

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“Producción de invertasas de *Pleurotus ostreatus* en
fermentación sólida y sumergida”**

TESIS

**Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biológicas**

PRESENTA:

Biol. Pedro Cervantes Muñoz

Director:

Dr. Gerardo Díaz Godínez

AGOSTO 2013.



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Pedro Cervantes Muñoz** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Producción de invertasas de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida y sumergida”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 15 DE 2013


DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ


DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ


DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ


DRA. YURIDIA MERCADO FLORES


M. EN B. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradocbucat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Gabriel Cervantes Popoca

Gloria Muñoz Barba

Hermanos y cuñadas:

Juan Rubio Muñoz-Violeta Pérez Serrano

José Antonio Cervantes Muñoz-Fernanda Rodríguez Tepepa

Yuri Cervantes Muñoz

Pablo Cervantes Muñoz-Elizabeth Flores Zamora

Gustavo Cervantes Muñoz-Cecilia Solís Tonix

Mis sobrinos:

Jesús, Yahaira Tutuli, Paloma Yasira, José Félix, José Ángel, Kenia Paulette,
Christopher Antonio y Ángel Gael.

A ti Andrea por haberme soportado a lo largo de la carrera por ser parte de mis
caídas y haberme ayudado a levantarme para salir adelante Gracias.

Mis más sinceros agradecimientos

Dr. Gerardo Díaz Godínez

Dra. Maura Téllez Téllez

M. en B. Rubén Díaz Godínez

Por su apoyo y recomendaciones en la elaboración de esta tesis

A los compañeros del laboratorio de biotecnología de CICB por hacer más amena el ambiente dentro y fuera de él.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la actividad de *Pleurotus ostreatus* como productor de invertasas para ello se desarrolló la cepa, ATCC-32783, en dos sistemas, la fermentación sólida utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte y la fermentación sumergida en agitación continua, ambos sistemas se desarrollaron en cultivos por lote a nivel matraz. Para ambos sistemas se utilizó un medio adicionado con sacarosa que funcionó como única fuente de carbono, el pH inicial fue de 6.5, se tomaron muestras cada 36 h hasta transcurrir 612 h, en cada uno de los puntos se cuantificó la biomasa producida, perfil de pH, actividad enzimática y zimogramas de las fermentaciones.

La actividad de invertasa obtenida en la fermentación sólida fue aproximadamente 7 veces mayor que la observada en la sumergida (188.1 y 25.58 U/L, respectivamente). Con respecto a la generación de biomasa, resultó tener una mayor eficiencia nuevamente la fermentación sólida ya que se obtuvo una X_{max} de 4.15 g/L siendo tres veces mayor a lo obtenido por la sumergida donde la X_{max} fue 1.49 g/L, por otra parte los zimogramas muestran dos isoenzimas diferentes una de alto peso molecular y otra de bajo peso molecular para el caso de la fermentación sólida mientras que la fermentación sumergida también se observaron dos isoenzimas pero ambas de alto peso molecular.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEORICO	3
2.1 HONGOS	3
2.1.1 Basidiomicetos	5
2.1.2 Género <i>Pleurotus</i>	6
2.1.3 Proteínas de hongos y Enzimas	9
2.2 FERMENTACIÓN.	13
2.2.1 Fermentación sólida	14
2.2.2 Fermentación sumergida.	18
2.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	21
2.4.1 Geles en gradiente.....	23
3. ANTECEDENTES	24
4. JUSTIFICACION	29
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	29
6. OBJETIVOS.....	30
6.1 GENERAL.....	30
6.2 ESPECÍFICOS.....	30
7. METODOLOGÍA	31
7.1 MICROORGANISMO DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DEL INÓCULO.....	31
7.2 MEDIO DE CULTIVO Y DESARROLLO MICELIAL	31
7.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO ENZIMÁTICO Y DETERMINACIÓN DE BIOMASA .	32
7.4 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO DE <i>P.</i> <i>OSTREATUS</i> Y DE PRODUCCIÓN DE INVERTASA	32
7.5 DETERMINACIÓN DE PH.....	34
7.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	34
7.8 ZIMOGRFÍA.....	35

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
8.1. FERMENTACIÓN SÓLIDA	36
8.1.1 Biomasa producida.....	36
8.1.3 Evaluación de la actividad de Invertasa	37
8.1.4 Perfil de pH durante la fermentación	39
8.1.5 Isoenzimas de invertasa.....	40
8.2 FERMENTACIÓN SUMERGIDA.....	42
8.2.1 Biomasa producida.....	42
8.2.2 Evaluación de la actividad de Invertasa	44
8.2.3 Perfil de pH durante la fermentación	45
8.2.4 Isoformas de invertasa	46
8.2.5 Evaluación de los parámetros cinéticos.....	47
9. CONCLUSIONES	49
10. PERSPECTIVAS.....	50
11. REFERENCIAS.....	51
12. ANEXOS	64

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. CICLO BIOLÓGICO DE <i>PLEUROTUS</i> (TOMADO DE VALENCIA DEL TORO 2002)	9
FIGURA 2. REDUCCIÓN DE ÁCIDO 2,3-DINITRISALICILICO EN PRESENCIA DE UN AZÚCAR REDUCTOR	13
FIGURA 3. CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>P. OSTREATUS</i> EN FS.....	36
FIGURA 4. ACTIVIDAD DE INVERTASA DE <i>P. OSTREATUS</i> EN FS.....	38
FIGURA 5. PERFIL DE PH A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN SÓLIDA <i>P. OSTREATUS</i>	39
FIGURA 6. ZIMOGRAMA CON UN GEL DE GRADIENTE DE DIFERENTES TIEMPOS DE FERMENTACIÓN.....	40
FIGURA 7. GEL DE GRADIENTE DE POLIACRILAMIDA DE MUESTRAS DE 36 A 360 H DE FS TEÑIDOS CON CLORURO DE TRIFENILTETRAZOLIO. ...	41
FIGURA 8. CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>P. OSTREATUS</i> . EN FSM.	42
FIGURA 9. ACTIVIDAD DE INVERTASA DE <i>P. OSTREATUS</i>	44
FIGURA 10. COMPORTAMIENTO DE PH A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN SÓLIDA <i>P. OSTREATUS</i>	45
FIGURA 11. ZIMOGRAMAS DE INVERTASA PRODUCIDO DE <i>P. OSTREATUS</i> DE FSM.	46

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO *PLEUROTUS* 6

TABLA 2. COMPOSICIÓN BASAL DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA 32

TABLA 3 PARÁMETROS CINÉTICOS DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE
INVERTASA DE *P. OSTREATUS* EN FERMENTACIÓN SÓLIDA Y
FERMENTACIÓN SUMERGIDA. 47

1. INTRODUCCIÓN

La invertasa es una enzima hidrolítica que transforma la sacarosa en glucosa y fructosa, es una de las enzimas ampliamente utilizadas en la industria de alimentos, en la elaboración de dulces principalmente y en farmacéutica (Ashokkumar y cols. 2002). Se utiliza comercialmente como un biocatalizador en la hidrólisis del enlace (1, 2)-glucosídico en sacarosa. La mezcla resultante de la glucosa y la fructosa es más dulce que la sacarosa y no cristaliza tan fácilmente. Dulzor mejorado y una tendencia reducida a cristalizar son ventajas importantes en el procesamiento de productos de confitería (Uhlrig 1998). También catalizan la hidrólisis de rafinosa y estaquiosa (Arana y cols. 2006). Esta se puede utilizar para la obtención de fructoolisacáridos, los cuales son utilizados como sustancias prebióticas (Yoshikawa y cols. 2006). La actividad enzimática de invertasas se ha caracterizado principalmente en plantas (Hussain y cols. 2009) y hongos filamentosos, principalmente *Aspergillus* sp (Nguyen y cols. 2005).

La capacidad de los hongos para adaptar rápidamente su metabolismo a diversas fuentes de carbono y nitrógeno es determinante en su supervivencia; esta flexibilidad metabólica se logra a través de la producción de un gran número de enzimas intra y extracelulares que le permiten degradar biopolímeros complejos (Palmieri y cols. 2000).

El cultivo de hongos comestibles es una actividad que se ha implementado desde hace más de 200 años en Europa con la producción de champiñón (*Agaricus bisporus*), en Asia con el cultivo de especies como *Lentinula edoles* y *Auriculana*

spp. El desarrollo de hongos del género *Pleurotus*, a pesar de ser relativamente reciente, ha tenido un incremento significativo, de tal manera que en la actualidad se cultiva en casi todas las latitudes del mundo. Debido a la diversidad de sustratos sobre los que es capaz de crecer, permitiendo apreciar de manera directa el impacto benéfico de cultivar hongos para el aprovechamiento de desechos agropecuarios (Royse y Sánchez-Vásquez 2001; Aguilar-Doroteo 2007).

Los hongos del género *Pleurotus* son basidiomicetos de pudrición blanca, con un alto valor nutricional, propiedades terapéuticas y aplicaciones biotecnológicas. Una de sus principales características es su capacidad de degradar compuestos ligninocelulósicos, gracias a sus enzimas. Algunas especies se destacan por su valor nutricional, en particular por su calidad proteica, y para su cultivo se han implementado tecnologías semi-comerciales o comerciales (Guzmán y Mata 1990). El mercado de enzimas utilizadas en procesos industriales representa alrededor de mil millones de dólares anuales y los hongos filamentosos contribuyen con el 40% del total, se trata de un mercado en expansión, sobre todo por el desarrollo de nuevos procesos que utilizan enzimas conocidas y por la aplicación de enzimas nuevas en procesos conocidos (Archer y Peberdy 1997).

La mayoría de las enzimas utilizadas en procesos industriales se producen por fermentación sumergida (FSm), pero en los últimos años se han desarrollado sistemas alternativos para su producción por hongos filamentosos, como la fermentación sólida (FS). La FS es un sistema de cultivo más productivo que la FSm, e imparte interesante expresión a las enzimas producidas y al cultivo (Pandey y cols. 1999). El estudio de la producción de enzimas en medio sólido con

medios de cultivos sintéticos, impregnados sobre un soporte inerte permite estudiar el comportamiento de los hongos filamentosos en relación a la composición del medio de cultivo, la influencia de la actividad de agua, la liberación de calor entre otras (Oriol 1987).

2. MARCO TEORICO

2.1 Hongos

En el planeta se tienen diferentes tipos de microorganismos entre los que encontramos diferentes géneros de bacterias, levaduras y hongos filamentosos de los cuales estos últimos son los que han recibido mayor atención (Yegres 2001). Se estima que existen alrededor de 70.000 especies de hongos Macromycetes conocidas e identificadas, de las cuales aproximadamente 5.000 son setas comestibles en algún grado. Se ha reportado que solamente 100 de estas especies comestibles se han investigado experimentalmente, de los cuales solamente 50 se han desarrollados con fines económicos, y de estas solo 30 especies comestibles se cultivan a escala comercial y 6 a escala industrial (Pire 2001). En México muchas especies de hongos han sido reportadas como comestibles y algunas de ellas se consumen desde tiempos prehispánicos (Gaitán-Hernández 2006). Estos hongos a nivel alimenticio, poseen el doble del contenido de proteínas que los vegetales y disponen de los nueve aminoácidos esenciales, conteniendo con leucina y lisina (ausente en la mayoría de los cereales), poseen alta cantidad de minerales, bajo contenido de calorías y

carbohidratos, también se caracterizan por tener propiedades medicinales como producir retardo en el crecimiento de tumores, disminuir los niveles de colesterol en la sangre, poseer sustancias antioxidantes e inmunomoduladoras (Romero y cols. 2000). El conocimiento de los hongos se ha incrementado de tal forma, que actualmente es motivo de investigación por numerosos especialistas. Han surgido nuevos conocimientos que incluyen aspectos taxonómicos, ecológicos, nutricionales, farmacológicos y bioquímicos (Catalina-Bermúdez y cols. 2003).

Los hongos son un reino de seres vivos unicelulares o pluricelulares que no forman tejidos y cuyas células se agrupan formando un cuerpo filamentoso muy ramificado, viven sobre otros organismos es por ello que se dicen que son saprofitos o parásitos y forman líquenes. Los hongos tienen alimentación heterótrofa, puesto que no pueden realizar la fotosíntesis ya que no cuentan con clorofila, obtienen sus alimentos en forma directa o indirecta, almacenando sustancias nutritivas (trufas, colmenillas). Los hongos también son de gran importancia económica ya que tienen efectos tanto negativos como positivos en nosotros. Algunos son usados en la industria de bebidas como cerveza, vino, proveen numerosos antibióticos como la penicilina, enzimas, ácidos orgánicos (Wessels 1999).

Los hongos han sido importantes tanto en los procesos biotecnológicos antiguos como en los modernos, sin olvidar la gran importancia que tienen en la naturaleza y que aún está lejos de ser estimada; los procesos y productos que utilizan hongos incluyen, fabricación de cerveza y producción de antibióticos, alcoholes, enzimas, ácidos orgánicos y productos farmacéuticos, perfumes y cosméticos (Wessels

1999; Martínez-Carrera 2006), productos para la industria como en la fabricación de detergentes, y como actores en procesos de biorremediación (Chang y Miles 2004).

Los hongos están ligados a la vida del hombre en formas diversas de ahí la gran importancia de realizar estudios con ellos para conocer mejor su biología (Gayosso-Canales 2001). El cultivo de hongos a nivel mundial se ha incrementado notablemente en las últimas décadas. Entre las especies más cultivadas se encuentran algunas del género *Pleurotus* como *P. ostreatus* (Jacq: Fr.) Kumm (Guzmán 2000).

2.1.1 Basidiomicetos

Los basidiomicetos son un grupo más diverso de hongos, se conocen cerca de 20,000 especies entre las cuales se encuentran las conocidas setas, los bejines, falos, hongos de la madera, las royas y carbones y también los hongos gelatinosos; entre todos forman aproximadamente el 30% de los hongos conocidos. Su característica principal es la formación de basidios, meiosporangios que producen basidioesporas exógenas, uninucleadas y haploides. Entre los basidiomicetos, la especie *Schizophyllum commune* es el modelo más usado para estudiar la morfogénesis del cuerpo fructífero, porque crece bien en medios sólidos simples y tienen un ciclo de vida corto (Horton y cols. 1999). No obstante en los últimos años *P. ostreatus* ha adquirido gran importancia como organismo modelo para estudiar el fenómeno de la morfogénesis, gracias a la facilidad de degradar eficientemente ligninocelulosa, lo que permite cultivarlo en una variedad

de sustratos ricos en este polímero, además de ser basidiomicetos comestibles que producen metabolitos secundarios con aplicaciones farmacéuticas y algunas proteínas de uso industrial (Hadar y cols. 1992; Peñas y cols. 1998; Leonowicz 1999; Gayosso-Canales 2001).

2.1.2 Género *Pleurotus*

El género *Pleurotus* pertenece a la clase basidiomicetos, comprende a los hongos superiores, cuya principal característica es la presencia de basidios sobre los cuales se producen las basidioesporas. La familia Tricholomataceae está constituida por especies que producen esporas y que presentan coloración entre hialino en rosa en la tabla 1 se muestra la ubicación taxonómica del género (Kirk y cols. 2001).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Pleurotus*

Reino	Fungí
Phylum	Basidomicete
Clase	Homobasidiomicete
Orden	Agaricales
Familia	Tricholomataceae
Género	<i>Pleurotus</i>
Especie	spp

Los hongos en general son conocidos por su forma de paraguas, con un píleo más o menos circular y un eje o estípite que lo sostiene, pero para el caso de las setas este estípite es más lateral que céntrico, por lo que su desarrollo se da en forma de una ostra u oreja, su nombre científico es *Pleurotus*, término que deriva del griego pleurá o pleurón, costado o lado y del latín *otus*, oreja. Las setas se alimentan de la materia orgánica en la que están creciendo, degradando las sustancias con enzimas que liberan al medio que les rodea, por ello es importante el suministrar un substrato adecuado al hongo cuando se le intente cultivar para que los nutrientes puedan ser aprovechados por las hifas del micelio (Gaitán-Hernández 2006).

Las especies del género *Pleurotus* se han encontrado creciendo sobre gran variedad de árboles, reportándose siete especies sobre 30 diferentes hospederos (Guzmán 2000). Estas especies son consideradas entre las mejores especies degradadoras de materiales lignocelulosicos, reportándose reducciones hasta del 80% de la lignina y la celulosa presentes en los sustratos, posterior a las cosechas o corte de hongos (Hatakka y cols.1989).

La fase vegetativa es filamentosa porque está constituida por un conjunto de filamentos (hifas) denominado micelio (Herrera y Ulloa 1998). El crecimiento de éste se realiza sólo en las puntas y es un sistema de biomasa ramificada que se origina de la germinación de esporas o a partir de fragmentos de hifas. Su crecimiento se atribuye a un fenómeno complejo en el que participan vesículas, que son agregados de enzimas hidrolíticas y sintéticas que degradan y restauran fragmentos de la pared celular. Las vesículas se producen a lo largo del segmento

sub-apical y se transportan por medio de un mecanismo hasta llegar al centro distribuidor de vesículas conocido como Spitzenkörper. Desde ahí son distribuidas en forma radial y aleatoria hacia la pared apical dando lugar al crecimiento de las hifas (Viniegra-González y cols. 1993).

El crecimiento de la hifa causa que se formen sitios adicionales para la síntesis de la pared en la región sub-apical, originando ramificaciones laterales que a su vez sintetizan una nueva pared. La formación de las ramificaciones requiere de la producción de un nuevo ápice de la célula madre existente. El micelio tiene por función adquirir y distribuir los nutrientes, así como el crecimiento y la formación de la estructura de soporte para el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Valencia del Toro 2002).

En los basidiomicetos existen dos modelos sexuales 1) el homotalismo, término empleado para los hongos que son auto compatible, es decir, en los que la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio, y 2) el heterotalismo en el que son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está dentro de este último, donde las basidioesporas con un núcleo germinan (micelio primario monocariótico) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, formando un micelio secundario dicariótico con la presencia de fibulas, la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios, que se encuentran en las laminillas de cuerpo fructífero, posteriormente ocurre meiosis, dando origen a células haploides (basidioesporas), que son expulsadas hacia el ambiente (Guinberteau 1990) (figura 1).

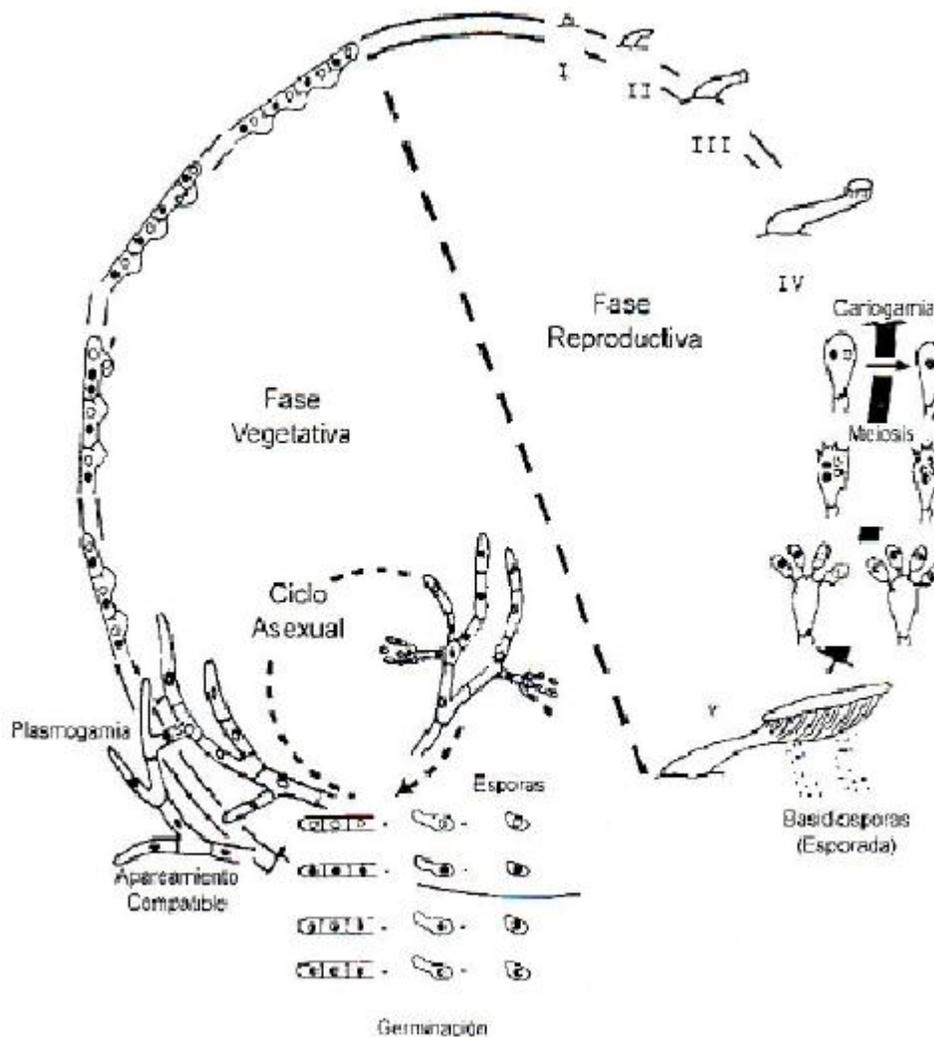


Figura 1. Ciclo biológico de *Pleurotus* (Tomado de Valencia del Toro 2002)

2.1.3 Proteínas de hongos y Enzimas

Durante el crecimiento del micelio y el desarrollo de cuerpos fructíferos, se sabe que los cambios bioquímicos ocurren como resultado de que las enzimas que son secretadas extracelularmente para degradar los materiales insolubles en los

sustratos a moléculas simples y solubles, los cuales son subsecuentemente utilizados por enzimas intracelulares del hongo. Las enzimas tienen un papel significativo en el desarrollo, además, también afecta a los nutrientes, el sabor y la vida útil de estos hongos (Zadrazil y cols. 2004). Una variedad de proteínas con acción biológica son producidas por el hongo y muchas de estas proteínas tienen actividades potenciales aplicables, que incluyen a proteínas de inactivación ribosomal, antifungicas, ribonucleasas, péptidos, fosfatasas, lectinas, celulasas, xilanasas, lacasas e invertasas (Mendivil–Salmón y cols. 2001).

2.1.3.1 Invertasas

El esfuerzo por entender la estructura de los azúcares, el proceso de fermentación, la naturaleza de las enzimas, la catálisis biológica, y la ruta del carbono asimilado durante la fotosíntesis y el seguimiento del curso de las rutas metabólicas, a menudo involucran el estudio de disacáridos, especialmente la sacarosa. Entre 1810 y 1830, se estableció la composición química del azúcar, por Gay Lussac, Berzelius y Dumas en 1828, Presoz en 1833, Peligot en 1838 y Biot en 1842, concluyeron que la sacarosa puede ser dividida por ácido o por un "fermento" derivado de la levadura u otras fuentes biológicas, produciendo un azúcar "reductor". Fue Dubrunfaut quien en 1847 finalmente estableció que esta reacción provee glucosa y una cetosa, la cual mostraba ser fructosa. La invertasa de levadura fue identificada como una entidad catalítica individual por Berthelot en 1860. Estudios posteriores de O'Sullivan, Fisher y Armstrong hacia finales del siglo XIX, y por Hudson entre 1908 y 1915, transformaron a la invertasa en un

agente comúnmente usado en el análisis de sacarosa y azúcares en general. La sacarosa, comúnmente conocida como azúcar de mesa, es un disacárido compuesto por moléculas de α -D-glucosa y β -D-fructosa unidas por enlace α 1-2, glucosídico. Cuando este enlace es roto, mediante una reacción hidrolítica se liberan cantidades equimolares de glucosa y fructosa (Tena-Aldave y Jorrín-Novo 2007).

La invertasa (β -D-fructofuranosidasa, β -D-fructofuranósido fructohidrolasa), cataliza la hidrólisis de restos terminales no reductores β -D-fructofuranosídicos de fructofuranósidos. Entre los sustratos sobre los que actúa el más significado es, sin duda, la sacarosa, de ahí que la enzima se designe con el nombre de sacarasa. La denominación trivial de invertasa, con la que también se conoce, hace referencia al hecho de que los productos de la reacción son conocidos desde antiguo como “azúcar invertido” ya que mientras la sacarosa es dextrorrotatoria, la mezcla equimolecular de glucosa y fructosa que resulta de su hidrólisis es levorrotatoria, por lo que en el proceso se origina un cambio de signo (de positivo a negativo) del valor de rotación óptica (Tena-Aldave y Jorrín-Novo 2007).



Las invertasas se pueden encontrar en diferentes isoformas conforme a su pH óptimo. Sin embargo la función específica aún no es clara, pero parece que el control de entrada de la sacarosa en la utilización de diferentes vías. La isoforma ácida que está localizada en la pared celular o en la vacuola, se ha relacionado con la evolución de las invertasas en las levaduras y bacterias (Sturm 1999),

difieren de las isoformas neutras y alcalinas que se han encontrado en el citosol (Vargas y cols. 2003). La invertasa es un enzima ampliamente distribuida, en microorganismos como en animales y vegetales, jugando un papel importante en el catabolismo de fructanos y más específicamente en el de la sacarosa, en especial en aquellos organismos en los que dichos azúcares son utilizados como fuente de carbono y energía. En levaduras, se ha reportado que el gen *Suc 2* codifica para dos invertasas diferentes, una glucosilada localizada en el espacio periplasmático y una forma no glucosilada localizada en el citosol (Herwing y cols. 2001).

Para la determinación de la actividad invertasa se utiliza un ensayo indirecto en el que los productos de reacción son detectados espectrofotométricamente tras su conversión en derivados coloreados. En concreto, la extensión de la hidrólisis enzimática de sacarosa (azúcar no reductor) en glucosa más fructosa (azúcares reductores) se valora mediante uno de los diversos métodos existentes para la estimación de azúcares reductores. Tal es el caso del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Chaplin 1986), figura 2, cuya presencia puede detectarse por lectura de la absorbencia en la zona de 540-570 nm.

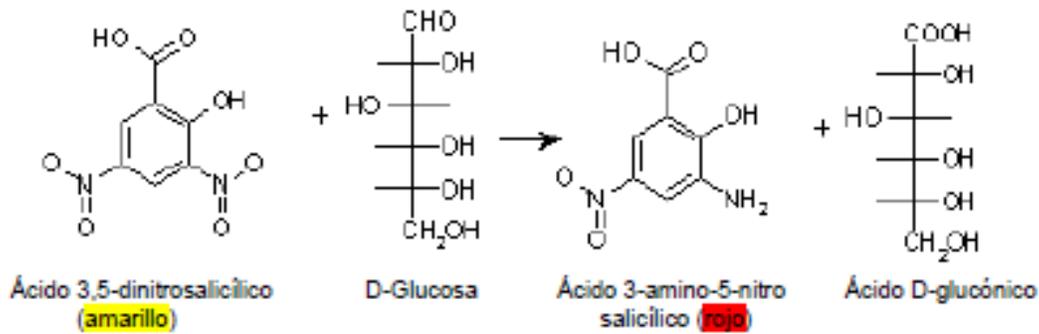


Figura 2. Reducción de ácido 2,3-dinitrisalicílico en presencia de un azúcar reductor

2.2 FERMENTACIÓN.

La fermentación es aquel conjunto de reacciones catabólicas productoras de ATP en las cuales las moléculas orgánicas actúan tanto como donadores primarios de electrones como aceptores finales de éstos (Lehninger 2007). Durante estas reacciones se producen compuestos de utilidad práctica para el hombre y es una costumbre hablar de fermentaciones para referirse, en el ámbito industrial, a los procesos microbiológicos de producción de tales compuestos (Brock y cols. 1987; Scriban 1985).

La mayoría de las fermentaciones industriales en la sociedad occidental han utilizado y desarrollado la denominada FSm (Hesseltine 1972; Harvey y McNeil 1993) en la cual los microorganismos son inoculados en una suspensión acuosa de nutrientes que se agita a fin de obtener un adecuado contacto entre estos y la fase abiótica (Scriban 1985).

Sin embargo, existe otra técnica general de fermentación denominada FS, que se ha usado tradicionalmente para la manufactura de varios productos como son el pozol que se produce en algunas áreas de México por la fermentación del maíz; quesos madurados como el Roquefort y Camembert, que son fermentados con esporas de *Penicillium roquefortii* y *Penicillium camemberti*, respectivamente (Pandey 1992).

2.2.1 Fermentación sólida

Aproximadamente el 90% de todas las enzimas industriales son producidas por FSm usando frecuentemente microorganismos manipulados genéticamente, en este aspecto la fermentación ofrece ventajas insuperables sobre la fermentación en medio sólido (Hölker y cols. 2004).

Hesseltine (1972) empleó el término de fermentación en estado sólido a todas las fermentaciones donde el sustrato no es líquido. Posteriormente, Raimbault (1980) propuso un término más preciso: "Las fermentaciones en las cuales el sustrato no está ni disuelto, ni en suspensión en un gran volumen de agua". No obstante, Moo-Young y cols. (1983), propusieron un término a todos los procesos que utilizan materiales insolubles en agua para el crecimiento de microorganismos en ausencia de agua libre; autores como Mudgett (1986) y Durand y cols. (1988), han planteado una definición más general: "Es un método de cultivo de microorganismos sobre y/o dentro de partículas sólidas". El líquido ligado a las partículas sólidas debe estar en una cantidad que asegure la actividad del agua

adecuada para el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos, pero sin exceder el máximo poder de retención de este líquido en la matriz sólida.

La definición más general y reciente fue formulada por Viniegra-González (1997), donde se plantea que "es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles". Esta definición abarca a procesos donde el soporte sólido es inerte y los sustratos que utiliza el microorganismo pueden ser sustancias solubles en agua, como el proceso de bioconversión de etanol y el crecimiento de *Candida utilis* sobre amberlita (Christen y cols. 1993).

Las bacterias, levaduras y hongos son los microorganismos que pueden crecer en fermentación sólida, pero la mayoría de las investigaciones se llevan a cabo con hongos filamentosos. El crecimiento en forma de micelio y su tolerancia a bajas actividades de agua y condiciones de alta osmolaridad hacen que los hongos sean la microflora natural más adecuada para la fermentación sólida la mayoría de los trabajos bajo este método es realizado con rastrojo o subproductos agroindustriales como son el gabazo de caña, zacate de maíz, pulpa de café, paja de trigo, etc., todos estos materiales aunque buenos para el desarrollo de los hongos, causan variaciones en la medición del hongo a través del peso seco de su biomasa. Un novedoso método de fermentación en estado sólido se ha desarrollado utilizando espumas de poliuretano (PUF) como soporte inerte impregnando sobre él un medio de cultivo líquido sintético, donde se simula la composición nutricional y condiciones de cultivo que anteriormente se llevaba a cabo en salvado de trigo. Con este sistema, la biomasa, que es un parámetro

importante para la evaluación de la fermentación en estado sólido puede ser medida directamente (Zhu y cols. 1994).

Los trabajos orientados hacia este campo van más enfocados a la producción de metabolitos primarios y/o secundarios tan diversos como proteínas, ácidos orgánicos, antibióticos o enzimas. Al variar las condiciones de cultivo se puede mejorar el rendimiento, optimizar la calidad y reducir costos del proceso de fermentación (Fukushima 1991). Por otro lado, parece ser que la producción de enzimas y el crecimiento del hongo están relacionados (Das 1997).

2.2.1.1 Espuma de poliuretano

En la búsqueda de materiales inertes para los microorganismos y de utilidad como soportes en la FS, se ha estudiado a la espuma de poliuretano como un buen candidato, ya que presentan elevada higroscopicidad y alta porosidad, no es biodegradable y permite la medición de la biomasa. La espuma de poliuretano es uno de los polímeros de uretano, formado típicamente por medio de reacción de un diisocianato y un glicol (Krause y cols. 1983).

Además de espumas, a través de esta reacción se pueden obtener fibras, elastómeros y recubrimientos. Las espumas de poliuretano poseen un elevado porcentaje de enlaces cruzados, lo que les confiere un elevado termo resistencia. En la producción de las espumas de uretano, los grupos isocianato en exceso del polímero reaccionan con agua o ácidos carboxílicos para producir dióxido de carbono, que origina la espuma, al mismo tiempo que se efectúa el

entrecruzamiento. Las espumas de uretano pueden hacerse en forma flexible o rígida, según la naturaleza del polímero y el tipo de enlaces cruzados producidos (Krause y cols. 1983).

Las espumas de uretano se hacen en varias etapas. Un intermediario básico de peso molecular alrededor de 1000 Da es un poliéster formado a partir de poli (1,4-butilenglicol), poliésteres de sorbitol u otros. El intermediario básico es bifuncional si se desean espumas flexibles y polifuncional si lo que deben hacerse son espumas rígidas. Se hacen reaccionar al intermediario con un diisocianato aromático, usualmente toluen diisocianato para dar un pre-polímero, se adicionan catalizadores basadas en aminas terciarias o en jabones de estaño para lograr la producción rápida de espuma. El entrecruzamiento se produce por medio de la formación de uniones de urea. Para aumentar o reemplazar la acción del soplado químico se ha propuesto el uso de líquidos inertes de bajo punto de ebullición, en particular de fluorocarbonos, esto ha conducido a ciertas propiedades ventajosas en las espumas finales, tales como la baja conductividad térmica, característica del gas de fluorocarbono que queda atrapado (Saunders y Frish 1964).

Existen espumas flexibles y rígidas. La densidad varía de 0.03 kg/L a 0.8 kg/L; la conductividad térmica es baja hasta 0.11, sirven como retardadores de la llama y como aislantes térmicos (Saunders y Frish 1964).

a) Espumas flexibles. Las espumas flexibles de uretano se utilizan para cojines en muebles y automóviles, desplazando a la espuma de caucho de estas

aplicaciones, por su mayor resistencia, menor densidad y más fácil fabricación (Saunders y Frish 1964).

b) Espumas Rígidas. Las espumas de uretano rígidas son resistentes a la compresión y pueden utilizarse para reforzar unidades estructurales huecas con un mínimo de peso. Además, consisten en células cerradas y tienen por ello bajos índices de transmisión de calor. Desarrollan una excelente adhesión cuando forman huecos o entre láminas de material. Finalmente, son resistentes a los aceites y la gasolina y no absorben cantidades apreciables de agua. Estas propiedades hacen a las espumas rígidas valiosas para las estructuras sándwich usadas en la prefabricación en la industria de la construcción, para el aislamiento térmico frigorífico, cabinas portátiles aisladas térmicamente, etc., además para dar flotabilidad a embarcaciones (Saunders y Frish 1964).

2.2.2 Fermentación sumergida.

El cultivo sumergido, también llamado fermentación líquida, es el que se refiere a un sistema en el cual los sustratos están disueltos o suspendidos en un medio acuoso y son agitados para conservar la homogeneidad del sistema (Henzler y Schedel 1991).

La forma de FSM más utilizada en los laboratorios de investigación es el matraz agitado. El desarrollo de esta técnica ha sido importante porque ha permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de la biomasa y ha simplificado el estudio de la fisiología de los

organismos. A su vez, el cultivo de suspensiones de células en fermentadores agitados ha evolucionado a gran escala, pues no es raro ver fermentadores con volúmenes superiores a 10 mil L, en los cuales se producen todo tipo de compuestos derivados del metabolismo microbiano. En estos sistemas, la agitación mecánica permite aumentar la transferencia del gas a la biomasa de tres formas básicas: 1) Dispersa el gas en burbujas más pequeñas incrementando el área de interface gas-líquido. 2) Incrementa el tiempo de contacto de líquido con las burbujas de gas. 3) Disminuye el grueso de la capa estacionaria del líquido al aumentar la turbulencia del cultivo. Además, la agitación mezcla el cultivo manteniéndolo homogéneo. Esto es particularmente importante para la dispersión de la biomasa y la transferencia de calor (Henzler y Schedel 1991). Los productos metabólicos y el calor se dispersan fácilmente, por lo que, no son un factor limitante para el crecimiento del microorganismo. La barrera principal de transferencia del O₂ en la FSm, es su baja solubilidad en el agua y, al hacerse mayor la capa de agua que debe cruzar, aumenta la dificultad para que llegue a la célula. Gran parte del gasto energético que debe realizarse en la FSm está relacionado con la necesidad de satisfacer la demanda de oxígeno en el crecimiento de los microorganismos, esto es muy claro en el caso de *Aspergillus niger*, que es un organismo aeróbico estricto y necesita una alta tasa de transferencia de oxígeno para mantener su crecimiento y producir muchos de los metabolitos de interés (Righelato 1975; Solomon 1975; Raimbault 1998).

Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido comparada con el cultivo sumergido en líquido.

Doelle y cols. (1992) consideran como ventajas los siguientes aspectos:

- Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
- La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación. Tienen mayor productividad volumétrica.
- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- Pueden emplearse, frecuentemente conidios como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y las manipulaciones en la preparación del inóculo.
- Los conidios de los hongos que se producen son mucho más resistentes y tienen mejor adaptabilidad a las condiciones en las que se aplican como agente de biocontrol.
- El proceso de recobrado es simplificado. Algunos productos son utilizados integralmente, como alimento animal, productos para el control biológico, etc.
- Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

Entre las principales desventajas se encuentran:

- Su aplicación se limita a microorganismos que crecen en bajos contenidos de humedad.
- La extracción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso.
- La naturaleza sólida del sustrato trae problemas al medir los parámetros de la fermentación tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos.
- Los procesos de transferencia de masa son limitados por la difusión.
- Muchos aspectos ingenieriles como el diseño de reactores y el escalado están muy poco caracterizados.
- El tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento.

Es bueno recalcar que algunas de estas desventajas son relativas, por ejemplo, el tiempo de fermentación ya que actualmente se están empleando bacterias en los procesos de FS.

2.4 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

La electroforesis fue desarrollada por primera vez por el químico sueco Arne Tiselius merecedor del premio nobel en 1948. Es una técnica analítica de separación basada en el movimiento o migración de macromoléculas disueltas en un determinado medio a través de una matriz o soporte reticulado como resultado

de la acción de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y por esto se puede hacer que existan en solución como en especies cargadas eléctricamente, como cationes (+) y aniones (-) las moléculas con una carga similar tienen diferentes radios carga/masa debido a las diferencias innatas en su peso molecular, esto es suficiente para que se forme una migración diferencial cuando los iones en la solución son los expuestos a un campo eléctrico. Este es el principio de la electroforesis (Bryan y Wilson 1976). Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. La poliacrilamida se forma por co-polimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros (Lomonte 2009).

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés "polyacrylamide gel electrophoresis"), probablemente la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), tanto para analizar mezclas de proteínas,

como para ser combinada con técnicas de inmunoelectrotransferencia. En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño: el SDS se une en una proporción aproximada de 1,4 g SDS/g proteína. Los complejos proteína/SDS poseen una estructura elipsoide o de bastón, donde la cadena proteica es distendida y solubilizada por el detergente. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), estas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y a mayor tamaño menor movilidad de la proteína (Lomonte 2009).

2.4.1 Geles en gradiente

Ciertos tipos de muestras poseen componentes con PMs muy variados, que incluyen desde macromoléculas hasta pequeños péptidos. En tales casos, el uso de un gel separador de concentración homogénea limita a resolver adecuadamente solo una fracción determinada de los componentes. La alternativa para estos casos es la utilización de geles de concentración heterogénea, en los cuales se prepara un gradiente que va desde una concentración baja, al inicio del gel (ej. 5%), aumentando hacia el final (ej. 30%). Estos geles proporcionan la mejor resolución obtenible por SDS-PAGE para mezclas heterogéneas, y su preparación requiere de un aditamento simple para generar gradientes, que puede ser obtenido comercialmente o preparado en el laboratorio (Lomonte 2009).

3. ANTECEDENTES

Se ha reportado que la FS es una buena alternativa para la producción de diversas enzimas de hongos, obteniendo mejores resultados que en la FSm, entre los trabajos con PUF como soporte inerte para la producción de exopectinasas por *A. niger*, con y sin sacarosa resulto tener mayor producción de esta enzima en comparación con la FSm (Díaz-Godínez y cols. 2001). Auria y cols. (1990), desarrollo un proceso usando una resina de intercambio iónico, (Amberlite IRA 900), como un soporte inerte de *A. niger*. Para el caso de la biomasa se midió directamente. La espuma de poliuretano fue utilizado por Fujishima y cols. (1972) para la producción de enzimas por hongos diferentes. Kobayashi y cols. (1991) utilizó PUF como soporte inerte para la producción de glucoamilasa de *A. oryzae*. Un sistema de fermentación con PUF es adecuado para lograr un control de composición en el medio y velocidad de avances, para separar el producto de forma fácil el soporte inerte lleva a cabo un proceso de FS continua o semi-continua a pesar de las muchas ventajas bien conocidas de FS en aplicaciones específicas en fermentación sumergida convencionales, es muy fácil monitorear los parámetros de control durante el proceso de FS. La biomasa, es un parámetro fundamental en la caracterización del crecimiento microbiano y estudios fisiológicos de la fermentación, es posible medir directamente en FS la participación de los hongos, porque los hongos penetran en ellos y se unen fuertemente a las partículas del substrato, el único informe sobre la medición de dirigir el crecimiento basado en el peso seco de biomasa utiliza un intercambiador de iones como portador de un proceso FS con *A. niger* (Auria y cols. 1990).

Otro factor que influye en la actividad enzimática es el pH, en este caso el pH óptimo de la invertasa es 4.5, pero se logra un 80% de actividad en el intervalo de 3.5–4.5 La temperatura es otro factor que interviene para la actividad enzimática ya que a temperaturas bajas hay inhibición de actividad así como a elevadas también se observa el fenómeno llegando a la desnaturalización de las enzimas, es por ello que las invertasas tienen actividad máxima entre 50-60 °C. El efecto de la concentración de sustrato es de particular relevancia, ya que la máxima actividad se logra con concentraciones de sacarosa del 5-10%. A concentración de sacarosa del 70% la actividad es solo de 25% del máximo (Carrera 2002).

La invertasa es producida de manera comercial principalmente por *Saccharomyces cerevisiae* y por cepas de hongos del género *Aspergillus* como lo son *A. niger*, *A. oryzae* y *A. ficcum*. En estos hongos la invertasa puede ser intra y extracelular. En *A. niger* se ha observado la presencia de múltiples isoformas de esta enzima y aproximadamente del 40-60% de ésta es intracelular (Vargas cols. 2004).

Andres y Perberdy (1974) encontraron que la invertasa de *A. nidulans* fue localizada en el medio de cultivo y en la fracción de micelio lavado. La glucosa presenta un papel importante en la represión catabólica para la producción de invertasa en este hongo, siendo el micelio crecido en presencia de glucosa presentó represión catabólica y produjo seis veces menos invertasa que el micelio crecido en sacarosa, altas concentraciones de glucosa produjeron una disminución en el tiempo de producción de la invertasa, pero al disminuir la cantidad de glucosa en el medio de cultivo se inició la producción de invertasa.

Boddy y cols. (1993) reportaron una invertasa de peso molecular de 115 kDa, al parecer el 50% de la masa molecular está formada por carbohidratos. La actividad óptima de la invertasa se lleva a cabo a un pH de 5.5 y 50°C.

Vainstein y Peberdy (1990) encontraron que el 50% de la invertasa producida por *A. nidulans* en FSm parece estar localizada en el espacio periplasmático en lugar de estar asociada a la pared celular.

La estabilidad térmica de la invertasa, libre e inmovilizada se determinó por medición de la actividad residual de la enzima expuesta a tres diferentes temperaturas (50, 55 y 60 °C) en buffer de acetatos (0,1 M, pH 4,5) por 160 min. Después de cada 20 minutos, una muestra se tomó y se determinó la actividad enzimática. La inactivación de las constantes de velocidad, k , y la vida media, $t_{1/2}$, (Bailey y cols. 1986; Bayramolu y cols. 2003).

Paiva y cols. (2009) reportaron a la actividad extracelular de invertasa en *A. caespitosus* en FS sobre salvado de trigo fue 5.5 veces más alta que la obtenida en FSm utilizando la misma fuente de carbono. Por otra parte, la producción de enzimas con salvado de trigo más harina de avena presento 2.2 veces más actividad de las aisladas de salvado de trigo. La producción enzimática se ve afectada por suplementos con fuente de nitrógeno y fosfatos. La adición de glucosa en la FSm y el FS disminuyo la actividad extracelular, pero la intracelular obtenida en FSm se incrementó 3-5 veces. La invertasa producida en FS presentó una temperatura óptima de 50°C mientras que la actividad extra- e intracelular de las enzimas producidas por FSm su actividad fue a 60°C.

Montiel-González y col. (2002) compararon mutantes haploides de *A. niger*, previamente caracterizadas como sobre productoras de enzimas y diploides de *A. niger* formadas a partir de las mutantes haploides, de esta manera encontraron una mayor producción de invertasa en FS en comparación con el método convencional de FSm.

Algunas cepas de *Pleurotus*, uno de los cinco hongos comestibles más importantes en el mundo han sido cultivados en líquido de una manera más rápida y controlada que en FS. El cultivo de *P. ostreatus* en sistema sumergido ha sido utilizado en la degradación de compuestos orgánicos como los hidrocarburos policíclico aromáticos aunque, poco se conoce de sus características de crecimiento bajo estas condiciones. El cultivo sumergido de los hongos de pudrición blanca como *P. ostreatus* permite producir al mismo tiempo enzimas ligninolíticas importantes. Al variar las condiciones de cultivo se puede mejorar el rendimiento, optimizar la calidad y reducir costos del proceso de fermentación. Por otro lado, parece ser que la producción de enzimas y el crecimiento del hongo están relacionados, debido a esto se realizó el presente estudio para optimizar la técnica de producción de inóculo en el cultivo de *P. ostreatus* y al mismo tiempo evaluar la producción de algunas enzimas en su crecimiento (Guillén-Navarro 1998).

Rashad y cols. (2009) analizaron la actividad de diferentes enzimas en el cuerpo fructífero de *P. ostreatus* crecido sobre desechos de limón y papaya. Reportaron que el sustrato afectó la actividad enzimática, presentó mayor actividad de

amilasas, sin embargo no hubo diferencias significativas entre celulasas e invertasas.

4. JUSTIFICACION

Pleurotus ostreatus es un hongo de pudrición blanca que ha demostrado elevada productividad de enzimas lacasas, celulasas y xilanasas entre otras; sin embargo, hasta el momento las invertasas no han sido evaluadas en este basidiomiceto, aun tomando en cuenta que son enzimas ampliamente utilizadas en la industria de los alimentos, la farmacéutica y como modelo para describir formas de excreción proteica. Dado que las enzimas hidrolíticas están asociadas a la obtención de fuente de carbono y que en muchos hongos las invertasas son enzimas constitutivas, en este trabajo se evaluara la actividad de invertasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida y sumergida esperando tener actividades semejantes o superables a las reportadas para otros microorganismos.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué capacidad de producción de Invertasas presenta *Pleurotus ostreatus* desarrollado en FSm y FS sobre PUF?

6. OBJETIVOS

6.1 General

Evaluar la actividad de invertasa de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en FSm y FS sobre PUF.

6.2 Específicos

1. Caracterizar FS usando PUF como soporte inerte, y la FSm, para producir invertasas de *Pleurotus ostreatus* utilizando sacarosa como fuente de carbono.
2. Evaluar la actividad de invertasa de *Pleurotus ostreatus* desarrollado en FSm y FS sobre PUF.
3. Identificar el número de isoenzimas de invertasa través de zimogramas.

7. METODOLOGÍA

7.1 Microorganismo de estudio y obtención del inóculo

Se utilizó a la cepa de *Pleurotus ostreatus* (ATCC-32783). El inóculo para fermentación sumergida y sólida sobre soporte inerte fue de aproximadamente 4 mm de diámetro, tomado de la periferia de la colonia mediante un horador, y se colocaron tres fragmentos como inóculo a cada uno de los matraces para la fermentación.

7.2 Medio de cultivo y desarrollo micelial

Para la FSm se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL, con 50 mL de medio de cultivo (Tabla 2) cada uno, mientras tanto la FS también contuvo 0.5 g de cubos de espuma de poliuretano (PUF) de baja densidad (17 kg/m³) cortada en cubos de 0.5 cm por lado impregnados con 15 mL del medio de cultivo antes mencionado. Los cubos de PUF se lavaron dos veces con agua caliente y una con agua templada, para esta fermentación se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL, ambas fermentaciones se llevaron a cabo a 25 °C durante 25 días. Todas las operaciones se llevarán a cabo en condiciones estériles. Tomando muestras cada 36 horas a partir del tercer día para realizar los análisis.

Tabla 2. Composición basal del medio de fermentación sólida

Componente	Concentración en g/L
Extracto de levadura	5
Sacarosa	10
K ₂ HPO ₄	0.4
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.001
KH ₂ PO ₄	0.6
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.05
MnSO ₄ H ₂ O	0.05
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5
CuSO ₄ 5H ₂ O *	0.25

Nota: El pH se ajustó a un valor de 6.5, con NaOH 0.1 M.

7.3 Obtención del extracto crudo enzimático y determinación de biomasa

El extracto crudo enzimático (ECE) se obtuvo en FS sobre PUF por un prensado ligero de la PUF y con un ayuda de una bomba de vacío, en la FSm se obtendrá por filtración y separación de la biomasa, en todos los casos se obtendrá el ECE se determinara el pH al término de la extracción, La biomasa se obtendrá en la FS y FSm por diferencia de peso seco.

7.4 Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* y de producción de invertasa

Para la FSm y FS sobre PUF, el desarrollo de biomasa en función del tiempo $X = f(t)$ se ajustara con la ecuación logística (1) por la minimización del error cuadrático, utilizando la herramienta Solver de la hoja electrónica de Excel (Microsoft) (Díaz-Godínez y cols. 2001).

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

(1)

La solución de la ecuación logística se muestra a continuación (2):

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + C e^{-\mu t}}$$

(2)

Donde

μ = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

X_{\max} = Valor de biomasa máxima o de equilibrio (g/L).

X_0 = Valor de biomasa inicial (g/L).

C = valor que presenta la relación entre la diferencia de X_{\max} y X_0 :

$$C = \frac{X_{\max} - X_0}{X_0}$$

Se calcularon además los siguientes parámetros:

$Y_{X/S}$ = rendimiento teórico de la biomasa producida con respecto al consumo de sustrato.

$Y_{E/X}$ = rendimiento teórico de la actividad de invertasa con respecto a la biomasa producida, estimada como la relación de la máxima actividad (E_{max})(U/L) y X_{max} (g/L).

$Y_{E/S}$ = rendimiento teórico de la actividad de invertasa con respecto al consumo de sustrato, estimada como la relación de la E_{max} (U/L) y azúcar inicial (g/L).

P = Productividad en el pico máximo de actividad, dada por la siguiente expresión:

$$P = \mu * X_{max} * Y_{E/X}$$

q_p = Tasa específica de la formación de la enzima, $q_p = \mu * Y_{E/X}$

q_s = Tasa específica de consumo de sustrato, $q_s = \mu / Y_{X/S}$

7.5 Determinación de pH

Se determinó el pH del ECE de cada día de muestreo durante la fermentación, en el que se utilizó un potenciómetro.

7.7 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de invertasa se determinó por medio de la liberación de azúcares reductores por el método de DNS (Miller, 1959). Las condiciones de ensayo fueron 950 μ L de sustrato (0.1 M de sacarosa en buffer de acetatos 0.1 M, pH 5.5) y 50 μ L de ECE, se incubó por 30 min a 50 °C sólo para las muestras de FS, en el caso de la FSm se usaron 100 μ L de ECE y 900 de μ L de sustrato y se incubo por 120

min a 50 °C. Una Unidad Internacional (UI) de actividad se define como la cantidad de enzima que se requiere para liberar 1 μ mol de azúcares reductores por minuto.

7.8 Zimografía

La actividad de invertasas se detectará *in situ*, basados en la técnica modificada de Leammli 1970 usando dodecil sulfato de sodio en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). El gel de separación contuvo 14%, 8% de acrilamida, 2.7% de *bis*-acrilamida. El gel de empaquetamiento 4% de acrilamida y 2.7% de *bis*-acrilamida. Se usaran geles de 0.75 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini-Protean III (BioRad) a 25 mA por 2-3 h. Al final de la corrida, los geles se lavarán con agua desionizada y se incubaron a 50°C en una solución de 0.1 M de sacarosa en buffer de acetatos, para el revelado se tiñeron los geles con fucsina básica al 1% en 0.5 M NaOH (Cairns y Ashton 1991), la formación de una banda de color rosa es indicativo de actividad de invertasa, para evidenciar la actividad invertasa. De la misma manera los geles fueron tratados con buffer de acetatos a pH 4.7, humedecido con sacarosa a 0.2 M durante 10 min, para su revelado se usó cloruro de trifetil tetrazolio TTC (Gabriel y Wang, 1969).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Fermentación sólida

8.1.1 Biomasa producida

El desarrollo de *P. ostreatus* en fermentación sólida sobre espuma de poliuretano, se observó durante los 23 días de fermentación, encontrando las tres fases de crecimiento microbiano, la fase adaptativa se encuentra hasta antes de 100 h mientras la fase exponencial se desarrolló durante 330 h. Aunque no se nota una prolongada fase estacionaria si se puede observar durante el resto de la fermentación como se muestra en la figura 3. La curva de crecimiento se ajustó con la ecuación logística, reportando una X_{\max} de 4.15 g/L y con una μ de 0.01 h^{-1} .

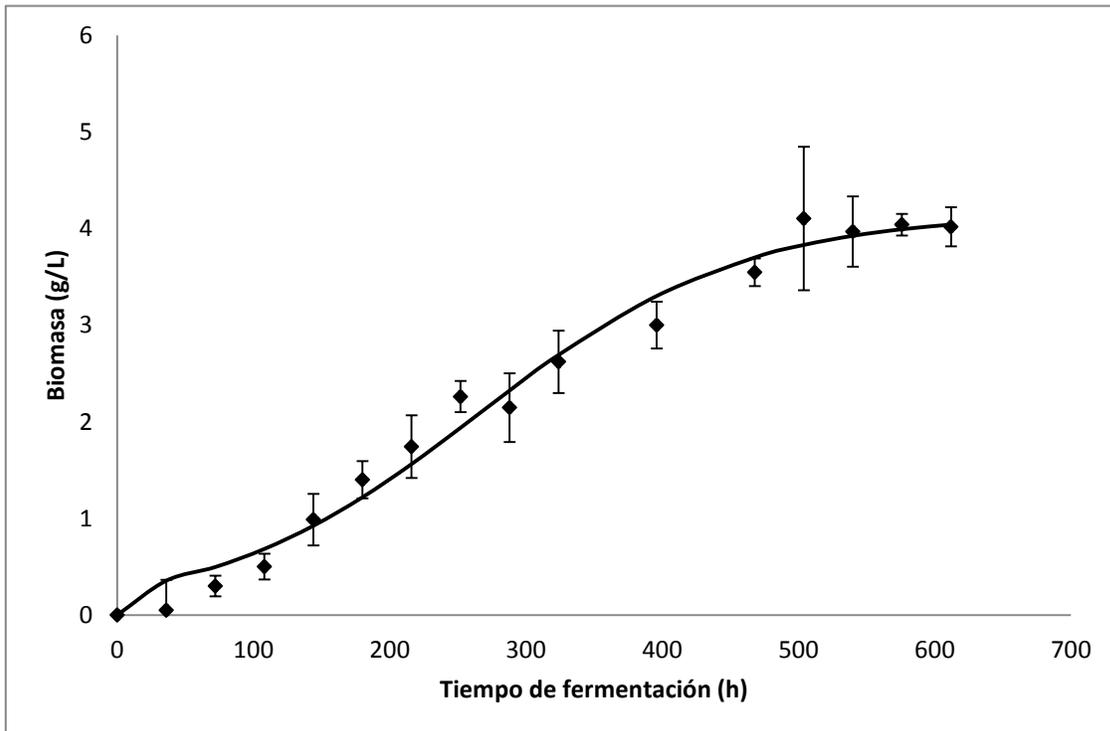


Figura 3. Curva de crecimiento de *P. ostreatus* en FS.

La biomasa producida por *P. ostreatus* durante las 612 h en FS con sacarosa como fuente de carbono fue de 4.15 g/L y una μ de 0.01 h^{-1} , el valor de la biomasa es cercano a lo publicado por Téllez-Téllez (2008) obteniendo 4.5 g de X_{\max} mientras que la μ es de 0.033 h^{-1} y Montalvo-Galicia (2013) creció a diferentes temperaturas 15, 20 y 30 °C, reportó biomasa de 4.61 g/L (μ de 0.018 h^{-1}), 4.31 g/L (μ de 0.035 h^{-1}) y 4 g/L (μ de 0.034 h^{-1}), respectivamente, ambos trabajos se llevaron a cabo en FS utilizando PUF y glucosa. General en ambo trabajos hubo mayor producción de biomasa y de μ . Sin embargo Álvarez-Canales (2013) utilizó glucosa-pectina y pectina como fuente de carbono para las FS, reportó una X_{\max} de 9.49 g/L (μ de 0.045 h^{-1}) en presencia de glucosa-pectina y 3.84 g/L (μ de 0.02 h^{-1}) con pectina. Por lo que se observa claramente que en presencia de glucosa hay mayor producción de biomasa.

8.1.3 Evaluación de la actividad de Invertasa

La actividad máxima de invertasa se puede observar a las 252 h de la fermentación obteniendo 188.1U/L, antes y después de ese punto los valores estuvieron entre 48 y 38 U/L aproximadamente. Cabe mencionar que a las 504h se puede observar valores cercanos de actividad de 93.89 U/L el cual se encuentra en inicio de la fase estacionaria de *P. ostreatus* como se observa en la figura 4.

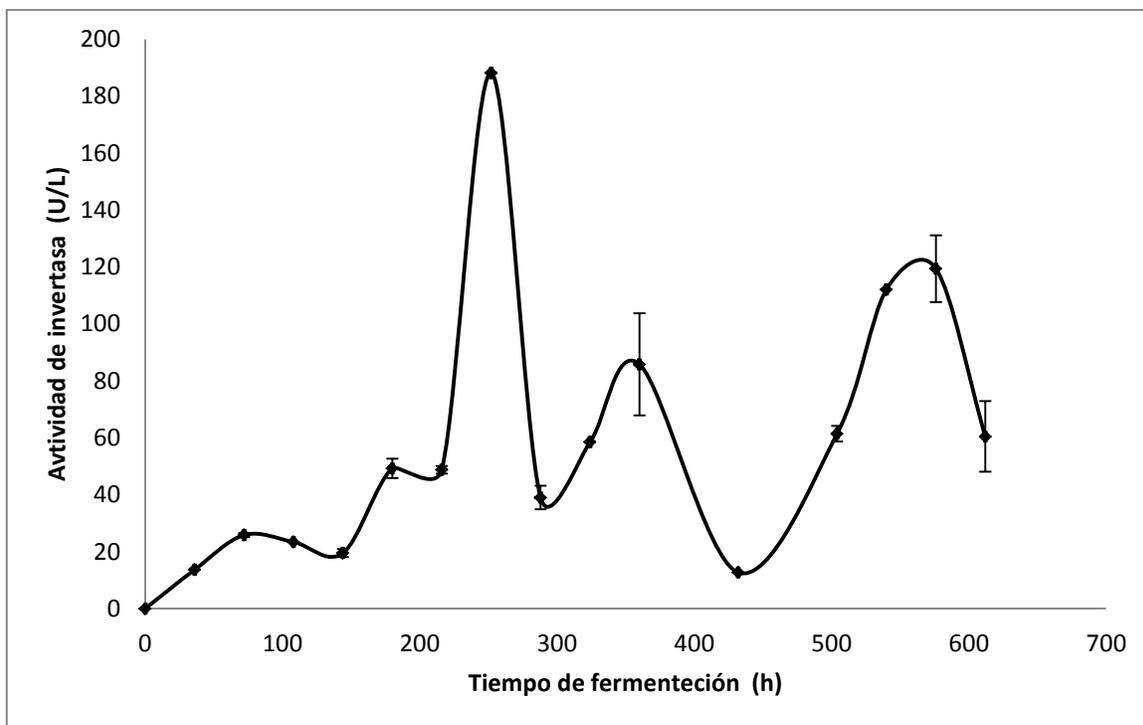


Figura 4. Actividad de invertasa de *P. ostreatus* en FS.

Los resultados en esta fermentación se obtienen 54 U/g, estos resultados están de acuerdo con Ashokkumar y cols. (2001) quien demuestra de que la productividad de la invertasa extracelular de *A. niger* por la FS fue mayor después de la optimización del medio, comparada a la obtenida por Mamma y cols. (2008), quienes encontraron que la actividad de la invertasa más alta producida por *A. niger* cultivado en cáscara de naranja seca fue 72.5 U/g a pH inicial de 5 y 90% de contenido de humedad, mientras que la actividad más alta que fue producida por *N. crassa* era 74.0 U/g bajo las mismas condiciones de cultivo. Romero-Gómez (2001) en la FS trabaja a diferentes concentraciones de sacarosa con 6.25 g/L produjeron 220 U/L de invertasa, con 12.5 g/L de sacarosa la producción máxima

de invertasa se alcanzó con 713 U/L, en los cultivos con 25 g/L de sacarosa la invertasa llegó hasta 2128 U/L, con 50 g/L de sacarosa se alcanzaron las 3460 U/L, al añadir 100 g/L de sacarosa inicial al cultivo se obtuvieron 4650 U/L de invertasa. Por lo que se podría optimizar las condiciones de cultivo para lograr mayor producción, ya que este trabajo solo se trabajó con una concentración de glucosa.

8.1.4 Perfil de pH durante la fermentación

Se muestra el perfil de pH durante la fermentación sin mostrar un cambio importante a lo largo de la fermentación, partiendo de un pH inicial de 6.5, se observa un aumento máximo de 6.75 y la mínima de 5.6, obteniéndose el promedio de pH durante la fermentación de 6.18 como se observa en la figura 5.

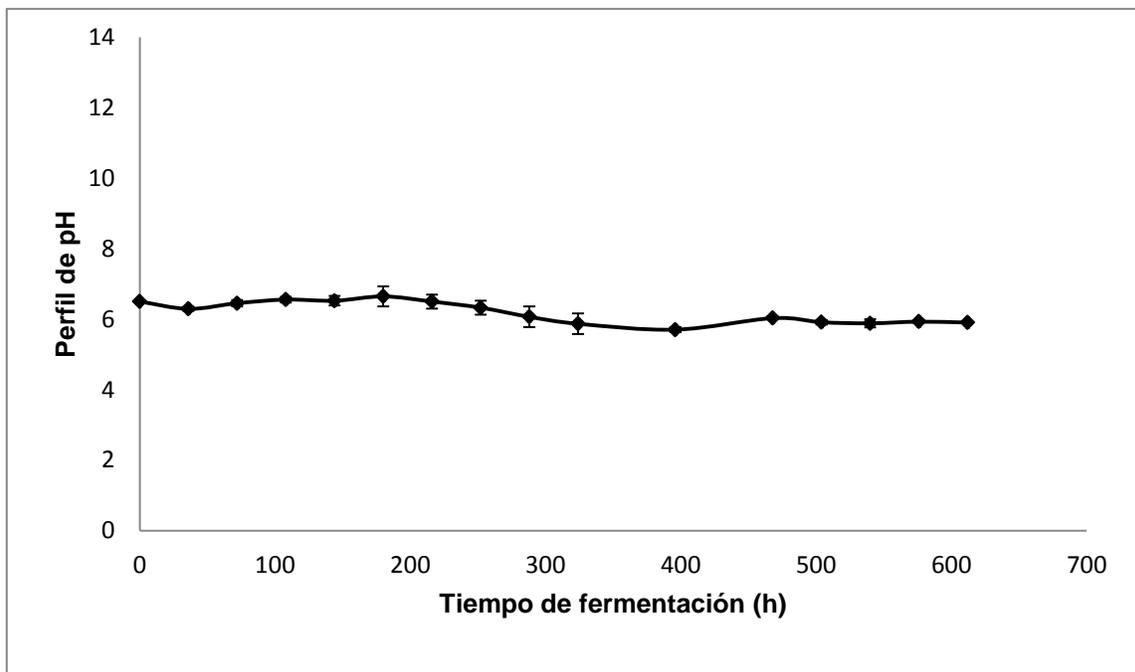


Figura 5. Perfil de pH a lo largo de la fermentación sólida *P. ostreatus*.

El comportamiento del pH durante la fermentación refleja no haber cambios como se ven en los trabajos anteriores a este trabajo en el mismo laboratorio donde se ha utilizado, glucosa-pectina, pectina, xilano, celulosa y glucosa a diferentes temperaturas como fuente de carbono, por mencionar algunos en estos trabajos no encuentran cambios durante las 600 horas de fermentación.

8.1.5 Isoenzimas de invertasa

En FS *P. ostreatus*, presentó dos de isoformas de invertasa durante toda la fermentación una de alto peso molecular y otra de bajo peso. La tinción fue hecha con fucsina básica al 0.1%. Se observan dos bandas una de bajo peso molecular ya que se encuentra en la zona del gel al 8% y se puede observar otra en la parte del gel de 14% de esta manera dicha enzima se reconoce como de alto peso molecular, figura 6A, donde se observan las primeras horas de fermentación, y 6B, donde se observan las últimas horas.

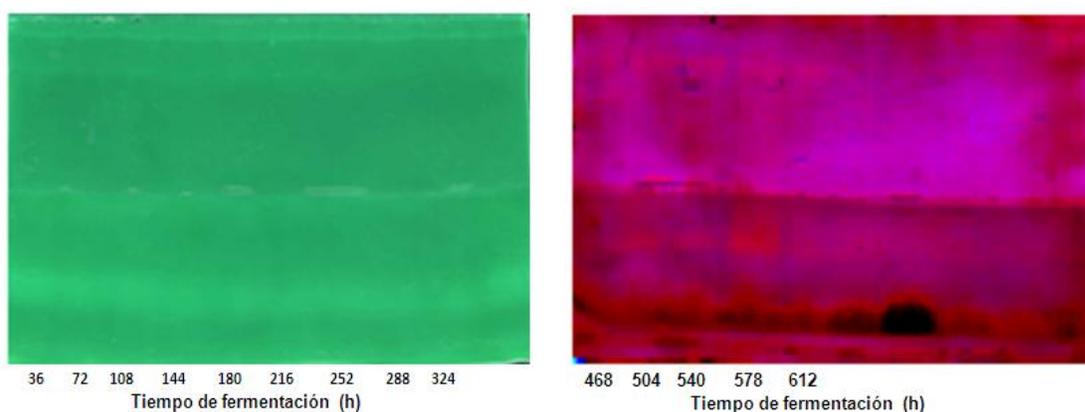


Figura 6. Zimograma con un gel de gradiente de diferentes tiempos de fermentación.

En la figura 7 se muestra el zimograma teñidos con cloruro de trifeníl tetrazolio, se observan dos bandas en la zona donde el gel de acrilamida se encuentra al 14% presentes durante la mayor parte de la fermentación, a los últimos días en la parte inferior también se alcanza a notar una tercera banda. Sin embargo las bandas aún no se notan muy definidas por lo que se seguirá trabajando para optimizar las condiciones de revelado.

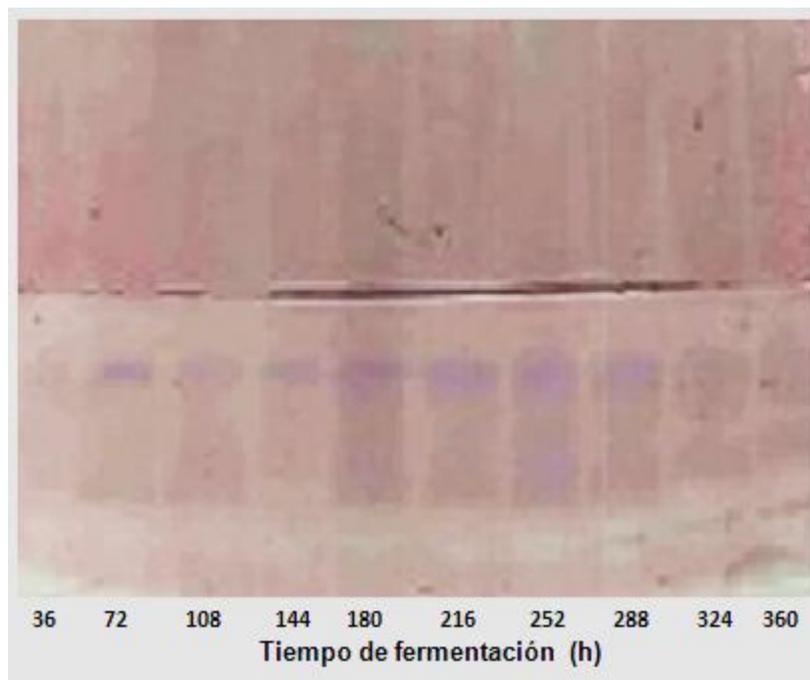


Figura 7. Gel de gradiente de poliacrilamida de muestras de 36 a 360 h de FS teñidos con cloruro de trifeníl tetrazolio.

8.2 Fermentación sumergida

8.2.1 Biomasa producida

El desarrollo de *P. ostreatus* en fermentación sumergida, se observó durante los 23 días de fermentación claramente las tres fases de crecimiento del organismo, la fase de adaptación hasta antes de 100 h. La fase exponencial duró durante 180 h. Se observó una prolongada fase estacionaria el resto de la fermentación con una duración aproximada de 330 h. Reportando una X_{\max} de 1.494 g/L y con una μ de 0.02 h^{-1} como se observa en la figura 8.

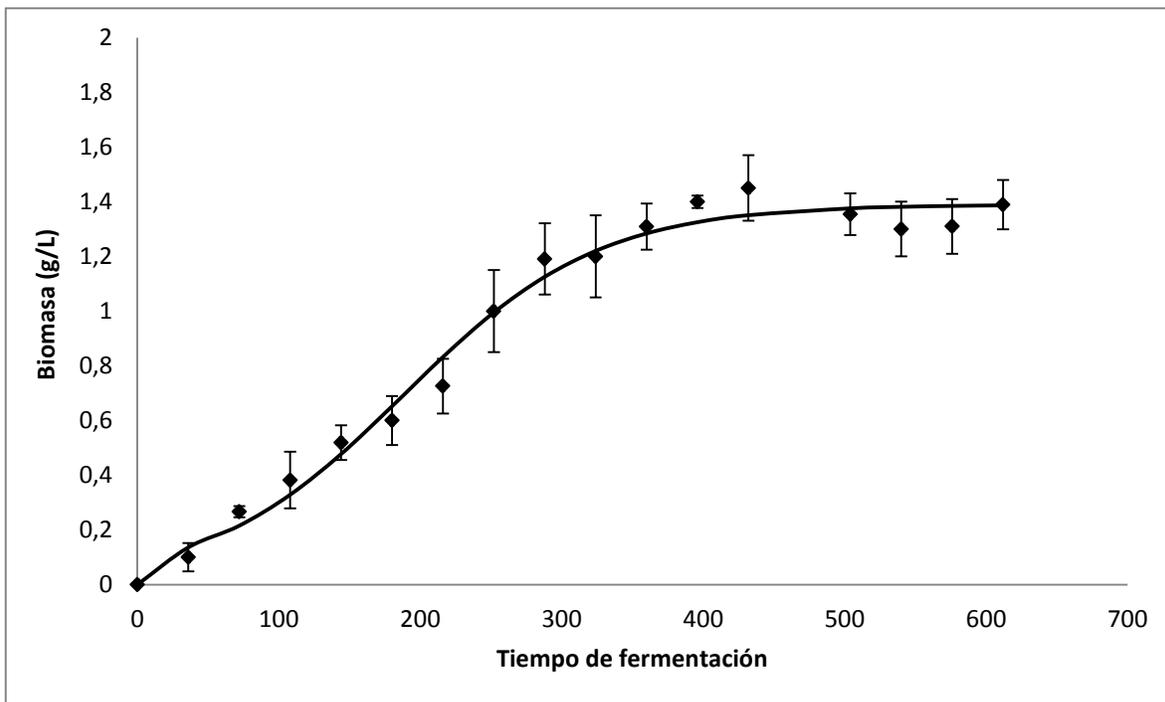


Figura 8. Curva de crecimiento de *P. ostreatus*. En FSm.

La biomasa producida por *P. ostreatus* con sacarosa como fuente de carbono fue de 1.45 g/L a las 432 h y una μ de 0.02 h^{-1} , el valor de la biomasa es baja

comparada con lo publicado por Tellez-Tellez (2008) obteniendo una X_{max} de 5.5 g/L siendo casi cuatro veces más a lo encontrado en este trabajo mientras que la μ es de 0.022 h^{-1} en fermentación sumergida, la velocidad específica es el doble, usando glucosa como única fuente de carbono a utilizar sacarosa, utilizando las mismas características de cultivo, Tlecuítl-Beristain (2008) produce una X_{max} de 7.8 g/l con una μ de 0.02 h^{-1} , también Díaz (2011) reporta bajo dos condiciones de fuente de nitrógeno una con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.3 g/L y la otra extracto de levadura 5.0 g/L, encuentra una X_{max} de 5.16 g/L y una μ de 0.025 h^{-1} , para la fermentación con la primera fuente de nitrógeno y en la segunda fuente de nitrógeno X_{max} de 4.62 g/L y una μ de 0.018 h^{-1} , en estas fermentaciones con diferente fuente de nitrógeno se observa una mayor producción de biomasa así también un incremento en el valor de μ otros trabajos de Díaz y cols. (2013) donde evalúa la influencia del pH inicial en el medio siendo ellos de 3.4, 4.5, 6.5 y 8.5, los valores de X_{max} fueron de 5.2, 5.5, 9.6 y 8.3 g/L, y los valores μ fueron de 0,006, 0,014, 0,018 y 0.02 h^{-1} respectivamente para los casos de la μ todas son cercanas a 0.002 h^{-1} . Por otra parte Álvarez-Canales (2013) reportó una X_{max} de 3.43 g/L y 4.12 g/L, y una μ de 0.025 h^{-1} y 0.059 h^{-1} , usando glucosa-pectina y pectina como fuente de carbono respectivamente. Se observa claramente que en las FSm hay una mayor producción de biomasa comparadas con la FS, el mismo fenómeno se observó al utilizar otra fuente de carbono ya sea sola o combinada con glucosa, que son fuente de carbono de no tan fácil asimilación afecta la producción de biomasa en *P. ostreatus*, sin embargo la velocidad específica de crecimiento se encuentra alrededor de 0.02 h^{-1} como se ha reportado para la mayoría de los trabajos reportados para *P. ostreatus*.

8.2.2 Evaluación de la actividad de Invertasa

La actividad de invertasa se determinó para cada uno de los ECE, utilizando sacarosa 0.1 M en buffer de acetatos 4.5 como sustrato. La actividad máxima de invertasa se puede observar a las 252 h de la fermentación obteniendo 25.58 U/L, antes y después de ese punto los valores estuvieron entre 14.29 y 14.13 U/L aproximadamente. Cabe mencionar que después de las 350 h se puede observar un aumento de actividad cercanos a las 20 U/L el cual se encuentra en la fase estacionaria del crecimiento *P. ostreatus* como se observa en la figura 9.

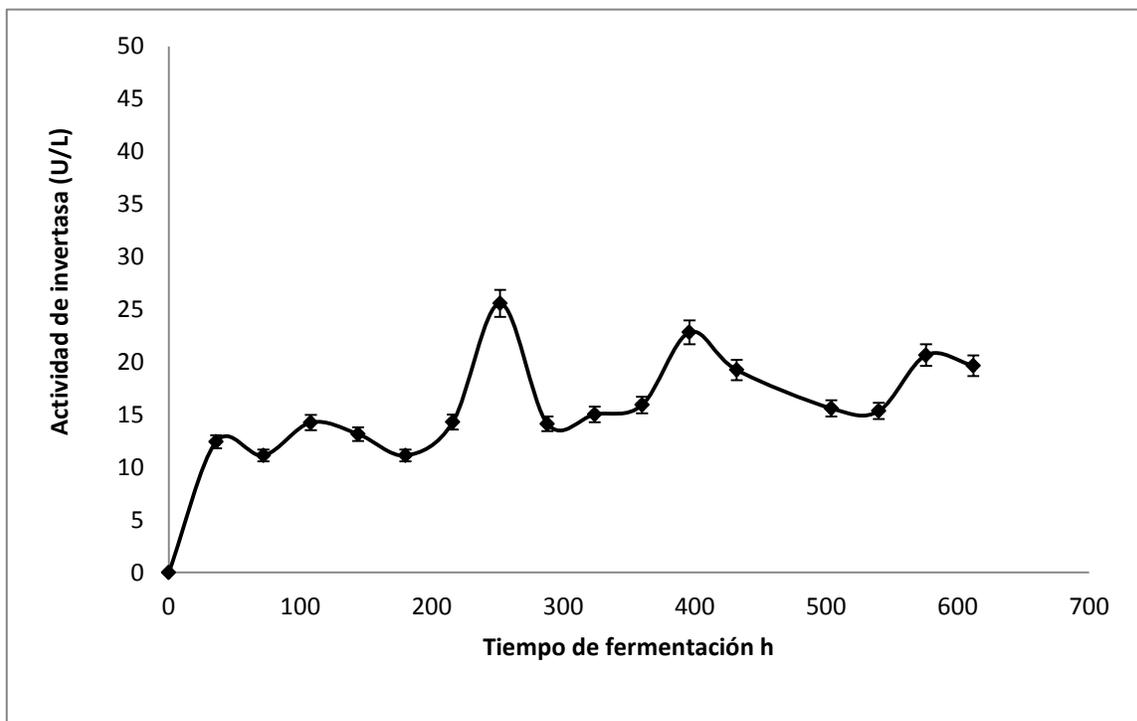


Figura 9. Actividad de invertasa de *P. ostreatus*.

8.2.3 Perfil de pH durante la fermentación

Se muestra el perfil del pH durante la fermentación, partiendo de un pH inicial de 6,5. La cual durante los primeros días de la fermentación disminuyo hasta llegar a 6.2 observada a las 96 h de fermentación. Posteriormente hay aumento alcanzando una máxima de 8.22 al final de la fermentación, teniendo un promedio de pH 7.37. Como se observa en la figura 10.

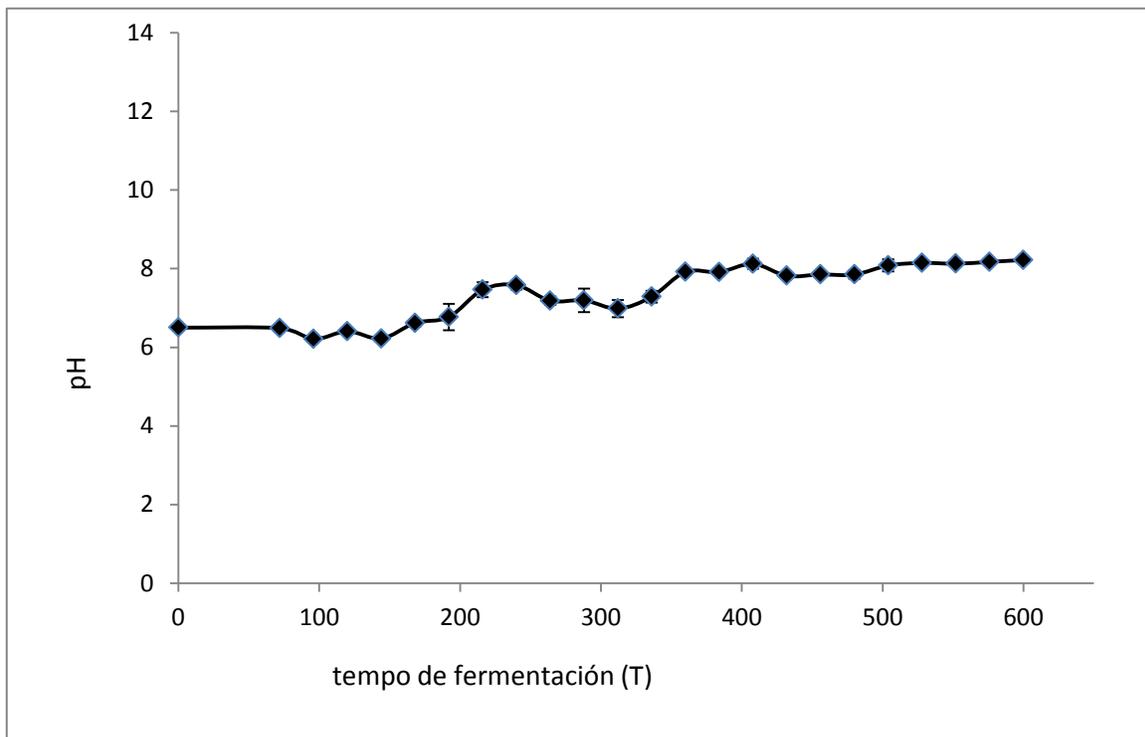


Figura 10. Comportamiento de pH a lo largo de la fermentación sólida *P. ostreatus*.

8.2.4 Isoformas de invertasa

Para la FSm las muestras no contienen una concentración considerable de enzima para evidenciar la actividad de una manera más precisa en los geles, aunque se llega a observar hasta dos bandas de isoformas diferentes presumiblemente con un peso molecular elevado figura 11.

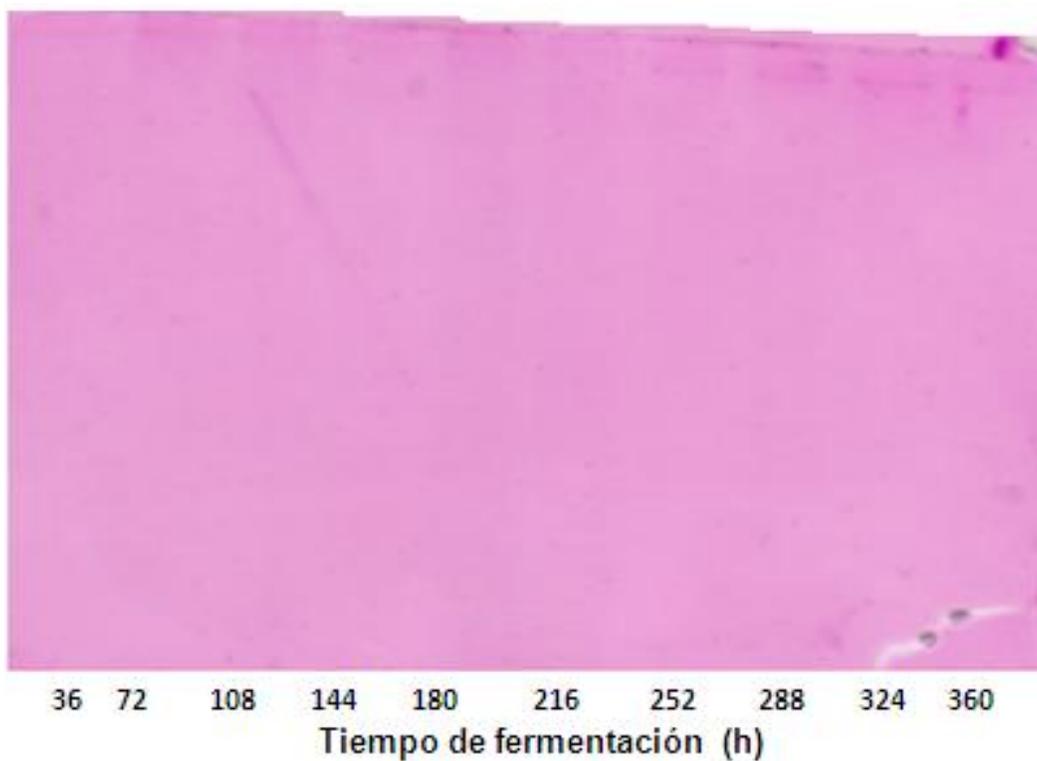


Figura 11. Zimogramas de invertasa producido de *P. ostreatus* de FSm.

8.2.5 Evaluación de los parámetros cinéticos

En la Tabla 3, se pueden observar los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de invertasa de *P. ostreatus*, el $Y_{X/S}$ fue de 0.3, por lo tanto se puede considerar que la producción de biomasa fue eficiente, posiblemente al hidrolizar la sacarosa los azúcares producidos sean asimilados para procesos metabólicos y de mantenimiento biológico. Dado que la actividad de invertasa alcanzó 139 UL^{-1} , los parámetros de rendimiento de la enzima son prácticamente bajos una μ por abajo con respecto a las observadas por este mismo hongo desarrollado en otros trabajos.

Tabla 3. Parámetros cinéticos del crecimiento y producción de invertasa de *P. ostreatus* en fermentación sólida y fermentación sumergida.

	Biomasa	Actividad	sust. Inicial	μ	YE/X	YX/S	YE/S	P	qp	qs
	gL^{-1}	UL^{-1}	g	h^{-1}	Ug^{-1}x	gx/gS	Ug^{-1}s	$\text{UL}^{-1}\text{h}^{-1}$	$\text{Uh}^{-1}\text{gx}^{-1}$	$\text{gsgx}^{-1}\text{h}^{-1}$
FS	4.151	188.1	10	0.01	45.31	0.415	18.8	1.88	0.453	0.024
FSm	1.494	25.58	10	0.02	17.12	0.149	2.56	0.512	0.342	0.134

En los parámetros hay un mayor rendimiento en las fermentación sólida siendo hasta dos veces o más la diferencia que existe con la sumergida, para el caso de este trabajo en particular la FS tiende a mostrar mejores características para los rendimientos estas diferencias en los valores de FS contra FSm han sido

reportadas antes por diversos trabajos en el laboratorio donde se obtiene un mayor rendimiento de biomasa así como de producción enzimática por *P. ostreatus* cuando su fuente de carbono es diferente a sacarosa, siendo en esta fuente de carbono una tendencia contraria.

Los valores fueron de 1.88 U/L gx, 0.45 U/h gx y 0.024 gsgx⁻¹ h⁻¹ para las tasa específica de consumo de sustrato, de producto y la productividad respectivamente en la fermentación sólida en el caso de la fermentación sumergida fueron los siguientes 0.35 U/L gx, 0.25 Uh⁻¹ gx y 0.10 gsgx h para las tasa específica de consumo de sustrato, de producto y la productividad respectivamente. Para la tasas específica de sustrato con respecto a la biomas nuevamente se ve una evidente diferencia en los valores de productividad comparada en FS contra FSm han sido reportadas antes por diversos grupos. Acuña-Argüelles y cols. (1995) reportan que la FS resultó ser entre 6 y 51 veces más productiva que la FSm dependiendo del tipo de enzima medida. Lekha y Lonsane. (1994) reportaron la actividad de tanasa fue 5 veces mayor en FS que en FSm, siendo los anteriores resultados coherente a lo observado por el trabajo ya que obtuvimos una mayor actividad en la FS que en la FSm.

9. CONCLUSIONES

- FS presentó mayor actividad, en comparación con la FSm.
- Se observó mayor producción de biomasa en FS con respecto a la FSm.
- Se observaron 2 isoenzimas en la FS siendo una de alto peso molecular y otra de bajo peso, así como en la FSm 2 isoenzimas de alto peso molecular.

10. PERSPECTIVAS

- Estandarización de medio de cultivo para la producción de invertasa de *P. ostreatus*.
- Optimizar las condiciones de zimografía.
- Evaluar la influencia de la actividad de agua (A_w), pH y temperatura en la actividad de invertasa.
- Generar mutantes de *P. ostreatus* con características productoras de enzimas hidrolíticas.

11. REFERENCIAS

- ❖ Acuña-Argüelles M.E., Gutiérrez-Rojas M., Viniegra-González G. y Favela-Torres F. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation *Applied Microbiology and Biotechnology*. Volume 43, pp 808-814
- ❖ Aguilar-Doroteo L. (2007). Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus spp.* TesisUPIBI-IPN.
- ❖ Andres I. y Peberdy J.F. (1974). The production of invertase in *Aspergillus nidulans* with reference to the effects of glucose and sucrose. *Microbios* 10(37):15-23.
- ❖ Arana C., Robledo A., Loera O., Contreras-Esquivel JC., Rodríguez R. y Aguilar C.N. (2006). Fungal invertase expression in solid-state fermentation. *Food Technology Biotechnology* 44: 229-233.
- ❖ Archer D.B. y Peberdy J.F. (1997). The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Critical Reviews in Biotechnology* 17: 273-306.
- ❖ Ashokkumar B., Kayalvizhi N. y Gunasekaran. (2001). Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid stated fermentation. *Process Biochemistry* 37: 331-338.
- ❖ Auria R., Hernandez, S., Raimbault, M. y Revah, S. (1990) Ion exchange resin: a model for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnology Techniques* 4: 391-396.

- ❖ Bailey J.E. y Ollis D.F. 1986. *Biochemical engineering fundamentals. 2nd edn.* United States of America: McGraw-Hill Book Company.
- ❖ Bayramolu G., Akgol S., Bulut A., Denizli A. and Yakup A.M. 2003. Covalent immobilization of invertase on to a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. *Biochemical Engineering Journal*, 14: 117-126.
- ❖ Boddy L.M., Bergés T., Barreau C., Vainstein M.H., Dobson M.J. Balance D.J. y Peberdy J.F. (1993). Purification and characterization of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence. *Current Genetics* 24: 60-66.
- ❖ Brock T.D., Smith D.W. y Madigan M.T. (1987). *Microbiología. 4a. ed. Ed.* Prentice Hall Hispanoamericana. México. 118-123.
- ❖ Bryan W. y Wilson K. (1976). Electrophoretic techniques. En Principales and technique of practical biochemistry. Eduard Arnold (ed). John Wiley y Sons, Inc. New York, USA. pp 98-118
- ❖ Cairns A.J. and Ashton J.E. (1991) The interpretation of *in vivo* measurements of fructosyl transferase activity: an analysis of patterns of fructosyl transfer by fungal invertase. *New Phytology* 118: 23-34.
- ❖ Carrera J. (2002). Módulos de Biotecnología, “Enzimas Industriales, Biorreactores, Variables de Control, Guías de Laboratorio y Biotecnología

Agrícola y Vegetal” Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca.

- ❖ Carrera J. (2002). Módulos de Biotecnología, “Enzimas Industriales, Biorreactores, Variables de Control, Guías de Laboratorio y Biotecnología Agrícola y Vegetal” Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca.
- ❖ Catalina-Bermúdez R., Morris H. y Donoso C. (2003) Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. Florida. *Revista Cubana Investigación Biomedica* 22: 226-231.
- ❖ Chang S.T. y Miles P.G. (2004). Mushrooms Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental impact. *Second Edition. CRC Press Inc.*, United States. 451.
- ❖ Chaplin M.F (1986) Monosaccharides. En Chaplin MF, Kennedy JF (eds.): “Carbohydrate Analysis: A Practical Approach”. *IRL Press (Oxford, England)* 1-36.
- ❖ Christen P.; Auria R.; Villegas E. y Revah S. (1993). Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotechnology Advances*. 11: 549-557.
- ❖ Das N., Sengupta S. y Mukherjee M. (1997). Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Applied Environment Microbiology*; 63:4120-4122.

- ❖ Díaz R., Alonso S., Sánchez C., Tomasini A., Bibbins-Martínez M y Díaz-Godínez G. (2011). Characterization of the growth and laccase activity of strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *BioResources*. 6(1), 282-290.

- ❖ Díaz-Godínez G., Soriano J., Augur C. y Viniegra-González G. (2001). Exopectinases Produced by *Aspergillus niger* in Solid-State and Submerged Fermentation: A Comparative Study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26: 271-275.

- ❖ Doelle H. W., Mitchell D. A. y Rolz C. E. (1992). Solid Substrate Cultivation. *Elsevier Applied Science*, London, N. York, Chapter 3, 35.

- ❖ Durand A., Broise D. y Blachere H. (1988). Laboratory scale bioreactor for solid stated processes. *Journal of biotechnology* 8: 59-66.

- ❖ Fengel D. y Wegener G. (1989). Wood, Chemistry, Ultrastructure and Reactions. Berlin-New York: Walter de Gruyter.

- ❖ Fujishima T., Uchida K. y Yoshino H. (1972). Enzyme production by molds in sponge cultura. *journal of technology* 50: 724-730

- ❖ Fukushima Y., Okada K., Kawai G. y Motai H. (1991). Efficient production of mycelium of *Lentinusedodes* by a continuous culture. *Mushroom Science* 13: 721-725.

- ❖ Gabriel O. y Wang S.F. (1969). Determination of enzymatic activity in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 27, 545-554.

- ❖ Gaitán-Hernández R., Salmones D., Pérez Merlo R. y Mata G. (2006). Aislamiento, siembra y producción. Manual práctico de cultivo de setas. *Instituto de Ecología*
- ❖ Gayosso-Canales M. (2001). Caracterización de los componentes de un extracto de primordios de *Pleurotus ostreatus* que induce su purificación. Tesis. Universidad de Colima, México
- ❖ Guillén-Navarro G., Márquez-Rocha F. y Sánchez-Vázquez JE. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología*. 15: 302-306.
- ❖ Guzmán G. (2000). Genus *Pleurotus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity, Taxonomic Problems, and Cultural and traditional Medicinal Uses. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2: 95-123.
- ❖ Guzmán G. y Mata G. (1990). El cultivo de los hongos comestibles. México DF: *Instituto Politécnico Nacional*,:245.
- ❖ Hadar Y., Kerem Z., Gorodecki B. y Ardon O. (1992). Utilization of lignocellulosic waste by the edible mushroom, *Pleurotus*. *Biodegradation*. Volume 3, pp 189-205
- ❖ Harvey, LM. y McNeil, B. (1993). Liquid fermentation systems and product recovery of *Aspergillus*. In *Biotechnology Handbooks 7*, ed. J. E. Smith. Plenum Press, New York. Pp 141-176

- ❖ Hatakka A., Mohammad O. y Lundell T. (1989). The potential of white-rot fungi and their enzymes in the treatment of lignocellulosic feed. *Food Biotechnology* 3: 45-58.
- ❖ Henzler H.J. y Schedel M. (1991) Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbial cultures. *Bioprocess Engineering*. 7: 123-1 31.
- ❖ Herrera T. y Ulloa M. (1998). El reino de los hongos: micología básica y aplicada. *Fondo de cultura económica. México, D.F.*
- ❖ Herwing C., Doerries C., Marison I. y Von Stockar U. (2001). Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 76: 247-258.
- ❖ Hesseltine C.W. (1972). Biotechnology report: Solid state fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*. 14: 517:532.
- ❖ Hölker U., Höfer M., y Lenz J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (64): 175-186.
- ❖ Horton J.S., Palmer G.E. y Smith W.J. (1999) Regulation of dikaryon-expressed genes by FRT1 in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Fungal Genetics and biology* 26: 33-47.
- ❖ Hussain A., Rashid R., Perveen R. y Asraf M. (2009). Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from

sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 188-194.

- ❖ Kirk PM., Cannon D. y Stalpers JA. (2001) *Dictionary of the Fungi*. Ed. CABI publishing. New York. 655
- ❖ Kobayashi T., Ozawa S., Sato K., Nagamune T. y Endo I. (1991). Production of glucoamylase by solid-state fermentation using urethane foam carrier as a semi-solid medium. *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, (Japan). 17: 491-496.
- ❖ Krause A., Lance A. y Elrin M. (1983). Plastic analysis guide chemical and instrumental methods. Hanser Publishers. P1118-123
- ❖ Lehninger A.L. (1979). *Bioquímica. 2a ed. Omega*. Barcelona, España. 203-205.
- ❖ Lekha PK. y Lonsane BK. (1994). Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Process Biochemistry*. Volume 29. Pages 497–503
- ❖ Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wostawilewska M., Cho N. S., Hofrichterl M. y Rogalsk. (1999). Biodegradation of lignin white rot fungi. *Fungal genetics and biology* 27: 175-185.
- ❖ Lomonte B. (2009) *Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica*, 92 pp. Universidad de Costa Rica

- ❖ Mamma D., Kourtoglou E. y Christakopoulos P. (2008). Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*. Volume 99. Pages 2373–2383.
- ❖ Martínez-Carrera D., Morales P., Sobal M., Bomilla M. y Martínez M. (2006). México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción de los hongos comestibles. In: El cultivo de *Pleurotus* en México. *ECOSUR-COLPOS*, México, D. F.
- ❖ Mendivil-Salmón C., Sánchez A., Grijalva Ml. y Esqueda M. (2001). Composición química de *Pleurotus* cultivado sobre residuos vitivinícolas. *Revista Iberoamericana de Tecnología* 3: 207–214.
- ❖ Miller G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3): 426-428.
- ❖ Montiel-González M., Fernández F., Viniegra-González G. y Loera, O. (2002). Invertase production on solid-state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (102): 63-70.
- ❖ Moo-Young M., Moreira AR. y Tengerdy RP. (1983). Principles of the Solid Substrate Fermentation. In *Filamentous Fungi*. 4. Ed. J. E. Smith, D. R. Berry and B. Kristiansen, Edward Arnold, 117 – 144.
- ❖ Mudgett, R. E. (1986). Solid State Fermentation. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed: Demain. Mo Graw Hill, New York, Londres, Paris. 7: 66-83.

- ❖ Nguyen Q.D., Rezessy-Szabo J.M., Bhat M.K. y Hoschke A. (2005). Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. *Process Biochemistry* 40: 2461-2466.
- ❖ Oriol E. (1987). Croissanced' *Aspergillus niger* surmilieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l'eau. *Thèse Doctorat*(U.P.S.), Toulouse, Francia.
- ❖ Paiva AA., Teixeira MM., Terenzi H., Atílio JJ. y Souza GL. (2009). Production of the thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid stated fermentation using agroindustrial residues as carbon source. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 612-622.
- ❖ Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B. y Sannia G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 920-924.
- ❖ Pandey A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 27: 109-117.
- ❖ Pandey P., Selvakumar P., Soccol CR. y Nigan P. (1999) Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 27(1): 491-1 62
- ❖ Peñas M., Ásgeirsdóttir S. A., Lasa I., Culiañez-Maciá F. A., Pisabarro A. G., Wessels J. G. H. y Ramírez L. (1998). Identification, characterization and in situ detection of a fruti-body-specific hydrophobin of *Pleurotus ostreatus*. *Applien and Environmental Microbiology* 4028-4034.

- ❖ Pire D.V. (2001). (En Línea): las asombrosas setas. Mayo 15. Argentina.
<http://agronet.com.mx/cgi/articles.cgi?Action=Viewhistory&Article=4&Type=A&Datemin=2001-05-01%2000:00:00&Datemax=2001-05-31%2023:59:59>

- ❖ Rimbault M. (1980). Fermentation en Milieu Solide. Croissance des Champignons Filamenteux sur Sustrat Amilacé. *Tesis Doctoral*, U. Paul Sabatier, Francia.

- ❖ Rimbault, M. (1998) General and microbiological aspects of solid state fermentation. *Journal of Biotechnology*. www.ejb.org. Accesado el 28/Mar/2009.

- ❖ Rashad M.M., Abdou H.M., Mahmoud A.E. y Nooman M.U. (2009). Nutritional analysis and enzyme activities of *Pleurotus ostreatus* cultivated on *Citrus limonium* and *Carica papaya* wastes. *Australian Journal of Basic Applied Sciences* 3: 3352-3360.

- ❖ Righelato R.C. (1975) Growth kinetics of mycelial fungi. En Filamentous fungi Vol.1 (Industrial mycology). *Smith, J. E., Berry, D.* (Eds.) Edward Arnold, London.

- ❖ Romero J., Rodríguez M. y Pérez R. (2000) *Pleurotus ostreatus*. Importancia y tecnología de cultivo. Universidad de Cienfuegos “Carlos Rafael Rodríguez”. Cuatro caminos, Ciudad de Cienfuegos. 155 págs.

- ❖ Romero-Gómez S. (2001) Producción de Invertasa por *A. spergillus niger* en Fermentación Líquida y Fermentación Sólida. *Tesis UAMI*.

- ❖ Royse, D.J., Sánchez-Vázquez, J. E. (2001). La importancia del cultivo de *Pleurotus spp.* Estadísticas mundiales de producción, con énfasis en Hispanoamérica. In: La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Ecosur. *El Colegio de la Frontera Sur*, San Cristobal de Las Casas, Chiapas, México.

- ❖ Saunders J. y Frish K. (1964). Polyurethanes: *Chemistry and technology*. Vol. XVI part 1. John Wiley and Sons.

- ❖ Scriban R. (1985). Biotecnología. *Manual Moderno. México*. 98, 163, 168-170.

- ❖ Solomon R. (1975) Growth of *Aspergillus* in liquid fermentors. En Filamentous fungivol.1 (Industrial mycology). *Smith, J. E., Berry, D.* (Eds.) Edward Arnold, London.

- ❖ Sturm A. (1999). Invertases. Primary structure, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121: 1-7.

- ❖ Téllez-Téllez M., Fernández J.F., Montiel-González A.M., Sánchez C. y Díaz-Godínez G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 675-679.

- ❖ Tena-Aldave M. y Jorrín-novo J.V. (2007). Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería. *Prácticas generales de bioquímica y biología molecular*. 31

- ❖ Tlecuítl-Beristain S., Sánchez C., Loera O., Robson GD. y Díaz-Godínez G. (2008). Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: Production of a novel laccase isoform. *Mycological Research*. 112: 1080-1084.
- ❖ Uhlig H. (1998) *Industrial Enzymes and Their Applications*. New York:Wiley.
- ❖ Vainstein M.H. y Peberdy J.F. (1990). Solubilization of a cell wall invertase in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters* 71: 265-270.
- ❖ Valencia del Toro G. (2002). Estudio sobre la expresión de color de los esporóforos en *Pleurotus spp.* Por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas. *Tesis- Doctorado*. UNAM. México D.F.
- ❖ Vargas L., Pião A., Domingos R. y Carmona E. (2004). Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. (20):137-142.
- ❖ Vargas W. Cumino A. y Salerno L.S. (2003). Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol? *Planta* 216: 951-960.
- ❖ Viniegra-González G. (1997). Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, limitations and monitoring. Publ., Dordrecht, Chapter 2: pp. 5-22.

- ❖ Viniegra-González GP., Larralde-Corona M., García E., Favela-Torres E. y López-Isunza.F. (1993). Estudio de la fisiología del micelio por medio de análisis computarizado de imágenes. En Importancia de la fisiología microbiana en el desarrollo de procesos biotecnológicos, *V Congreso 2 Nacional de Biotecnología* 3. pp. S198-S207. México.
- ❖ Wessels J.G.H. (1999). Fungi in their own right. *Fungal Genetics and biology* 27: 134-145.
- ❖ Yegres S., Sánchez J., belmar M., Riveros W. y Belmar D. (2001). Producción de enzimas pécticas ensayos preliminares. Saber, Universidad de Oriente, *Venezuela.Vol.* 13. Nº 1:55-59.
- ❖ Yoshikawa J., Amachi S., Shinoyama H. y Fujii T. (2006). Multiple β -fructoduranosidasas by *Aureobasidium pullulans* DSM 2404 and their roles in the fructooligosaccharide production. *FEMS Microbiol. Lett.* 265: 159-163.
- ❖ Zadrazil F., Compare G. y Maziero R. (2004). Biology, cultivation and utilization of *Pleurotus* Species. In: Romaine, C.P., C.B. Keil, D.L. Rinker, D.J. Royse (eds.), Proceedings of the 16th International Congress on the Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi. The Pennsylvania State University Press, Pennsylvania. pp. 383–391.
- ❖ Zhu Y. Smits J.P. y Bol J. (1994). A novel solid-stated fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology Letters* 16: 643-648.

12. ANEXOS

V CONGRESO DE LA
ASOCIACIÓN MESOAMERICANA
DE ECOTOXICOLOGÍA Y
QUÍMICA AMBIENTAL

SEDE: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES
23 al 28 de julio de 2012

CONSTANCIA A:

**Díaz R., Cervantes Muñoz P., Téllez Téllez, M.,
Sánchez C., Díaz Godínez, G.**

Por la presentación del trabajo:
Actividad de invertasa obtenida por *Pleurotus ostreatus* en Fermentación Sólida.
Dentro del V Congreso de la Asociación Mesoamericana de
Ecotoxicología y Química Ambiental (AMEQA) y SETAC - México.



Presidenta AMEQA
M en C. Yolanda Pica Granados



Comité Organizador
Dr. Roberto Rico Martínez



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



Otorga la presente

CONSTANCIA

A Pedro Cervantes Muñoz
Maestría en Ciencias Biológicas, UAT

Por impartir el seminario

**"Producción de invertasas de *Pleurotus ostreatus* en
fermentación sólida y sumergida"**

Tlaxcala, Tlax., abril 26 de 2013

Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Coordinador General de Posgrado



National Congress of
**Biotechnology and
Bioengineering**



GIM2013
12th International Symposium on the
**GENETICS OF INDUSTRIAL
MICROORGANISMS**

CERTIFICATE OF PRESENTATION

We hereby certify that

Pedro Cervantes Muñoz, Maura Téllez Téllez, Carmen Sanchez Hernandez, Ruben
Díaz Godínez, Gerardo Díaz Godínez

Delivered the Poster presentation

INVERTASE ACTIVITY PRODUCED BY *Pleurotus ostreatus* GROWN ON WHEAT STRAW

XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering and
12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms.
June 23rd - 28th, 2013 in Cancún, Quintana Roo, México.

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
President of SMBB

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
President of the Organizing Committee
SMBB

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
President of the Scientific
Committee SMBB/GIM

Dr. Sergio Sánchez Esquivel
President of the Organizing
Committee GIM

Dr. Stefano Donadio
President of GIM