el destino final de la harina (de la Horra et al. 2012).

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de las enzimas las EX purificadas por extracción combinada de los SBA UCON/NaCit y PEG/NaCit (Tabla 7.7) y del EEO el cual contiene además de las enzimas descriptas en las Tabla 6.1 y Tabla 7.7, entre otras

enzimas amilasas, que actúan como aditivos sobre la elaboración de pan de harina de trigo. Además, se empleó un aditivo enzimático empleado usualmente en molinería y panificación industrial, comercializado en Argentina por la empresa NUTRING, denominado Multizyme XT el cual, de acuerdo a la especificación del fabricante, contiene las enzimas α -amilasa, xilanasas y glucosa oxidasa. Algunos autores sugieren que la presencia de las enzimas glucosa oxidasa no tienen ningún efecto sobre la calidad del pan (Serventi, Skibsted, and Kidmose 2016).

Se determinó en nuestro laboratorio actividad enzimática EX, amilasa (EA) y lipasa a los tres aditivos, con el objetivo de utilizar la misma cantidad de unidades de actividad EX de cada muestra en la elaboración del pan. En la Tabla 9.1 se muestra la relación de actividad enzimática de cada muestra por gramo de sustrato.

Tabla 9.1: Actividades enzimáticas (U/g) de las fracciones empleadas en la elaboración de pan de trigo: soluciones obtenidas de la fermentación de A. niger (EEO), EX purificada por SBA combinados (SBA) y Multizyme XT (XT).

Enzimas (U/g)	EEO	SBA	XT
EX	885	5,53	736
EA	176	1,14	337
Lipasa	ND	ND	12

ND: no determinado

Con el objetivo de cumplir con el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, el cual es un proceso sistemático preventivo para garantizar la inocuidad alimentaria, se realizaron análisis patológicos y microbiológicos sobre ambas fracciones producidas en nuestro laboratorio (EX purificada por SBA combinado y el EEO). Se determinó presencia/ausencia de microorganismos patógenos como bacterias aerobias mesófilas viables, enterobacterias, bacterias coliformes totales, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* que pudieran haberse incorporado por manipulación de las soluciones. Además, se determinó presencia/ausencia de conidios y de las micotoxinas Aflatoxinas totales, Ocratoxina A, Fumonisina y Zearalenona, que pudieran haber sido producidas por *A. niger* durante la fermentación. Todos los ensayos realizados fueron negativos, confirmando que los extractos enzimáticos podían emplearse en alimentos, en particular en la elaboración de pan.

La determinación de la calidad de las harinas es clave para garantizar la obtención del producto panificado esperado. La caracterización físico-química y reológica de las

harinas en estudio y la elaboración de pan a partir de éstas es la forma ideal de establecer su calidad (de la Horra et al. 2012).

Para la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) el primer factor de calidad de la harina es la humedad la cual no puede superar el 15,5%. La humedad de la harina de trigo utilizada se incluyó en el rango deseado (14,18%).

El gluten se compone de dos clases de proteínas insolubles en agua, las gliadina y gluteninas que representan el 80-90% del total de las proteínas del trigo. La cantidad y la calidad del gluten presente en una harina es lo que determina que la harina sea “fuerte” o “floja”. La harina fuerte es rica en gluten, tiene la capacidad de retener mucha agua, dando masas consistentes y elásticas, panes de buen aspecto, textura y volumen satisfactorios. La harina floja es pobre en gluten, absorbe poca agua, forma masas flojas y con tendencia a fluir durante la fermentación, dando panes bajos y de textura deficiente; no es apta para fabricar pan, pero sí galletas u otros productos de repostería (Van Der Borghet et al. 2005). Se realizó la determinación de gluten húmedo y gluten seco de la harina, los valores obtenidos fueron 27,8% y 10,4% respectivamente, y se encuentran dentro del nivel óptimo de panificación.

Se elaboró el pan de harina de trigo bajo norma IRAM 15858, con los tres diferentes aditivos como agregados enzimáticos y sin agregado al que se denominó pan BASE. Se realizó el test alveográfico, el cual mide las propiedades visco-elásticas de la harina de trigo. Los parámetros determinados fueron tenacidad o resistencia a la extensión (P), extensibilidad de la masa (L), fuerza de la harina o su valor panadero (W), la relación de configuración de la curva o equilibrio de la harina (P/L) y el índice de elasticidad (Ie) los que se indican en la Tabla 9.2.

Tabla 9.2: Parámetros alveográficos de la masa (Alveolink-Chopin) norma IRAM 15857.

Parámetros	Base	EEO	SBA	XT
P (mm H ₂ O)	73	75	75	88
L (mm)	105	99	92	103
W ($\times 10^{-4}$ J)	290	277	219	308
P/L	0,70	0,76	0,82	0,85
Ie %	68,9	67,3	52,3	60,5

Puede observarse que la fuerza panadera se encuentra entre $150 < W < 300$, lo que indica que es una harina de fuerza media. El equilibrio de la harina (P/L) es la relación

entre la tenacidad y la extensibilidad. Los valores observados de P/L para los cuatro panes se encuentran dentro del rango 0,5-0,8 clasificando a la harina como equilibrada (Caballero, Gómez, and Rosell 2007). Durante el proceso de amasado se corroboró que la relajación de la masa sin agregado de enzimas sea baja en comparación con las masas a las que se le agregaron los otros tres diferentes aditivos enzimáticos.

Todos los panes fueron cocidos simultáneamente en un horno rotativo a 230°C durante un período de 12 minutos. En la Tabla 9.3 se describe la cantidad de aditivo enzimático empleado por kilogramo de harina de trigo utilizado, el peso del pan obtenido y el volumen del mismo. Puede observarse que, si bien el peso no sufrió modificaciones, el volumen del mismo se incrementó en los panes con aditivos enzimáticos, y en particular con el aditivo SBA se alcanzaron valores similares al del aditivo comercial Multizyme XT. En general, respecto del pan BASE el volumen del pan con el agregado de EEO aumento un 8,6%, con el agregado de EX purificada por SBA un 17,14% con y con Multizyme XT un 25%. También se observó una disminución en la densidad del pan con el agregado de los tres aditivos enzimáticos en comparación al control.

Uno de los criterios más importantes en la evaluación de la calidad del pan es el volumen específico. La incorporación de enzimas xilanolíticas a un nivel óptimo en la formulación del pan, proporciona un mayor volumen de los mismos. Esto se debe al hecho de que estas enzimas tienen la capacidad de degradar los xilanos y así reducir la capacidad de retención de agua, lo que aumenta su disponibilidad para el desarrollo de la red de gluten (Yegin, Altinel, and Tuluk 2018). En el presente estudio, los aditivos SBA y XT fueron significativamente efectivos para mejorar el volumen específico del pan (Tabla 9.3).

Tabla 9.3: Cantidad de muestra empleada por kilogramo de harina de trigo utilizada, peso del pan volumen del pan obtenido, densidad y volumen específico.

	Base	EEO	SBA	XT
Muestra enzimática (g)	-	0,116	18,63	0,140
Peso (g)	270	265	265	265
Volumen (mL)	700	760	820	875
Densidad (g/mL)	0,39	0,35	0,32	0,30
Volumen específico (mL/g)	2,6	2,9	3,1	3,3

La utilización del aditivo EEO si bien mejoró el volumen específico del pan en un 11,5% en comparación con el pan control (BASE), se obtuvo mayor volumen específico con un aumento del 19,8% al utilizar el aditivo SBA, aproximándose a los valores

obtenidos con Multizyme XT (27%). Otros autores informaron aumentos máximos del 22% y 19% en el volumen específico del pan mediante la adición de enzima xilanasa de *Thermoascus aurantiacus* y xilanasa recombinante de *Plectosphaerella cucumerina*, respectivamente (Oliveira et al. 2014; Zhan et al. 2014). El impacto de las EX en el volumen específico del pan, ya sea positivo o negativo, está relacionado con la cantidad de la enzima, las características macromoleculares de arabinoxilano en la harina de trigo, y la especificidad de sustrato de la enzima (Oliveira et al. 2014).

Los panes obtenidos fueron fotografiados sobre una cuadrícula para facilitar su comparación, y se representan en la Figura 9.3. Puede observarse que los cuatro panes fueron similares presentando el color dorado característico, siendo mayor la longitud en el pan XT respecto de los otros panes.

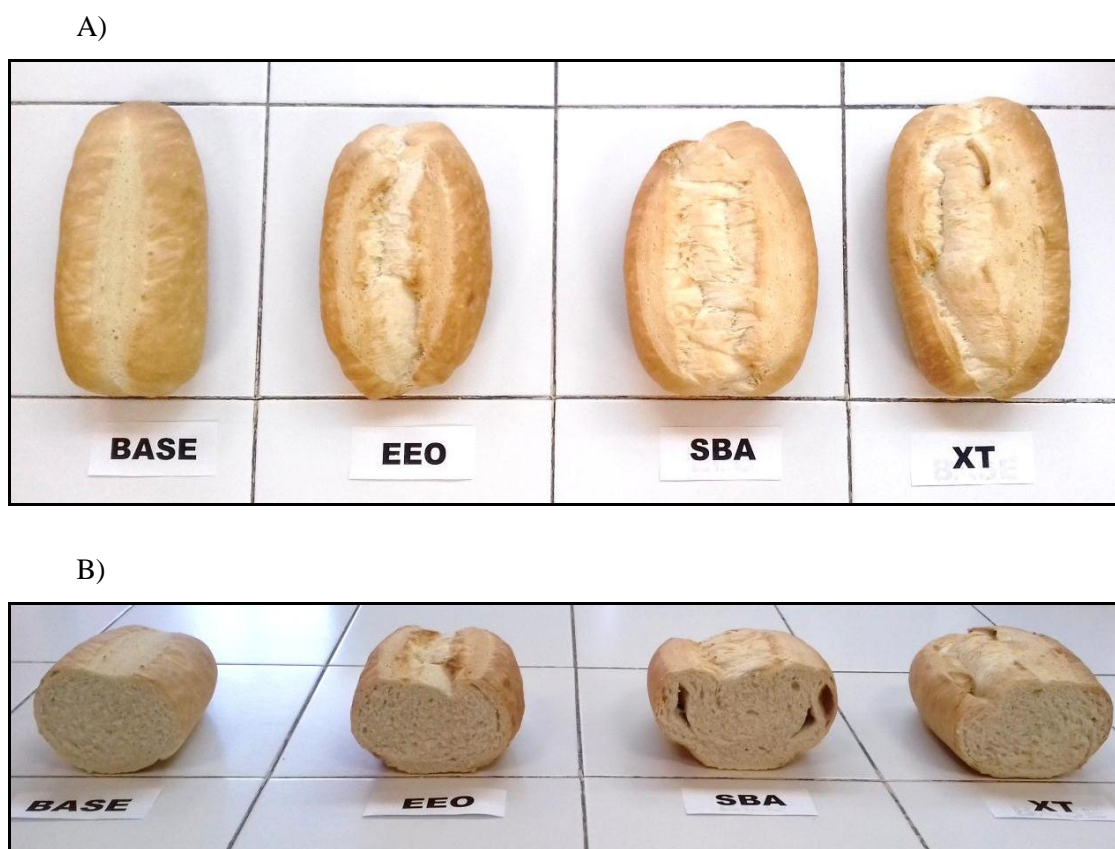


Figura 9.3: Efecto de la adición de EEO, purificación utilizando SBA y Multizyme XT sobre el volumen del pan en comparación con el control utilizando harina base. A) Fotografía de panes de 300g crudos y B) fotografía de los mismos panes cortados.

El pan denominado BASE, elaborado solo con la harina y sin agregado de aditivos enzimáticos, no presentó abertura donde se realizó el corte característico, su miga resultó compacta y muy cerrada, formando un pequeño piso en la base. El pan elaborado con el agregado de EEO se desarrolló con miga ligeramente más abierta que el pan BASE,

aumentando el piso debido a que la masa relajó más y abriendo la cara superficial donde se realizó el corte. Cuando se utilizaron las EX purificadas (SBA) como aditivo se observaron características similares al pan que contenía como aditivo Multizyme XT, logrando un adecuado desarrollo y buena abertura donde se realizó el corte. Además, mejoró el volumen del pan al dotar de solubilidad a la hemicelulosa degradada, la cual es insoluble en agua. De este modo fue posible unir el agua a la masa, disminuyendo su firmeza y aumentando su volumen en comparación con el pan control sin aditivo (BASE), obteniéndose un pan con mayor volumen y uniformidad, más tierno y con miga más fina.

En conclusión, la adición del extracto enzimático de xilanasas de *A. niger* purificado con SBA como aditivo en la elaboración de productos de panadería, mejoraron la estructura de la miga, el volumen, el piso y el corte del pan; teniendo un comportamiento similar al agregado de Multizyme XT.

CAPÍTULO 10 - Conclusión

Debido al creciente interés por incorporar enzimas a los procesos enmarcados en la Biotecnología Industrial, es importante contar con métodos de producción y purificación de biomoléculas que puedan ser aplicados a gran escala con elevado rendimiento y al menor costo.

Las enzimas del complejo xilanolítico, comúnmente denominadas xilanasas, se han utilizado en diversas aplicaciones, una de las principales es en la producción de pulpa y papel, ya que estas enzimas son capaces de hidrolizar el xilano, principal componente de la hemicelulosa en las plantas. Algunos autores han informado la obtención de xilanasas utilizando técnicas de bajo costo como la extracción líquido-líquido con sistemas bifásicos acuosos, alcanzando valores próximos al 80% de recuperación y factores de purificación ligeramente superiores a seis. Sin embargo, ninguno de ellos ha logrado obtener xilanasas libre de las enzimas que componen el sistema celulolítico.

En este contexto, se planteó el desarrollo de un proceso de producción de enzimas del sistema xilanolítico, a partir de un subproducto de la industria harinera, incluyéndolo bajo el concepto de economía circular. Se evaluó la posibilidad optimizar tanto el *upstream* como el *downstream* del proceso, priorizando el empleo de reactivos biodegradables e inocuos y reutilizando los residuos generados para alcanzar un proceso completamente sostenible.

Como punto de partida del *upstream* del proceso, se realizó la caracterización de extractos enzimáticos obtenidos de cultivos fúngicos, fermentaciones sumergidas y sólidas, efectuadas a partir de diferentes sustratos lignocelulósicos utilizados como única fuente de carbono. Se empleó el hongo filamentoso *Aspergillus niger*, el cual reviste categoría GRAS y es seguro su empleo en procesos destinados a consumo humano.

Dicha etapa se denomina planeamiento, y a partir de los resultados obtenidos, pudo establecerse que tanto el afrechillo de trigo, la cascarilla de soja y la harina de trigo (abundantemente disponibles en la región pampeana Argentina) eran los sustratos más adecuados en comparación a otros nueve sustratos ensayados, para la producción de enzimas hidrolíticas involucradas en la degradación de la pared celular vegetal. En consecuencia fueron seleccionados para realizar la optimización de la producción enzimática. Profundizando, se identificaron los factores que más afectan al proceso productivo, permitiendo así optimizar las condiciones metodológicas y maximizar la concentración de enzimas xilanolíticas respecto de las celulolíticas a partir de un diseño

central compuesto empleando metodología de superficie de respuesta (0,1 gramo de afrechillo de trigo sin tratamiento previo; 1 g/L de NaNO_3 , 29,09 mL de solución de cultivo a $\text{pH}=6,50$, a 30°C durante 4 días). El escalado de la fermentación optimizada (40 veces), permitió obtener el extracto enzimático sin variación en la calidad ni cantidad de las enzimas xilanolíticas (5,02 U/mL). El sólido generado está siendo utilizado como nutrientes en nuevos procesos fermentativos.

El secretoma optimizado de *A. niger* fue caracterizado fisicoquímicamente, y mediante espectrometría de masa se determinó el perfil proteico completo. Además, se evaluaron los parámetros cinéticos de las enzimas xilanolíticas (EX) del extracto indicando que la K_m aparente fue 2,3 veces menor que la de la endo- β -1,4-xilanasas, debido a la sinergia de las enzimas que conforman el EEO e hidrolizan conjuntamente el xilano. Las EX resultaron sensibles a la presencia de Cu^{2+} , siendo estables en un amplio rango de pH (3,00-9,00), con un tiempo de vida media superior a 120 días a temperaturas inferiores a 30°C , no requiriendo del agregado de cosolutos para su estabilización. Para analizar la eficiencia de las enzimas del EEO, se incubó cascarilla de soja con el extracto enzimático corroborándose que el conjunto de enzimas hidrolíticas es altamente activo en la degradación de la hemicelulosa y celulosa de la cascarilla de soja.

Iniciando el *downstream* del proceso de obtención de enzimas xilanolíticas fúngicas se caracterizaron tres diferentes técnicas de extracción, la tradicional precipitación con sulfato de amonio, la extracción líquido-líquido empleando sistemas bifásicos acuosos (SBAs) y finalmente cromatografía de intercambio iónico, para la cual se evaluaron columnas catiónicas y aniónicas.

En la precipitación con sulfato de amonio al 80% de saturación se obtuvo la mejor performance, sin embargo, el bajo rendimiento de las EX (38,7%) y el factor de purificación de 1,4 alcanzado no resultaron lo suficientemente adecuados para ser una técnica empleada en la purificación de EX a partir del EEO de *A. niger*.

En la extracción empleando SBAs fue factible mantener la actividad biológica y la solubilidad de la proteína debido a la alta biocompatibilidad y baja tensión interfacial. Se evaluaron sistemas formados por los polímeros de cadena flexible UCON y PEG de pesos moleculares promedio 600, 1450, 2000 y 4600, como también la sal (NaCit o KPi), la composición inicial de PCF y sales, agregado de NaCl, la variación de la relación de volúmenes de fases y la cantidad de EEO. Los sistemas UCON/sal resultaron adecuados para extraer los pigmentos en la fase superior y concentrar las proteínas en la fase inferior. Mientras que los sistemas PEG/sal resultaron más adecuados para la

separación de las EX del resto de las proteínas. La sal que forma los sistemas influyó en el reparto de las EX, obteniéndose los mejores resultados al emplear NaCit respecto de KPi con la ventaja que presenta la sal citrato de ser biodegradable y no tóxica. El aumento del peso molecular del PEG condujo a un incremento en el reparto de las proteínas hacia la FI rica en sal de los sistemas. Las EX se concentraron mayoritariamente en la FS mientras que las EC lo hicieron en la fase contraria siendo el sistema PEG1450/NaCit el más adecuado por presentar la fase superior prácticamente libre de otras proteínas.

En base a los resultados descriptos, se ensayó la extracción combinada y consecutiva de los sistemas UCON/NaCit y PEG/NaCit. Primeramente, fue posible extraer los pigmentos producidos durante la fermentación en la fase superior del sistema UCON/NaCit, y dada la característica termoinducible que presenta el UCON, al calentar dicha fase a 30°C fue posible recuperar y reutilizar en subsiguientes sistemas el polímero. Por otra parte en la fase inferior se concentraron las proteínas del EEO, y se utilizó para formar un nuevo sistema (extracción secundaria) formado por PEG1450 y NaCit en el cual se recuperaron en la fase superior las enzimas endo- β -1,4-xilanasas B y C con una abundancia relativa del 38%. La combinación de ambos SBA permitió incrementar la capacidad separativa de las EX respecto de las EC, alcanzando un factor de purificación próximo a cuatro y un %R_{EX} del 80%, recuperándose la sal citrato de sodio de la fase inferior para su reutilización en nuevos SBAs.

Seguidamente, se evaluó a las enzimas purificadas por extracción combinada de los SBA y las del EEO, como aditivos enzimáticos en la elaboración de pan de harina de trigo. En particular las enzimas purificadas mediante SBA combinados mejoraron la estructura de la miga, el volumen, el peso y el corte del pan; teniendo un comportamiento similar al agregado de aditivos empleados comúnmente en la industria panadera.

El fraccionamiento de proteínas por cromatografía de intercambio iónico fue óptimo al emplear una columna Q Sheparosa XL, siendo el %R_{EX} de esta etapa de purificación de 99,2% y factor de purificación de 2,9.

En relación a esto último, se planteó una estrategia integrada para la bioseparación de las EX combinando la extracción consecutiva UCON15%P/P / NaCit7%P/P y PEG15,5%P/P / NaCit13,6%P/P con un $V_{sup}/V_{inf}= 1$, a pH 5,2 y temperatura de 22°C con la cromatografía aniónica en la columna Q Sheparosa XL a flujo de 1mL/min, volumen de inyección de 100 μ L, gradiente de elución en 2 minutos y tiempo de lavado 1 de 5 minutos. El proceso permitió obtener las enzimas

xilanolíticas libres de las celulolíticas con un rendimiento cromatográfico de 99,2% y un factor de purificación de 2,9.

En consecuencia, es posible concluir que el bioproceso diseñado en este trabajo fue eficiente para la obtención de EX de *A. niger*, alcanzando un rendimiento total de 79,9% un factor de purificación de 11 y actividad xilanolítica de 0,49 U/ml correspondientes a endo- β -1,4-xilanasas B y C, las que se encuentran libres de las enzimas celulolíticas, lo cual permitiría su utilización en la industria papelera.

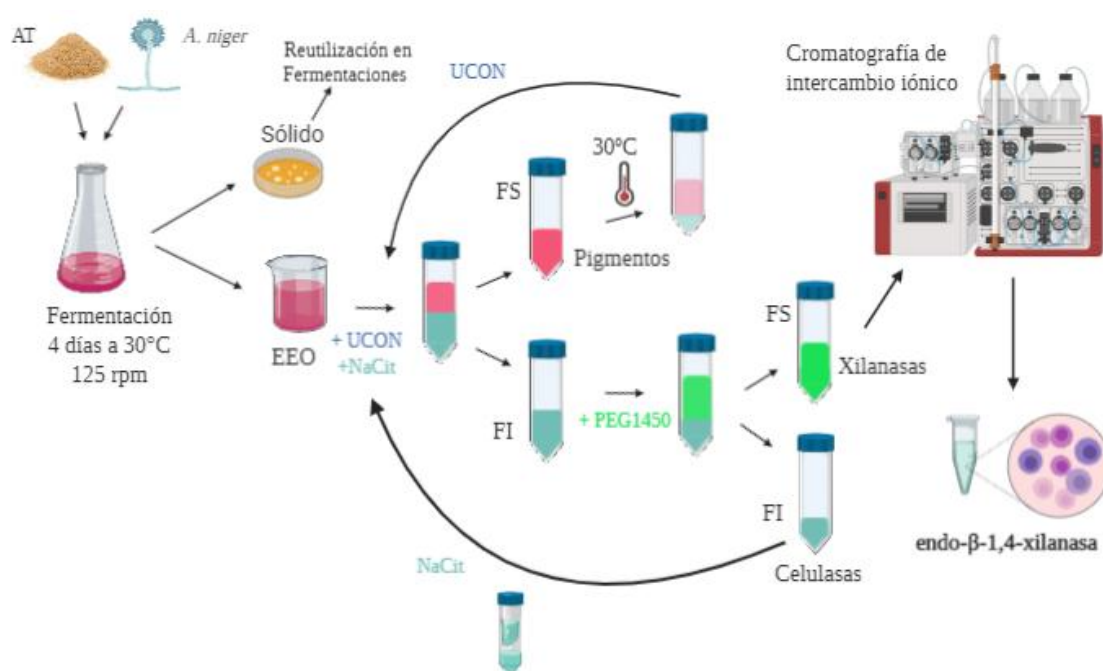


Figura 10.1: Diagrama de la metodología propuesta para el bioproceso de producción de endo- β -1,4-xilanasas a partir de *A. niger* utilizando afrechillo de trigo como sustrato.

CAPITULO 11 - ANEXO

11.1. Producción Fúngica de Enzimas Hidrolíticas

Tabla 11.1: ANOVA del DFF para la respuesta actividad EX producida por fermentación de A. niger utilizando como sustrato cascarilla de soja

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	350952	31905	9.76	0.006
Lineal	5	251118	50224	15.37	0.002
C	1	72	72	0.02	0.887
N	1	37575	37575	11.50	0.015
NaOH	1	98377	98377	30.11	0.002
pH	1	890	890	0.27	0.620
Mandel	1	124497	124497	38.10	0.001
Interacciones de 2 términos	6	95389	15898	4.87	0.038
C*N	1	8551	8551	2.62	0.157
C*pH	1	62871	62871	19.24	0.005
C*Mandel	1	4512	4512	1.38	0.284
N*Mandel	1	168	168	0.05	0.828
NaOH*pH	1	16155	16155	4.94	0.068
NaOH*Mandel	1	6304	6304	1.93	0.214
Error	6	19606	3268		
Falta de ajuste	4	10570	2642	0.58	0.709
Error puro	2	9036	4518		
Total	17	370558			

Tabla 11.2: ANOVA del DFF para la respuesta relación de actividad EX/EG de la fermentación de A. niger utilizando como sustrato cascarilla de soja.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	15	764.170	50.945	52.76	0.019
Lineal	5	312.186	62.437	64.66	0.015
C	1	2.774	2.774	2.87	0.232
N	1	37.261	37.261	38.59	0.025
NaOH	1	195.546	195.546	202.50	0.005
pH	1	68.143	68.143	70.57	0.014
Mandel	1	16.235	16.235	16.81	0.055
Interacciones de 2 términos	10	436.818	43.682	45.24	0.022
C*N	1	1.846	1.846	1.91	0.301
C*NaOH	1	47.859	47.859	49.56	0.020
C*pH	1	7.235	7.235	7.49	0.112
C*Mandel	1	71.910	71.910	74.47	0.013
N*NaOH	1	64.152	64.152	66.43	0.015
N*pH	1	154.209	154.209	159.69	0.006
N*Mandel	1	0.205	0.205	0.21	0.690
NaOH*pH	1	54.896	54.896	56.85	0.017
NaOH*Mandel	1	62.794	62.794	65.03	0.015
pH*Mandel	1	0.051	0.051	0.05	0.839
Error	2	1.931	0.966		
Total	17	766.102			

Tabla 11.3: ANOVA del DFF para la respuesta relación de actividad específica EX de la fermentación de A. niger utilizando como sustrato cascarilla de soja.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	2025.56	184.142	1.06	0.496
Lineal	5	361.14	72.228	0.42	0.822
C	1	0.97	0.968	0.01	0.943
N	1	6.68	6.680	0.04	0.851
NaOH	1	268.81	268.808	1.55	0.259
pH	1	3.89	3.886	0.02	0.886
Mandel	1	68.77	68.766	0.40	0.552

Interacciones de 2 términos	6	1726.29	287.716	1.66	0.277
C*N	1	562.93	562.927	3.25	0.121
C*pH	1	756.84	756.844	4.37	0.082
C*Mandel	1	362.16	362.159	2.09	0.198
N*Mandel	1	30.65	30.653	0.18	0.689
NaOH*pH	1	12.00	12.003	0.07	0.801
NaOH*Mandel	1	101.03	101.029	0.58	0.474
Error	6	1039.25	173.208		
Falta de ajuste	4	695.24	173.810	1.01	0.552
Error puro	2	344.01	172.005		
Total	17	3064.81			

Tabla 11.4: ANOVA del DFF para la respuesta relación de actividad EX de la fermentación de A. niger utilizando como sustrato salvado de trigo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	10	1759663	175966	9.94	0.003
Lineal	5	1298034	259607	14.66	0.001
C	1	28688	28688	1.62	0.244
N	1	141833	141833	8.01	0.025
NaOH	1	675308	675308	38.14	0.000
pH	1	32828	32828	1.85	0.215
Medio	1	427986	427986	24.17	0.002
Interacciones de 2 términos	5	460314	92063	5.20	0.026
C*pH	1	69364	69364	3.92	0.088
N*NaOH	1	57431	57431	3.24	0.115
N*Medio	1	90946	90946	5.14	0.058
NaOH*pH	1	53935	53935	3.05	0.124
NaOH*Medio	1	178663	178663	10.09	0.016
Error	7	123929	17704		
Falta de ajuste	5	75896	15179	0.63	0.706
Error puro	2	48033	24017		
Total	17	1883592			

Tabla 11.5: ANOVA del DFF para la respuesta relación de actividad EX/EG de la fermentación de A. niger utilizando como sustrato salvado de trigo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	184.164	16.7421	5.89	0.020
Lineal	5	102.538	20.5076	7.22	0.016
C	1	6.818	6.8175	2.40	0.172
N	1	60.000	59.9996	21.12	0.004
NaOH	1	5.324	5.3242	1.87	0.220
pH	1	36.157	36.1573	12.73	0.012
Medio	1	1.152	1.1522	0.41	0.548
Interacciones de 2 términos	6	83.571	13.9285	4.90	0.037
C*N	1	6.965	6.9653	2.45	0.168
C*pH	1	6.409	6.4090	2.26	0.184
C*Medio	1	39.902	39.9024	14.05	0.010
N*pH	1	17.540	17.5404	6.18	0.047
N*Medio	1	7.996	7.9964	2.82	0.144
NaOH*Medio	1	9.979	9.9791	3.51	0.110
Error	6	17.042	2.8403		
Falta de ajuste	4	15.570	3.8924	5.29	0.165
Error puro	2	1.473	0.7363		
Total	17	201.206			

Tabla 11.6: ANOVA del DFF para la respuesta relación de actividad específica EX de la fermentación de A. niger utilizando como sustrato salvado de trigo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	1127.49	102.50	3.69	0.061
Lineal	5	647.78	129.56	4.66	0.044
C	1	130.30	130.30	4.69	0.074
N	1	51.60	51.60	1.86	0.222
NaOH	1	400.96	400.96	14.42	0.009

pH	1	60.53	60.53	2.18	0.191
Medio	1	19.23	19.23	0.69	0.438
Interacciones de 2 términos	6	558.80	93.13	3.35	0.083
C*N	1	65.06	65.06	2.34	0.177
C*NaOH	1	66.99	66.99	2.41	0.172
C*pH	1	111.95	111.95	4.03	0.092
C*Medio	1	96.11	96.11	3.46	0.112
N*Medio	1	127.41	127.41	4.58	0.076
NaOH*pH	1	78.51	78.51	2.82	0.144
Error	6	166.86	27.81		
Falta de ajuste	4	126.22	31.56	1.55	0.428
Error puro	2	40.64	20.32		
Total	17	1294.35			

Tabla 11.7: ANOVA del DFF para la respuesta relación de actividad EX de la fermentación de A. niger utilizando como sustrato afrechillo de trigo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	2908462	363558	6.84	0.005
Lineal	5	2068259	413652	7.78	0.004
C	1	228	228	0.00	0.949
N	1	193214	193214	3.63	0.089
NaOH	1	1067054	1067054	20.07	0.002
pH	1	44210	44210	0.83	0.386
Medio	1	800037	800037	15.05	0.004
Interacciones de 2 términos	3	701149	233716	4.40	0.036
N*pH	1	275921	275921	5.19	0.049
N*Medio	1	175247	175247	3.30	0.103
NaOH*Medio	1	286535	286535	5.39	0.045
Error	9	478475	53164		
Falta de ajuste	7	322019	46003	0.59	0.750
Error puro	2	156456	78228		
Total	17	3386937			

Tabla 11.8: ANOVA del DFF para la respuesta relación de actividad EX/EG de la fermentación de A. niger utilizando como sustrato afrechillo de trigo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	15	501.704	33.4469	8634.91	0.000
Lineal	5	221.952	44.3905	11460.18	0.000
C	1	51.203	51.2031	13218.98	0.000
N	1	82.956	82.9562	21416.61	0.000
NaOH	1	3.163	3.1632	816.64	0.001
pH	1	49.406	49.4059	12755.01	0.000
Medio	1	31.451	31.4507	8119.55	0.000
Interacciones de 2 términos	10	297.842	29.7842	7689.32	0.000
C*N	1	29.054	29.0537	7500.72	0.000
C*NaOH	1	17.000	16.9996	4388.76	0.000
C*pH	1	38.831	38.8308	10024.86	0.000
C*Medio	1	60.756	60.7558	15685.17	0.000
N*NaOH	1	1.877	1.8770	484.58	0.002
N*pH	1	15.269	15.2689	3941.93	0.000
N*Medio	1	3.552	3.5519	917.00	0.001
NaOH*pH	1	25.750	25.7500	6647.82	0.000
NaOH*Medio	1	78.536	78.5358	20275.41	0.000
pH*Medio	1	37.439	37.4392	9665.59	0.000
Error	2	0.008	0.0039		
Total	17	501.712			

Tabla 11.9: ANOVA del DFF para respuesta actividad específica EX de la fermentación de A. niger utilizando como sustrato afrechillo de trigo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	15	1765.43	117.696	56.94	0.017
Lineal	5	1107.68	221.536	107.18	0.009
C	1	246.43	246.426	119.22	0.008

N	1	137.38	137.375	66.46	0.015
NaOH	1	626.08	626.079	302.89	0.003
pH	1	91.74	91.736	44.38	0.022
Medio	1	24.27	24.273	11.74	0.076
Interacciones de 2 términos	10	683.69	68.369	33.08	0.030
C*N	1	69.50	69.499	33.62	0.028
C*NaOH	1	114.13	114.129	55.21	0.018
C*pH	1	49.69	49.686	24.04	0.039
C*Medio	1	79.31	79.313	38.37	0.025
N*NaOH	1	78.29	78.287	37.87	0.025
N*pH	1	19.01	19.013	9.20	0.094
N*Medio	1	103.85	103.846	50.24	0.019
NaOH*pH	1	150.54	150.542	72.83	0.013
NaOH*Medio	1	0.00	0.002	0.00	0.980
pH*Medio	1	33.88	33.881	16.39	0.056
Error	2	4.13	2.067		
Total	17	1769.57			

11.2. Caracterización del EEO, FS y FI

Tabla 11.10: Enzimas del EEO, FS y FI identificadas por espectrometría de masa.

Accession	Description	M W [kDa]	calc, pI	%emPA I EEO	%emP AI FS	%emPA I FI
A2Q7I0	endo-1,4-beta-xylanase B (xlnB)	24,0	5,45	0,5	2,3	--
A2QFV7	endo-1,4-beta-xylanase C (xlnC)	35,5	6,65	6,0	35,7	3,4
A2QFV9	alpha-L-arabinofuranosidase axhA (axhA)	35,8	4,86	15,2	9,4	10,8
A2R511	alpha-L-arabinofuranosidase B (abfB)	52,5	4,44	2,4	1,2	2,2
A2QAN3	beta-galactosidase A (lacA)	109, 6	5,21	1,5	--	0,5
A2QA27	exo-1,4-beta-xylosidase xlnD (xlnD)	87,2	4,89	0,9	--	1,6
A2QEJ9	alpha-galactosidase B (aglB)	48,8	5,08	1,6	--	0,8
A2QYU7	feruloyl esterase C (faeC)	28,6	5,02	0,7	2,8	--
A2QSY5	feruloyl esterase A (faeA)	30,5	4,55	1,9	14,5	--
A2R3X3	alpha-glucuronidase A (aguA)	93,7	5,38	0,1	--	0,8
A2RAL4	beta-glucosidase A (bglA)	93,2	4,78	4,2	--	8,6
A5ABF5	beta-glucosidase M (bglM)	82,1	4,74	2,4	--	1,6
A2RAR6	glucan 1,3-beta-glucosidase A (exgA)	45,5	5,19	4,6	1,8	6,2
A2QPC3	endo-beta-1,4-glucanase B (eglB)	36,5	4,55	0,6	--	0,8
A2R3L3	Aspergillopepsin-1 (pepA)	41,3	4,67	1,9	--	0,4
A2R0E0	Extracellular exo-inulinase inuE (inuE)	59,1	5,43	1,5	--	0,4

A2QKT4	mannan endo-1,4-beta-mannosidase A (manA)	41,2	4,61	2,4	--	1,3
A2QAI7	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B (cbhB)	56,2	4,3	4,0	0,4	5,6
A2QSK6	Beta-fructofuranosidase suc1-Aspergillus niger (suc1)	63,6	5,06	0,6	--	0,2
A5AAG2	arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase C (abnC)	34	4,87	2,4	--	3,6
A2R0Z6	feruloyl esterase B (faeB)	57,2	5,2	0,5	--	0,3
A2QQ99	Glucanase (An08g01760)	42,1	4,31	0,5	--	2,1
A2QH21	glucan endo-1,3-beta-glucosidase eglC (eglC)	46,3	4,49	0,9	0,6	0,3
A2QUZ1	1,3-beta-glucanosyltransferase (An10g00400)	48,4	4,93	1,5	--	2,4
A2QT39	1,3-beta-glucanosyltransferase (An09g00670)	56,7	4,26	0,6	--	0,5
A2QAC9	Aspergillus niger contig An01c0330 (An01g11010)	39,9	4,25	0,9	0,3	0,9
A2QQS9	Aspergillus niger contig An08c0100 (An08g03580)	32,1	4,78	0,4	0,2	0,7
A2Q7T0	Catalase (catR)	80,4	5,83	0,2	--	0,6
A2QAS2	mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2- mannosidase 1B (mns1B)	55,9	5,05	1,0	--	0,3
A2QHE1	Glucoamylase (glaA)	68,3	4,45	7,2	0,3	4,8
A2QW02	Acid alpha-amylase (An11g03340)	55,2	4,46	7,4	--	2,4
A5AA94	Aspergillus niger contig An02c0200 (An02g07020)	45,3	5,11	2,2	0,8	0,9
A2Q852	Aspergillus niger contig An01c0080 (An01g03090)	104,8	5,52	0,7	0,3	0,3
A2QMJ7	Aspergillus niger contig An07c0050 (An07g02360)	59,7	5,83	1,1	--	0,1
A2QJF7	Extracellular alpha-glucosidase aglU (aglU)	108,8	5,35	0,7	--	0,6
A2QBC2	Aspergillus niger contig An01c0470 (An01g14730)	41,6	5,73	1,2	--	0,4
A2Q7Q4	Aspergillus niger contig An01c0070 (An01g01550)	80,2	5,3	0,6	--	0,1

A2QTU5	Alpha-xylosidase A (ax1A)	82,5	5,66	0,3	--	0,1
A2QG29	Peptide hydrolase (An03g01660)	59,3	4,89	0,5	--	0,9
A2QUK3	Sulphydryl oxidase Sox (Sox)	43,5	5,73	1,0	--	0,3
A2QE24	Aspergillus niger contig An02c0270 (An02g09090)	44,1	4,79	1,1	--	0,7
A2QP93	Aspergillus niger contig An07c0280 (An07g08640)	54,5	6,13	0,4	--	0,1
A2R5D5	Aspergillus niger contig An15c0130 (An15g03550)	27,3	6,15	1,0	1,9	0,2
A2QE77	Carboxylic ester hydrolase (An02g09690)	61,6	5,08	0,4	0	0,3
A2QAR3	Aspergillus niger contig An01c0370 (An01g12450)	98,7	4,7	0,4	--	0,4
A2R2Z3	Aspergillus niger contig An14c0100 (An14g02470)	65,7	5,68	0,2	--	0,3
A2QBE3	Aspergillus niger contig An01c0480 (An01g14940)	49,7	5,33	0,5	--	0,1
A2QPC2	Aspergillus niger contig An07c0310 (An07g08940)	35,1	4,82	1,5	--	0,6
A2QZS1	Aspergillus niger contig An12c0170 (An12g05960)	62,9	5,07	0,2	--	0,3
A2QW39	Aspergillus niger contig An11c0150 (An11g03740)	61,3	4,82	0,4	--	0,5
A2QV29	Aspergillus niger contig An10c0050 (An10g00800)	43,5	5,03	1,0	--	1,4
A2QR21	Endoprotease Endo-Pro (EPR)	58,7	4,58	0,4	0,3	0,9
A2QTI6	Beta-hexosaminidase (An09g02240)	67,7	4,89	0,2	--	0,7
A2QS54	Aspergillus niger contig An08c0220 (An08g08370)	86,2	5,03	0,3	--	0,4
A2QYR9	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase C (cbhC)	48,1	4,53	0,3	0,4	0,7
A2QF78	Aspergillus niger contig An02c0440 (An02g13580)	43,1	7,02	0,4	0,2	6,0
A2QTR2	Aspergillus niger contig An09c0070 (An09g02980)	40,6	5,2	0,5	0,6	6,8
A2QWD1	Prolyl aminopeptidase papA (papA)	57,7	6,67	0,3	0,1	1,1
A2QFR7	Aspergillus niger contig An03c0020	51,8	4,35	0,7	0,4	0,7

(An03g00500)						
A2QH12	Aspergillus niger contig An03c0160 (An03g05200)	62,6	4,73	0,4	--	0,3
A2QPG2	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A (cbhA)	48,2	4,32	0,3	--	0,7
A2QAC1	Aspergillus niger contig An01c0330 (An01g10930)	96,9	5,17	0,1	--	0,5
A2QF38	Aspergillus niger contig An02c0440 (An02g13180)	101	6,23	0,1	--	0,4
A2R322	Endoglucanase A eglA (eglA)	25,9	4,64	1,0	18,4	0,7
A2QWR0	Aspergillus niger contig An11c0240 (An11g06090)	29,6	6,39	0,4	--	0,7
A2R5N0	endo-beta-1,4-glucanase D (eglD)	42	5,63	0,2	--	0,4
A2QQH9	Aspergillus niger contig An08c0100 (An08g02590)	39,5	5,74	0,6	--	0,2
A2R6M6	Aspergillus niger contig An16c0020 (An16g00540)	54,8	5,31	0,3	0,1	2,1
A2RB48	Aspergillus niger contig An18c0170 (An18g05500)	82,9	5,35	0,1	--	0,3
A2QEI1	Aspergillus niger contig An02c0330 (An02g11180)	32,6	5,72	0,3	0,1	1,1
A2QF95	Aspergillus niger contig An02c0450 (An02g13750)	75,5	4,51	0,5	0,1	1,6
A2QHW0	Aspergillus niger contig An04c0070 (An04g01230)	41	4,51	0,4	--	0,4
A2QJY8	Aspergillus niger contig An04c0280 (An04g08730)	58,9	5,26	1,1	--	0,8

11.3. Análisis de costos de operaciones unitarias desarrolladas

Tabla 11.11: Compuestos y precios incluidos en el cálculo de CUP. Precios actualizados a septiembre de 2019.

Compuesto	Cantidad mínima adquirible (g)	MARCA	Precio u\$
Ácido bicinconinico	10	Sigma Aldrich	935,3
Agar papa glucosado	100	Bitania	46,5
Agua	5000		1,9
<i>Aspergillus niger</i>	10000		550,0

CaCl ₂	500	Cicarelli	11,3
Carboximetilcelulosa	1000	Sigma Aldrich	329,0
CoCl ₂	50	Cicarelli	20,3
CuSO ₄ ,5H ₂ O	250	Cicarelli	12,9
DNS	100	Sigma Aldrich	317,0
FeSO ₄ ,7H ₂ O	100	Cicarelli	6,5
Glicerol	500	Cicarelli	58,8
HCl	1000	Cicarelli	10,1
KH ₂ PO ₄	100	Cicarelli	7,2
MgSO ₄ ,7H ₂ O	1000	Cicarelli	14,6
MnSO ₄ ,H ₂ O	100	Cicarelli	8,7
Na ₂ CO ₃	1000	Cicarelli	83,0
NaCit	100	Cicarelli	6,1
NaCl	1000	Cicarelli	21,0
NaHCO ₃	1000	Cicarelli	32,0
NaNO ₃	250	Cicarelli	11,6
NaOH	1000	Cicarelli	33,7
PEG1450	1000	Sigma Aldrich	198,4
Tartrato de Na	100	Cicarelli	79,7
Tartrato Na y K	100	Cicarelli	11,3
Tela	100		1,5
Tris	1000	Sigma Aldrich	281,9
UCON	1000	Union Cibide	198,4
Xilano	50	Sigma Aldrich	555,6
ZnSO ₄	250	Cicarelli	11,1

Tabla 11.12: Materiales y precios incluidos en el cálculo de CUP. Precios actualizados a septiembre de 2019.

Materiales	Cantidad mínima adquirible	Precio U\$
------------	----------------------------	------------

Embudo	1	2,0
Erlenmeyer	1	3,5
Espátula	1	3,5
Tubos Falcon	50	13,0
Filtro de Jeringa	50	120,0
Filtro Nitrocelulosa	50	78,0
Jeringa	100	12,0
Micros	3	504,0
Mosca	1	3,8
Probeta	1	8,0
Tips	500	10,0
Tubos Eppendorf	500	17,0
Tubos Kahn	100	8,4
Vaso precipitado	1	3,5

Tabla 11.13: Instrumental y precios incluidos en el cálculo de CUP. Precios actualizados a septiembre de 2019.

Instrumental	MARCA	Precio u\$
phmetro	Hanna	570
Autoclave	Ficoinox	370
Estufa para cultivos	San Jor	1009
Agitador orbital	BOECO	680
Agitador magnético	BOECO	152
Balanza	OHAUS	2190
Centrífuga	Presvac	504
Cromatógrafo	GE Healthcare	15000
Columna Q Sepharosa XL	GE Healthcare	138
Calentador seco	Labnet	590
Espectrofotómetro	BOECO	3730

Tabla 11.14: Valuación de la energía y las horas hombre de los recursos humanos involucrados en el cálculo de CUP. Precios actualizados a septiembre de 2019.

	Entidad	Costo
Energía	Empresa Provincial Energía, Santa Fe	0,0606 u\$/KW
Horas Hombre	CONICET	3,4 u\$/hora

CAPÍTULO 12 - Referencias Bibliográficas

- Abbott, N L, D, Y Blankschtein, and T A Hatton. 1990. "On Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Polymer Systems." *Bioseparation*, 191–225.
- Ahmed, Ishtiaq, Muhammad Anjum Zia, Muhammad Azhar Hussain, Zain Akram, Muhammad Tahir Naveed, and Azin Nowrouzi. 2016. "Bioprocessing of Citrus Waste Peel for Induced Pectinase Production by *Aspergillus Niger*; Its Purification and Characterization ." *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 9 (2). Elsevier Ltd: 148–54. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.11.003>.
- Albertsson, Per Ake. 1986. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. 3^o Edition. New York: Wiley-Interscience.
- Alexandridis, Paschalis, Josef F. Holzwarth, and T. Alan Hatton. 1994. "Micellization of Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association." *Macromolecules* 27 (9): 2414–25. <https://doi.org/10.1021/ma00087a009>.
- Amore, Antonella, Simona Giacobbe, and Vincenza Faraco. 2013. "Regulation of Cellulase and Hemicellulase Gene Expression in Fungi." *Current Genomics* 14 (4): 230–49. <https://doi.org/10.2174/1389202911314040002>.
- Andersen, Mikael R., Malene Giese, Ronald P. de Vries, and Jens Nielsen. 2012. "Mapping the Polysaccharide Degradation Potential of *Aspergillus Niger*." *BMC Genomics* 13.
- Andreu, Paloma, Concepción Collar, and M. Antonia Martínez-Anaya. 1999. "Thermal Properties of Doughs Formulated with Enzymes and Starters." *European Food Research and Technology* 209 (3–4): 286–93. <https://doi.org/10.1007/s002170050495>.
- Aro, Nina, Tiina Pakula, and Merja Penttilä. 2005. "Transcriptional Regulation of Plant Cell Wall Degradation by Filamentous Fungi." *FEMS Microbiology Reviews* 29 (4): 719–39. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.006>.
- Aurelio, Marco, Torres Mora, and Juan Trujillo. 2017. "The Green Economy: A Necessary Environmental and Social Change in Today's World," 175–86.

- Azevedo, Ana M., Paula A.J. Rosa, I. Filipa Ferreira, and M. Raquel Aires-Barros. 2009. "Chromatography-Free Recovery of Biopharmaceuticals through Aqueous Two-Phase Processing." *Trends in Biotechnology* 27 (4): 240–47. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.01.004>.
- Bailey, Michael J., Peter Biely, and Kaisa Poutanen. 1992. "Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity." *Journal of Biotechnology* 23 (3): 257–70. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J).
- Bajpai, Pratima. 2014. *Xylanolytic Enzymes*. Oxford: Elsevier.
- Ballschmiter, Meike, Ole Fütterer, and Wolfgang Liebl. 2006. "Identification and Characterization of a Novel Intracellular Alkaline α -Amylase from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga Maritima* MSB8." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (3): 2206–11. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2206-2211.2006>.
- Banerjee, Debopam, Siddhartha Mukherjee, Swagata Pal, and Suman Khowala. 2016. "Enhanced Saccharification Efficiency of Lignocellulosic Biomass of Mustard Stalk and Straw by Salt Pretreatment." *Industrial Crops and Products* 80. Elsevier B.V.: 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.049>.
- Belén, Ana, Jorge Bolívar, Ignacio De Ory, Ildefonso Caro, and Ana Blandino. 2011. "LWT - Food Science and Technology Applicability of Enzymatic Extracts Obtained by Solid State Fermentation on Grape Pomace and Orange Peels Mixtures in Must Clari Fi Cation." *LWT - Food Science and Technology* 44 (4). Elsevier Ltd: 840–46. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.006>.
- Benavides, Jorge, and Marco Rito-Palomares. 2008. "Practical Experiences from the Development of Aqueous Two-Phase Processes for the Recovery of High Value Biological Products." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 83 (May): 133–42. <https://doi.org/10.1002/jctb.1844>.
- Benavides Lozano, Jorge, and Marco Rito-Palomares. 2008. "Aplicación Genérica de Sistemas de Dos Fases Acuósas Polietilén-glicol-sal Para El Desarrollo de Procesos de Recuperación Primaria de Compuestos Biológicos." *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 99–111.

- Beniwal, Vikas, and Anil Kumar Sharma. 2014. *Industrial Enzymes: Trends, Scope and Relevance*. Nova.
- Berlin, Alex, Mikhail Balakshin, Neil Gilkes, John Kadla, Vera Maximenko, Satoshi Kubo, and Jack Saddler. 2006. "Inhibition of Cellulase, Xylanase and β -Glucosidase Activities by Softwood Lignin Preparations." *Journal of Biotechnology* 125 (2): 198–209. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.021>.
- Bernardo, S. C., Ana M. Azevedo, and M. R. Aires-Barros. 2014. "Integrated Platforms for the Clarification and Capture of Monoclonal Antibodies." *Revista Mexicana de Ingeniera Qumica* 13 (2): 349–57.
- Bhardwaj, Nisha, Bikash Kumar, and Pradeep Verma. 2019. "A Detailed Overview of Xylanases: An Emerging Biomolecule for Current and Future Prospective." *Bioresources and Bioprocessing* 6 (1). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>.
- Biely, Peter, Oskar Markovič, and Danica Mislovičová. 1985. "Sensitive Detection of Endo-1,4- β -Glucanases and Endo-1,4- β -Xylanases in Gels." *Analytical Biochemistry* 144 (1): 147–51. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90096-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90096-X).
- Blandino, Ana, K. Dravillas, D. Cantero, S. S. Pandiella, and C. Webb. 2001. "Utilisation of Whole Wheat Flour for the Production of Extracellular Pectinases by Some Fungal Strains." *Process Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00241-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00241-2).
- Borghet, Anne Van Der, Hans Goesaert, Wim S. Veraverbeke, and Jan A. Delcour. 2005. "Fractionation of Wheat and Wheat Flour into Starch and Gluten: Overview of the Main Processes and the Factors Involved." *Journal of Cereal Science* 41 (3): 221–37. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.09.008>.
- Botella, C., I. De Ory, C. Webb, D. Cantero, and Ana Blandino. 2005. "Hydrolytic Enzyme Production by *Aspergillus Awamori* on Grape Pomace." *Biochemical Engineering Journal* 26 (2–3): 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.020>.
- Caballero, Pedro A., Manuel Gómez, and Cristina M. Rosell. 2007. "Bread Quality and Dough Rheology of Enzyme-Supplemented Wheat Flour." *European Food Research and Technology* 224 (5): 525–34. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0311-3>.

- Centro Nacional de Biotecnología Alemán. 1987. "BRENDA-Enzyme Database." 1987.
- Chávez-González, Mónica L., Nagamani Balagurusamy, and Cristóbal N. Aguilar. 2020. *Advances in Food Bioproducts and Bioprocessing Technologies*. New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Chen, Hongzhang. 2013. *Modern Solid State Fermentation*. *Modern Solid State Fermentation*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1>.
- CIARA. 2020. "Argentina Consulta de Molienda y Producción Por Provincias." Cámara de La Industria Aceitera de La Republica. 2020.
- Collins, Tony, Charles Gerday, and Georges Feller. 2005. "Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases." *FEMS Microbiology Reviews* 29 (1): 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>.
- Cortes Ortiz, William Giovanni. 2014. "Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos Para La Obtención de Etanol y Productos Químicos." *Revista de Tecnología* 13 (1): 39–44. <https://doi.org/10.18270/rt.v13i1.1297>.
- Costa, Marcia, Marcelo Torres, Haroldo Magariños, and Alejandro Reyes. 2010. "Producción y Purificación Parcial de Enzimas Hidrolíticas de *Aspergillus Ficum* En Fermentación Sólida Sobre Residuos Agroindustriales." *Revista Colombiana de Biotecnología* 12 (0123-3475): 163–75.
- Cunha, Teresa, and Raquel Aires-Barros. 2002. "Large-Scale Extraction of Proteins." *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology* 20 (1): 29–40.
- Cutler, Paul. 2004. *Protein Purification Protocols*. Edited by Paul Cutler. *Methods in Molecular Biology*. Second. Vol. 244. Totowa: Humana Press.
- Dobrev, Georgi, Boriana Zhekova, Ginka Delcheva, Lidia Koleva, Nicola Tziporkov, and Ivan Pishtiyski. 2009. "Purification and Characterization of Endoxylanase Xln-1 from *Aspergillus Niger* B03." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0112-5>.
- Eberts, T. J., R. H.B. Sample, M. R. Glick, and G. H. Ellis. 1979. "A Simplified, Colorimetric Micromethod for Xylose in Serum or Urine, with Phloroglucinol."

Clinical Chemistry.

- Elaiyaraja, C, V Senthil, M Ayyavoo, and S Ramu. 2016. "Amylase Activity of *Bacillus Amyloliquefaciens* and *Aspergillus Niger* From Agro Industrial Wastes By Solid State Fermentation." *International Journal of Zoology and Applied Biosciences* 1 (6): 268–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.5281/zenodo.1310819>.
- Farzana, Yasmin, Abdullah Minhal, Sethi Amin Amna, Saleem Hafsa, Narmeen Azra, Ansar Asma, Ahmed Khan Shakeel, and Ali Ul Qader Shah. 2016. "Solid State Fermentation: A Cost Effective Approach for Production of Starch Liquefying Fungal Amylase Using Agro Industrial Wastes." *Science International* 28 (3): 2703–6.
- Ferré, Joan, and F Xavier Rius. n.d. "Introducción Al Diseño Estadístico de Experimentos."
- Fiam. 2020. "Federación Argentina de La Industria Molinera." Estadística Nacional. 2020.
- Forciniti, D., C. K. Hall, and M. R. Kula. 1991. "Protein Partitioning at the Isoelectric Point: Influence of Polymer Molecular Weight and Concentration and Protein Size." *Biotechnology and Bioengineering* 38 (9): 986–94. <https://doi.org/10.1002/bit.260380905>.
- Ghori, Muhammad I., Muhammad A. Malana, and Jamil Jamil. 2011. "Corn Stover-Enhanced Cellulase Production by *Aspergillus Niger* NRRL 567." *African Journal of Biotechnology* 10 (31): 5878–86. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2342>.
- Ghose, T.K. 1987. "Measurment of Cellulase Activities." *INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY* 59 (5): 257–68.
- Glyk, Anna, Thomas Scheper, and Sascha Beutel. 2015. "PEG–salt Aqueous Two-Phase Systems: An Attractive and Versatile Liquid–liquid Extraction Technology for the Downstream Processing of Proteins and Enzymes." *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (16): 6599–6616. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6779-7>.
- González-González, Mirna, Karla Mayolo-Deloisa, and Marco Rito-Palomares. 2012. "PEGylation, Detection and Chromatographic Purification of Site-Specific PEGylated CD133-Biotin Antibody in Route to Stem Cell Separation." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*

- 893–894. Elsevier B.V.: 182–86. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.002>.
- Goyal, Meenakshi, K L Kalra, V K Sareen, and G Soni. 2008. “XYLANASE PRODUCTION WITH XYLAN RICH LIGNOCELLULOSIC WASTES BY A LOCAL,” 535–41.
- Greve, Arend, and Maria-Regina -R Kula. 1991. “Recycling of Salts in Partition Protein Extraction Processes.” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 50 (1): 27–42. <https://doi.org/10.1002/jctb.280500105>.
- Gunter, Pauli. 2017. *Plan A. La Transformación de La Economía Argentina*.
- Guo, Ning, Jia Zheng, Jian Tian, Lishuang Wu, and Hongbo Zhou. 2013. “Characterization and Constitutive Expression of an Acidic Mesophilic Endo-1,4-β-d-Xylanohydrolase with High Thermotolerance and Catalytic Efficiency in *Pichia Pastoris*.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1374-5>.
- Gutiérrez-Rojas, Ivonne, Nubia Moreno-Sarmiento, and Dolly Montoya. 2015. “Mechanisms and Regulation of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Filamentous Fungi: Classical Cases and New Models.” *Revista Iberoamericana de Micología* 32 (1). Revista Iberoamericana de Micología: 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>.
- Hanif, Atif, Amber Yasmeeen, and M. I. Rajoka. 2004. “Induction, Production, Repression, and de-Repression of Exoglucanase Synthesis in *Aspergillus Niger*.” *Bioresource Technology* 94 (3): 311–19. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.013>.
- Harris, D. P., A. T. Andrews, G. Wright, D. L. Pyle, and J. A. Asenjo. 1998. “The Application of Aqueous Two-Phase Systems to the Purification of Pharmaceutical Proteins from Transgenic Sheep Milk.” *Bioseparation* 7 (1): 31–37. <https://doi.org/10.1023/A:1007908703773>.
- Harris, J. Milton. 1992. *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry. Biotechnical and Biomedical Applications*. New York: Plenum Press.
- Healthcare, Ge. 2016. *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods. GE HealthCare Handbooks*.

- Hong Yang, Arafat M Goja. 2013. "Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation." *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* 04 (01): 1–8. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000140>.
- Horwitz, William. 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Gaithersburg MA.
- Houben, Andreas, Agnes Höchstötter, and Thomas Becker. 2012. "Possibilities to Increase the Quality in Gluten-Free Bread Production: An Overview." *European Food Research and Technology* 235 (2): 195–208. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1720-0>.
- Iqbal, Mujahid, Yanfei Tao, Shuyu Xie, Yufei Zhu, Dongmei Chen, Xu Wang, Lingli Huang, et al. 2016. "Aqueous Two-Phase System (ATPS): An Overview and Advances in Its Applications." *Biological Procedures Online* 18 (1). Biological Procedures Online: 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>.
- Ishikawa, Kazuhiko, Ikuo Matsui, Koichi Honda, and Hiroshi Nakatani. 1990. "Substrate-Dependent Shift of Optimum PH in Porcine Pancreatic α -Amylase-Catalyzed Reactions." *Biochemistry* 29 (30): 7119–23. <https://doi.org/10.1021/bi00482a025>.
- Izarra, Myriam L, Mónica L Santayana, Gretty K Villena, and Marcel Gutiérrez-Correa. 2010. "Influencia de La Concentración de Inóculo En La Producción de Celulasa y Xilanasa Por Aspergillus Niger The Influence of Inoculum Concentration on Cellulase and Xylanase Production by Aspergillus Niger." *Rev. Colomb. Biotecnol* XII (2): 103–12.
- Jegannathan, Kenthorai Raman, and Per Henning Nielsen. 2013. "Environmental Assessment of Enzyme Use in Industrial Production-a Literature Review." *Journal of Cleaner Production* 42. Elsevier Ltd: 228–40. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.11.005>.
- Jiang, Zhengqiang, Xiuting Li, Shaoqing Yang, Lite Li, and Szesze Tan. 2005. "Improvement of the Breadmaking Quality of Wheat Flour by the Hyperthermophilic Xylanase B from *Thermotoga Maritima*." *Food Research International* 38 (1): 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.07.007>.
- Kammoun, Radhouane, Belgacem Naili, and Samir Bejar. 2008. "Application of a

- Statistical Design to the Optimization of Parameters and Culture Medium for α -Amylase Production by *Aspergillus Oryzae* CBS 819.72 Grown on Gruel (Wheat Grinding by-Product).” *Bioresource Technology* 99 (13): 5602–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.045>.
- Karlström, Gunnar, Anders Carlsson, and Björn Lindman. 1990. “Phase Diagrams of Nonionic Polymer-Water Systems. Experimental and Theoretical Studies of the Effects of Surfactants and Other Cosolutes.” *Journal of Physical Chemistry* 94 (12): 5005–15. <https://doi.org/10.1021/j100375a045>.
- Kashyap, D. R., P. K. Vohra, S. Chopra, and R. Tewari. 2001. “Applications of Pectinases in the Commercial Sector: A Review.” *Bioresource Technology* 77 (3): 215–27. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8).
- Khalil, H P S Abdul, M Siti Alwani, and A K Mohd Omar. 2006. “Chemical Composition, Anatomy, Lignin Distribution, and Cell Wall Structure of Malaysian Plant Waste Fibers.” *BioResources* 1 (2): 220–32. <https://doi.org/10.15376/biores.1.2.220-232>.
- Kheng, Pang Pei, and Ibrahim Che Omar. 2005. “Xylanase Production by a Local Fungal Isolate, *Aspergillus Niger* USM AI 1 via Solid State Fermentation Using Palm Kernel Cake (PKC) as Substrate.” *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 27 (2): 325–36.
- Klich, Maren A., and John I Pitti. 1988. “A Laboratory Guide to the Common *Aspergillus* Species and Their Teleomorphs.” In *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing*.
- Krishna, Chundakkadu. 2005. “Solid-State Fermentation Systems - An Overview.” *Critical Reviews in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1080/07388550590925383>.
- la Horra, A. E. de, M. L. Seghezzo, E. Molfese, P. D. Ribotta, and A. E. León. 2012. “Indicadores de Calidad de Las Harinas de Trigo: Índice de Calidad Industrial y Su Relación Con Ensayos Predictivos.” *AgriScientia* 29 (2): 81–89.
- Laemmli, U K. 1970. “Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.” *Nature* 227 (August). Nature Publishing Group: 680. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.

- Li, Qian, Christopher S. Ray, Nicholas V. Callow, Abdullah A. Loman, S. M.M. Islam, and Lu Kwang Ju. 2020. "Aspergillus Niger Production of Pectinase and α -Galactosidase for Enzymatic Soy Processing." *Enzyme and Microbial Technology* 134 (November). Elsevier Inc.: 109476. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109476>.
- Lillford, Peter, and Anne-Marie Hermansson. 2019. "Global Challenges and the Critical Needs of Food Science and Technology." *IUFoST*.
- Loureiro, D.B. Dana B, Diana Romanini, and Gisela Tubio. 2016. "Structural and Functional Analysis of Aspergillus Niger Xylanase to Be Employed in Polyethyleneglycol/Salt Aqueous Two-Phase Extraction." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 5: 204–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.12.008>.
- Loureiro, Dana B. 2017. "Obtención de Xilanasas a Partir de Su Fuente Natural Mediante Tecnologías Bioseparativas Que Emplean Polímeros de Cadena Flexible."
- Lu, Xin, Jibin Sun, Manfred Nimtz, Josef Wissing, An Ping Zeng, and Ursula Rinas. 2010. "The Intra- and Extracellular Proteome of Aspergillus Niger Growing on Defined Medium with Xylose or Maltose as Carbon Substrate." *Microbial Cell Factories* 9: 1–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-23>.
- Maarel, Marc J.E.C. Van Der, Bart Van Der Veen, Joost C.M. Uitdehaag, Hans Leemhuis, and L. Dijkhuizen. 2002. "Properties and Applications of Starch-Converting Enzymes of the α -Amylase Family." *Journal of Biotechnology* 94 (2): 137–55. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00407-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00407-2).
- Martins-de-Souza, Daniel. 2014. *Shotgun Proteomics. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1156. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0685-7>.
- Miller, Gail Lorenz. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical Chemistry* 31 (3): 426–28. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Moral, Sandra del, Laura P Ramírez-coutiño, and María De Jesús García-gómez. 2015. "Aspectos Relevantes Del Uso de Enzimas En La Industria de Los Alimentos." *Revista Iberoamericana de Ciencias* 2 (3): 87–102.

Naciones Unidas. 1992. "Convenio Sobre La Diversidad Biologica," 1–34.

———. 2020a. "Naciones Unidas." Población. 2020.

———. 2020b. "Objetivos de Desarrollo Sostenible." 2020.

Nag, Alo, Gargi Mitra, and Prahlad C. Ghosh. 1996. "A Colorimetric Assay for Estimation of Polyethylene Glycol and Polyethylene Glycolated Protein Using Ammonium Ferrothiocyanate." *Analytical Biochemistry* 237 (2): 224–31. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0233>.

Nazir, Asiya, Rohit Soni, H. S. Saini, Amarjeet Kaur, and B. S. Chadha. 2010. "Profiling Differential Expression of Cellulases and Metabolite Footprints in *Aspergillus Terreus*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162 (2): 538–47. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8775-9>.

Oliveira, D. S., J. Telis-Romero, R. Da-Silva, and C. M.L. Franco. 2014. "Effect of a *Thermoascus Aurantiacus* Thermostable Enzyme Cocktail on Wheat Bread Quality." *Food Chemistry* 143. Elsevier Ltd: 139–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.103>.

Pal, Ajay, and Farhath Khanum. 2011. "Purification of Xylanase from *Aspergillus Niger* DFR-5 : Individual and Interactive Effect of Temperature and PH on Its Stability." *Process Biochemistry* 46 (4). Elsevier Ltd: 879–87. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.12.009>.

Pedrolli, Danielle Biscaro, Alexandre Costa Monteiro, Eleni Gomes, and Eleonora Cano Carmona. 2009. "Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes." *The Open Biotechnology Journal* 3 (1): 9–18. <https://doi.org/10.2174/1874070700903010009>.

Pellegrini Malpiedi, Luciana, Guillermo A. Picó, and Bibiana B. Nerli. 2011. "Studies of Protein Partition in Non Conventional Aqueous Two-Phase Systems as Method to Purify Trypsinogen and Alpha-Chymotrypsinogen from Bovine Pancreas." *Separation and Purification Technology* 78 (1). Elsevier B.V.: 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.01.026>.

Pellieri, Carlos Martín. 2017. "Optimización de Los Parámetros de Producción Fúngica

Extracelular Del Complejo Xilanolítico.” Universidad Nacional de Rosario.

Pérez, Rocío L R.L. Rocío L., D.B. Dana B. Loureiro, Bibiana B. Nerli, and Gisela Tubio. 2015. “Optimization of Pancreatic Trypsin Extraction in PEG/Citrate Aqueous Two-Phase Systems.” *Protein Expression and Purification* 106: 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.10.014>.

Persson, Josefine, Hans Olof Johansson, and Folke Tjerneld. 2000. “Biomolecule Separation Using Temperature-Induced Phase Separation with Recycling of Phase-Forming Polymers.” *Industrial and Engineering Chemistry Research* 39 (8): 2788–96. <https://doi.org/10.1021/ie9804125>.

Pessoa Junior, Adalberto, and Beatriz Vahan Kilikian. 2005. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*.

Polizeli, M. L.T.M. T. M., A. C.S. S. Rizzatti, R. Monti, H. F. Terenzi, J. A. Jorge, and D. S. Amorim. 2005. “Xylanases from Fungi: Properties and Industrial Applications.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 67 (5). Springer-Verlag: 577–91. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>.

Porfiri, María Cecilia, Guillermo A. Picó, Diana Romanini, and Beatriz Farruggia. 2011. “Aspergillus Oryzae Alpha-Amylase Partition in Potassium Phosphate-Polyethylene Glycol Aqueous Two-Phase Systems.” *International Journal of Biological Macromolecules* 49 (1): 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.03.003>.

Porfirif, María C., Esteban J. Milatich, Beatriz M. Farruggia, and Diana Romanini. 2016. “Production of Alpha-Amylase from Aspergillus Oryzae for Several Industrial Applications in a Single Step.” *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1022. Elsevier B.V.: 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.015>.

Preiss, Jack. 1988. *The Biochemistry of Plants*. Academic Press.

Queiroz Brito Cunha, Carolina Cândida de, Aline Rodrigues Gama, Lorena Cardoso Cintra, Luiz Artur Mendes Bataus, and Cirano José Ulhoa. 2018. “Improvement of Bread Making Quality by Supplementation with a Recombinant Xylanase Produced by *Pichia Pastoris*.” *PLoS ONE* 13 (2): 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192996>.

- Raja, Selvaraj, and Vytla Ramachandra Murty. 2012. "Development and Evaluation of Environmentally Benign Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Proteins from Tannery Waste Water." *ISRN Chemical Engineering* 2012: 1–9. <https://doi.org/10.5402/2012/290471>.
- Ratanakhanokchai, Khanok, Rattiya Waeonukul, Kazuo Sakka, Akihiko Kosugi, and Yutaka Mori. 2013. "Paenibacillus Curdlanolyticus Strain B-6 Multienzyme Complex : A Novel System for Biomass Utilization." *Biomass Now – Cultivation and Utilization*, 369–94.
- Rito-Palomares, Marco, and Jorge Benavides. 2017. *Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products. Food Engineering Series*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-59309-8>.
- Rogers, R.D., and M.A. Eiteman. 1995. *Aqueous Biphasic Separations. Biomolecules to Metal Ions*. New York: Plenum Press.
- Ruijter, George J.G., and Jaap Visser. 1997. "Carbon Repression in Aspergilli." *FEMS Microbiology Letters* 151 (2): 103–14. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00161-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00161-4).
- Ruíz-Leza, H. A., R. M. Rodríguez-Jasso, R. Rodríguez-Herrera, J. C. Contreras-Esquivel, and C. N. Aguilar. 2007. "DISEÑO DE BIORREACTORES PARA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO BIO-REACTORS DESING FOR SOLID STATE FERMENTATION H." *REVISTA MEXICANA DE INGENIERÍA QUÍMICA* 6: 33–40.
- Samborska, K, Y H Guiavarc, A V A N Loey, and M Hendrickx. 2006. "Alpha-Amylase in Presence of Sugars and Polyols" 29 (32): 287–303.
- Senior, D. J., P. R. Mayers, and J. N. Saddler. 1989. "Xylanase Production by *Trichoderma Harzianum* E58." *Applied Microbiology and Biotechnology* 32 (2): 137–42. <https://doi.org/10.1007/BF00165877>.
- Serventi, Luca, Leif H. Skibsted, and Ulla Kidmose. 2016. "Individual and Combined Effects of Water Addition with Xylanases and Laccase on the Loaf Quality of Composite Wheat–cassava Bread." *European Food Research and Technology* 242 (10). Springer Berlin Heidelberg: 1663–72. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2666->

4.

Shi, Changyou, Jun He, Jie Yu, Bing Yu, Xiangbing Mao, Ping Zheng, Zhiqing Huang, and Daiwen Chen. 2016. "Physicochemical Properties Analysis and Secretome of *Aspergillus Niger* in Fermented Rapeseed Meal." *PLoS ONE* 11 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153230>.

Soest, P. J. Van. 1983. *Nutritional Ecology of the Ruminant; Ruminant Metabolism, Nutritional Strategies, the Cellulolytic Fermentation and the Chemistry of Forages and Plant Fibers*. Corvallis: O & B Books.

Solís-Pereira, Sara, Ernesto Favela-Torres, Gustavo Viniegra-González, and Mariano Gutiérrez-Rojas. 1993. "Effects of Different Carbon Sources on the Synthesis of Pectinase by *Aspergillus Niger* in Submerged and Solid State Fermentations." *Applied Microbiology and Biotechnology* 39 (1): 36–41. <https://doi.org/10.1007/BF00166845>.

Souza, Wagner Rodrigo de. 2013. "Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass." *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*. <https://doi.org/10.5772/54325>.

Sutay Kocabaş, Didem, Sevgi Güder, and Neslihan Özben. 2015. "Purification Strategies and Properties of a Low-Molecular Weight Xylanase and Its Application in Agricultural Waste Biomass Hydrolysis." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 115: 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.01.012>.

Thomas, Leya, Binod Parameswaran, and Ashok Pandey. 2016. "Hydrolysis of Pretreated Rice Straw by an Enzyme Cocktail Comprising Acidic Xylanase from *Aspergillus Sp.* for Bioethanol Production." *Renewable Energy* 98. Elsevier Ltd: 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.05.011>.

Trinder, P. 1969. "Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor." *Ann. Din. Biochem* 6: 24–27.

Tubio, Gisela, Bibiana B Nerli, G.A. Picó, A. Venâncio, J. Teixeira, Guillermo A Pic, and Armando Ven. 2009. "Liquid – Liquid Equilibrium of the Ucon 50-HB5100 / Sodium Citrate Aqueous Two-Phase Systems." *Separation and Purification Technology* 65 (1): 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.01.018>.

- Tubio, Gisela, Luciana Pellegrini, Bibiana B. Nerli, and Guillermo A. Picó. 2006. "Liquid–Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly(Ethylene Glycols) of Different Molecular Weight and Sodium Citrate." *Journal of Chemical & Engineering Data* 51 (1): 209–12. <https://doi.org/10.1021/je050332p>.
- Tukey, John W. 1949. "Comparing Individual Means in the Analysis of Variance." *International Biometric Society* 5 (2): 99–114.
- USDA. 2020. "Departamento de Agricultura de Los Estados Unidos." 2020.
- Vásquez Vanegas, Anny Milena. 2013. "Producción de Xilanasas Por *Aspergillus* Sp. En Fermentación Sumergida y Fermentación En Medio Sólido." *Tesis de Grado. Universidad Iberoamericana.*, 1–91.
- Wolfgang, Achle. 2007. *Enzymes in Industry. Production and Applications*. Wiley-VCH.
- Yegin, Sirma, Burak Altinel, and Kubra Tuluk. 2018. "A Novel Extremophilic Xylanase Produced on Wheat Bran from *Aureobasidium Pullulans* NRRL Y-2311-1: Effects on Dough Rheology and Bread Quality." *Food Hydrocolloids* 81. Elsevier Ltd: 389–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.012>.
- Yuan, Qi Peng, Jian Dong Wang, Huai Zhang, and Zhong Ming Qian. 2005. "Effect of Temperature Shift on Production of Xylanase by *Aspergillus Niger*." *Process Biochemistry* 40 (10): 3255–57. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.020>.
- Zaslavsky, Boris Y. 1995. *Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical Chemistry and Bioanalytical Applications*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Zhan, Fei Xiang, Qin Hong Wang, Si Jing Jiang, Yu Ling Zhou, Gui Min Zhang, and Yan He Ma. 2014. "Developing a Xylanase XYNZG from *Plectosphaerella Cucumerina* for Baking by Heterologously Expressed in *Kluyveromyces Lactis*." *BMC Biotechnology* 14 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12896-014-0107-7>.