



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante  
**Prof. Marcia Costa L.**  
Instituto de Ciencia y  
Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Ciencias Agrarias

Profesor Co-Patrocinante  
**Dr. Alejandro Reyes P.**  
Instituto de Bioquímica  
Facultad de Ciencias

Profesor Co-Patrocinante  
**Prof. M<sup>a</sup> Adela Martínez S.**  
Instituto de Farmacia  
Facultad de Ciencias

**OBTENCION DE ENZIMAS HIDROLITICAS A PARTIR DE  
UNA CEPA DEL HONGO *Aspergillus ficuum* MEDIANTE  
FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO**

Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al grado de  
*Licenciado en Bioquímica* y Título  
Profesional de *Bioquímico*

**MARCELO ANDRES TORRES MONTES**

**VALDIVIA – CHILE**

**2009**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a mi buen Dios por permitirme estudiar una carrera universitaria.

De igual forma agradezco a la Profesora Marcia Costa, por aceptarme como su alumno de tesis, por su apoyo, preocupación y consejos oportunos necesarios para el desarrollo de mi tesis.

También agradecer a la Profesora María Adela Martínez y al Dr. Alejandro Reyes, en su calidad de profesores informantes, por sus aportes y dedicación en la corrección de la presente tesis.

De igual forma quiero agradecer a todo el personal del ICYTAL por su disposición y apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Finalmente agradecer a mi linda familia por su apoyo, estímulo y comprensión. En este ámbito doy un agradecimiento muy especial a mi abuelita Cristobalina por su sacrificio y entrega para hacer posible este sueño.

**INDICE GENERAL**

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
1	RESUMEN	1
1.1	SUMMARY	2
2	INTRODUCCION	3
3	MATERIALES Y METODOS	13
3.1	Materiales	13
3.2	Métodos	16
3.2.1	Producción de las enzimas fitasas, celulasas, xilanasas y proteasas de la cepa <i>Aspergillus ficuum</i> DSM 932 mediante SSF en torta de canola y pomaza de cranberry	16
3.2.1.1	Preparación de inóculos	16
3.2.1.2	Producción de las enzimas hidrolíticas	16
3.2.1.3	Ensayo evolución de la producción de las enzimas fitasas, celulasas, xilanasas y proteasas de la cepa <i>Aspergillus ficuum</i> DSM 932 mediante SSF en torta de canola y pomaza de cranberry	17
3.2.1.3.1	Fitasas	17
3.2.1.3.2	Celulasas y xilanasas	21
3.2.1.3.3	Proteasas	27

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
3.2.1.4	Determinación de proteínas totales	28
3.2.2	Semipurificación y concentración de las enzimas fitasas, celulasas y xilanasas producidas por la cepa <i>Aspergillus ficuum</i> DSM 932 mediante SSF en torta de canola	31
3.2.2.1	Preparación de inóculos	31
3.2.2.2	Producción de las enzimas hidrolíticas	31
3.2.2.3	Determinación actividad fitasa, celulasa y xilanasas extractos crudos	32
3.2.2.4	Determinación proteínas totales extractos crudos	32
3.2.2.5	Microfiltración de extractos crudos de fitasa, celulasa y xilanasas	32
3.2.2.6	Ultrafiltración de extractos microfiltrados de fitasa, celulasa y xilanasas	32
3.2.3	Caracterización enzima fitasa, celulasa y xilanasas respecto al pH y temperatura	33
3.2.3.1	Caracterización fitasa respecto al pH y temperatura	33
3.2.3.2	Caracterización celulasa respecto al pH y temperatura	34
3.2.3.3	Caracterización xilanasas respecto al pH y temperatura	35
4	RESULTADOS	36

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
4.1	Producción de las enzimas fitasas, celulasas, xilanasas y proteasas de la cepa <i>Aspergillus ficuum</i> DSM 932 mediante SSF en torta de canola y pomaza de cranberry.	36
4.1.1	Proteínas totales	36
4.1.2	Fitasas	38
4.1.3	Celulasas	39
4.1.4	Xilanasas	41
4.1.5	Proteasas	43
4.2	Semipurificación y concentración de las enzimas fitasas, celulasas y xilanasas producidas por la cepa <i>Aspergillus ficuum</i> DSM 932 mediante SSF en torta de canola.	46
4.2.1	Extractos crudos (EC)	46
4.2.2	Microfiltración (MF)	46
4.2.3	Ultrafiltración - diafiltración (UF - DF)	47
4.2.3.1	Ultrafiltración - diafiltración de extractos fitasa	47
4.2.3.2	Ultrafiltración - diafiltración de extractos celulasa	48
4.2.3.3	Ultrafiltración - diafiltración de extractos xilanasas	51

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
4.3	Caracterización de las enzimas fitasa, celulasa y xilanasas respecto al pH y temperatura	54
4.3.1	Caracterización fitasa	54
4.3.2	Caracterización celulasa	55
4.3.3	Caracterización xilanasas	57
5	DISCUSION	58
5.1	Producción de las enzimas en torta de canola y pomaza de cranberry	58
5.1.1	Fitasas	58
5.1.2	Celulasas	59
5.1.3	Xilanasas	60
5.1.4	Proteasas	61
5.2	Purificación de extractos enzimáticos	61
5.3	Caracterización de los extractos enzimáticos respecto al pH y temperatura	66
6	CONCLUSIONES	69
7	PROYECCIONES	70
8	BIBLIOGRAFIA	71
9	ANEXOS	76

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
9.1	Producción de las enzimas fitasas, celulasas, xilanasas y proteasas de la cepa <i>Aspergillus ficuum</i> DSM 932 mediante SSF en torta de canola y pomaza de cranberry	76
9.1.1	Proteínas totales	76
9.1.2	Fitasas	78
9.1.3	Celulasas	80
9.1.4	Xilanasas	82
9.1.5	Proteasas	84
9.2	Caracterización enzima fitasa, celulasa y xilanasa respecto al pH y temperatura	87
9.2.1	Caracterización fitasa	87
9.2.2	Caracterización celulasa	88
9.2.3	Caracterización xilanasa	90
9.3	Preparación reactivos usados en los ensayos para la determinación de actividad fitasa, celulasa, xilanasa y proteasa	92
9.4	Preparación dilución muestras extractos enzimáticos	95
9.5	Fotografías cultivos <i>Aspergillus ficuum</i>	95

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Estructura química del ácido fítico	6
2	Representación esquemática de la molécula de xilano	8
3	Estructura química de la celulosa	9
4	Reacción de un azúcar reductor (glucosa) con el reactivo DNS	22
5	Reacción proteínas con el reactivo Folin - Ciocalteau	29
6	Producción en el tiempo de proteínas totales en torta canola (extractos crudos)	37
7	Producción en el tiempo de proteínas totales en pomaza cranberry (extractos crudos)	37
8	Evolución de la actividad total y específica neta de fitasa en torta canola durante 6 días (extractos crudos)	38
9	Evolución de la actividad total y específica neta de fitasa en pomaza cranberry durante 14 días (extractos crudos)	39
10	Evolución de la actividad total y específica neta de celulasa en torta canola durante 6 días (extractos crudos)	40
11	Evolución de la actividad total y específica neta de celulasa en pomaza cranberry durante 14 días (extractos crudos)	41



<b>Figura</b>		<b>Página</b>
12	Evolución de la actividad total y específica neta de xilanasas en torta canola durante 6 días (extractos crudos)	42
13	Evolución de la actividad total y específica neta de xilanasas en pomaza cranberry durante 14 días (extractos crudos)	43
14	Evolución de la actividad total neta de proteasa en torta canola durante 6 días (extractos crudos)	44
15	Evolución de la actividad específica neta de proteasa en torta canola durante 6 días (extractos crudos)	44
16	Evolución de la actividad total neta de proteasa en pomaza cranberry durante 14 días (extractos crudos)	45
17	Evolución de la actividad específica neta de proteasa en pomaza cranberry durante 14 días (extractos crudos)	45
18	UF y DF de extractos fitasa a través de membranas de 100 kDa	47
19	UF y DF de extractos celulasa a través de Centriplus de 50 kDa	48
20	UF y DF de extractos celulasa a través de Centriplus de 30 kDa	49
21	UF y DF de extractos celulasa a través de Centriplus de 10 kDa	50
22	UF y DF de extractos xilanasas a través de Centriplus de 50 kDa	51
23	UF y DF de extractos xilanasas a través de Centriplus de 30 kDa	52

24	UF y DF de extractos xilanasas a través de Centriplus de 10 kDa	53
25	Caracterización fitasa respecto al pH	54
26	Caracterización fitasa respecto a la temperatura	55
27	Caracterización celulasa respecto al pH	56
28	Caracterización celulasa respecto a la temperatura	56
29	Caracterización xilanasas respecto al pH	57
30	Caracterización xilanasas respecto a la temperatura	57
31	Gráfico curva de calibración determinación proteínas totales	76
32	Gráfico curva de calibración ensayo de actividad fitasa	78
33	Gráfico curva de calibración ensayo de actividad celulasa	80
34	Gráfico curva de calibración para ensayo de actividad xilanasas	82

**INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Preparación curva de calibración ensayo actividad fitasa	18
2	Preparación curva calibración ensayo actividad celulasa	22
3	Preparación curva calibración ensayo actividad xilanasas	25
4	Preparación curva calibración determinación proteínas totales	30
5	Actividad total y específica enzimas fitasa, celulasa y xilanasas en torta canola (EC)	46
6	Actividad total y específica enzimas fitasa, celulasa y xilanasas en torta canola (MF)	46
7	Proceso de UF - DF de extractos fitasa a través de membranas de 100 kDa	47
8	Proceso de UF - DF de extractos celulasa a través de Centriplus de 50 kDa	48
9	Proceso de UF - DF de extractos celulasa a través de Centriplus de 30 kDa	49
10	Proceso de UF - DF de extractos celulasa a través de Centriplus de 10 kDa	50

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
11	Proceso de UF - DF de extractos xilanasa a través de Centriplus de 50 kDa	51
12	Proceso de UF - DF de extractos xilanasa a través de Centriplus de 30 kDa	52
13	Proceso de UF - DF de extractos xilanasa a través de Centriplus de 10 kDa	53
14	Curva calibración ensayo proteínas totales	76
15	Determinación proteínas torta canola (extractos crudos)	77
16	Determinación proteínas pomaza cranberry (extractos crudos)	77
17	Curva de calibración ensayo de actividad fitasa	78
18	Evolución de la actividad total y específica neta fitasa en torta canola (EC)	79
19	Evolución de la actividad total y específica neta fitasa en pomaza cranberry (EC)	79
20	Curva de calibración para ensayo actividad celulasa	80
21	Evolución de la actividad total y específica neta celulasa en torta canola (EC)	81

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
22	Evolución de la actividad total y específica neta celulasa en pomaza cranberry (EC)	81
23	Curva de calibración ensayo xilanasa	82
24	Evolución de la actividad total y específica neta xilanasa en torta canola (EC)	83
25	Evolución de la actividad total y específica neta xilanasa en pomaza cranberry (EC)	83
26	Evolución de la actividad neta de proteasa en torta canola (EC)	84
27	Evolución de la actividad específica neta de proteasa en torta canola (EC)	84
28	Evolución de la actividad neta de proteasa en pomaza cranberry (EC)	85
29	Evolución de la actividad específica neta de proteasa en pomaza cranberry (EC)	86
30	Caracterización fitasa respecto al pH	87
31	Caracterización fitasa respecto a la temperatura	87
32	Caracterización celulasa respecto al pH	88
33	Caracterización celulasa respecto a la temperatura	89
34	Caracterización xilanasa respecto al pH	90
35	Caracterización xilanasa respecto a la temperatura	91

**INDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Protocolo ensayo actividad fitasa	19
2	Protocolo ensayo actividad celulasa	23
3	Protocolo ensayo actividad xilanasas	25
4	Protocolo ensayo actividad proteasa	27
5	Protocolo determinación proteínas totales	30
6	Preparación reactivos ensayo actividad fitasa	92
7	Preparación reactivos ensayo actividad celulasa	93
8	Preparación reactivos ensayo actividad xilanasas	93
9	Preparación reactivos ensayo actividad proteasa	94
10	Preparación reactivos determinación proteínas totales	94

**INDICE DE FOTOGRAFIAS**

<b>Fotografía</b>		<b>Página</b>
1	Esporas brotadas de la cepa <i>Aspergillus ficuum</i> DSM 932	95
2	Crecimiento <i>Aspergillus ficuum</i> cepa DSM 932 mediante SSF en torta de canola	96

## 1. RESUMEN

En los últimos años, los subproductos y los desechos de la agroindustria están adquiriendo cada vez mayor importancia debido a su uso en procesos fermentativos para producir diversas sustancias, que tienen valor por su importancia biológica y en su aplicación en la industria de alimentos.

En la presente tesis, el objetivo fue producir enzima fitasa, celulasa, xilanasas y proteasa proveniente de la cepa DSM 932 del hongo *Aspergillus ficuum*; esto mediante fermentación en estado sólido (SSF), usando torta de canola y pomaza de cranberry. Los resultados obtenidos indican que es factible la obtención de fitasa, celulasa, xilanasas y proteasa de la cepa DSM 932 de *Aspergillus ficuum*, en ambos sustratos sólidos. También se logró llevar a cabo la semipurificación y concentración de un extracto de fitasa, celulasa y xilanasas proveniente de una SSF usando como sustrato sólido torta de canola, mediante el conjunto de técnicas de microfiltración y ultrafiltración ideados para este propósito.

Finalmente se logró llevar a cabo la caracterización, respecto al pH y la temperatura, de los extractos ultrafiltrados de fitasa, celulasa y xilanasas mediante el uso de protocolos diseñados para estos propósitos.



## 1.1 SUMMARY

At the last years, by - products and the waste matter from agroindustry are acquiring each time bigger importance due to his use in fermentative processes to produce various substances, that they have value for their biological importance and in his application at the foods industry.

In the present thesis, the objective was to produce enzyme phytase, cellulase, xylanase and protease coming from the strain DSM 932 of the fungi *Aspergillus ficuum*; since by means of solid state fermentation (SSF), using canola cake and cranberry pomace. The obtained results indicate that it is feasible the obtaining of phytase, cellulase, xylanase and protease of the strain *Aspergillus ficuum* DSM 932, on both solid substrates. Also it was possible to carry out the partial purification and concentration of an extract of phytase, cellulase and xylanase coming from a SSF using canola cake like solid substrate, by means of the combined of technical of microfiltration and ultrafiltration devised for this purpose.

Finally it was possible to carry out the characterization, in relation to the pH and temperature, the ultrafiltrates extracts of phytase, cellulase and xylanase by means of the use of protocols designed for these purposes.

## 2. INTRODUCCIÓN

La fermentación en estado sólido (SSF) es una técnica conocida desde hace siglos y se define como el proceso fermentativo en el cual el microorganismo crece sobre una matriz sólida en escasez o ausencia de agua libre (Blandino *et al.*, 2005; Krishna, 2005). El sustrato debe contener sólo la humedad suficiente para favorecer el crecimiento y la actividad metabólica del microorganismo (De Ory *et al.*, 2007). Estos sustratos no son solubles en agua ni en polímeros en la naturaleza y son una fuente de carbono, vitaminas y minerales que favorecen el crecimiento microbiano (Singh y Nigam, 1994).

En la actualidad la fermentación en soporte sólido se usa con gran éxito en la producción de antibióticos, micotoxinas, surfactantes, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos, pesticidas y enzimas, entre otros (Blandino *et al.*, 2005; De Ory *et al.*, 2007).

Los sustratos utilizados en este tipo de fermentación son muy variados, destacándose los cereales tales como trigo, centeno, arroz y maíz (De Ory *et al.*, 2007; Harland y Harland, 1980) y subproductos agroindustriales como la torta de canola (Duvnjak *et al.*, 1995). También se usan desechos de la agroindustria, los cuales son considerados los mejores sustratos para SSF ya que proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo (Krishna, 2005), ejemplo de ello son los residuos de manzana, plátano, uva, cítricos, caña de azúcar, (Blandino *et al.*, 2005) y pomaza de cranberry, entre otros (Shetty y Zheng, 1998). Otros sustratos menos comunes incluyen sustancias como el agar, gelatina y polímeros de tipo sintético (Singh y Nigam, 1994).

La fermentación en soporte sólido (SSF) presenta diversas ventajas con respecto a la fermentación sumergida (SmF). Doelle *et al.* (1992) consideran como ventajas los siguientes aspectos:

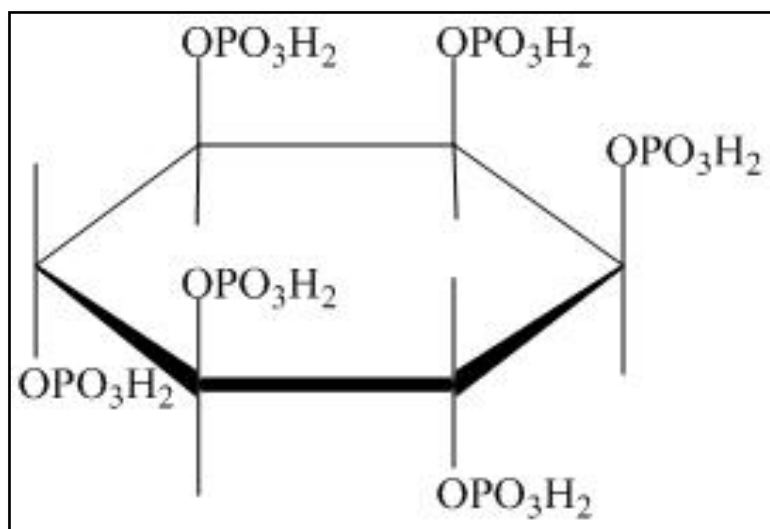
- Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
- La concentración natural del sustrato permite 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 recuperación es simple. Algunos productos son utilizados integralmente, como alimento animal, productos para el control biológico, etc.
- Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

El mayor grupo de microorganismos usados en este tipo de fermentación son las bacterias y los hongos; de estos últimos los de tipo filamentoso son los más importantes, ideales y mejor adaptados para SSF (Krishna, 2005). Su buena tolerancia frente a una baja actividad de agua y

condiciones elevadas de presión osmótica ofrecen una gran ventaja sobre microorganismos unicelulares en la colonización de sustratos sólidos y utilización de los nutrientes disponibles (Krishna, 2005). Dentro de este grupo de hongos destacan los del género *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Singh y Nigam, 1994).

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos (Abarca, 2000). Ello conlleva a que este género de hongo produzca diversas sustancias, las cuales el hombre ha aprovechado para su beneficio. Específicamente dentro del grupo de los *Aspergillus*, los más usados en la industria son los miembros del grupo *Aspergillus niger* o conocidos también como *Aspergillus* “sección *Nigri*” (cuyas especies más comunes son *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* y *Aspergillus ficuum*); caracterizándose este grupo, porque están distribuidos a nivel mundial, y por ser considerados los hongos más comunes que se presentan en la descomposición de los alimentos (Raper y Fennell, 1965). Su papel se destaca principalmente en su aplicación en la industria de alimentos, en donde se utilizan para la producción de ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico y ácido láctico (Krishna, 2005; Ward, 1989). También se utilizan para la producción de numerosas enzimas, tales como  $\alpha$ -amilasas, pectinasas, amiloglucosidasas, lactasas, celulasas, xilanasas, proteasas y fitasas (Krishna, 2005; Ward, 1989). Dentro de este grupo de enzimas podemos destacar las fitasas, xilanasas, celulasas y proteasas.

**2.1 Fitasas.** Las fitasas son fosfatasas que pertenecen a la subfamilia de las fosfatasas ácidas histidina, las cuales catalizan la hidrólisis de las uniones fosfomonoéster del fitato (sales de mio - inositol hexakisfosfato) o del mio - inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 - hexakisdihidrógeno fosfato (ácido fítico) (Figura 1), produciendo derivados penta, tetra, tri, di y monofosfato del mioinositol y fosfato inorgánico (Pi) (Duvnjak y Al - Asheh, 1994; Krishna, 2005).



**Figura 1. Estructura química del ácido fítico.**

Fuente: Adaptación del original (Ochiai, 1985).

Existen dos clases de fitasas de importancia, las cuales reciben su nombre según la posición específica en donde comienza la hidrólisis en el grupo éster fosfato en la molécula del fitato, ellas son la 3 - fitasa (EC 3.1.3.8) y la 6 - fitasa (EC 3.1.3.26) (Roopesh *et al.*, 2006).

Las dos histidinas presentes en el residuo conservado de histidina de estas enzimas, se cree que están involucradas en el mecanismo de reacción enzimática, localizándose y actuando de la siguiente forma:

- La primera histidina se localiza en la sección N- terminal y forma una molécula intermediaria de fosfohistidina.
- La segunda histidina se localiza en la sección C- terminal y posiblemente actúa como donador de protones (Ostanin, *et al.*, 1992; Van Etten *et al.*, 1991).

El mecanismo de reacción de esta enzima, requiere de un intermediador de fosfohistidina en la reacción de transferencia del grupo fosforil, siendo su mecanismo de reacción el siguiente:

- Un ataque de tipo nucleofílico de un grupo fosfato que sufre la escisión, por un residuo conservado de histidina, y una protonación del grupo saliente por otro grupo presente en la enzima, produciendo un intermediario covalente de fosfo - enzima y una molécula de alcohol.
- El complejo intermediario fosfo - enzima, que es inestable, es hidrolizado produciendo la liberación de un fosfato inorgánico (Pi). (Van Etten, 1982).

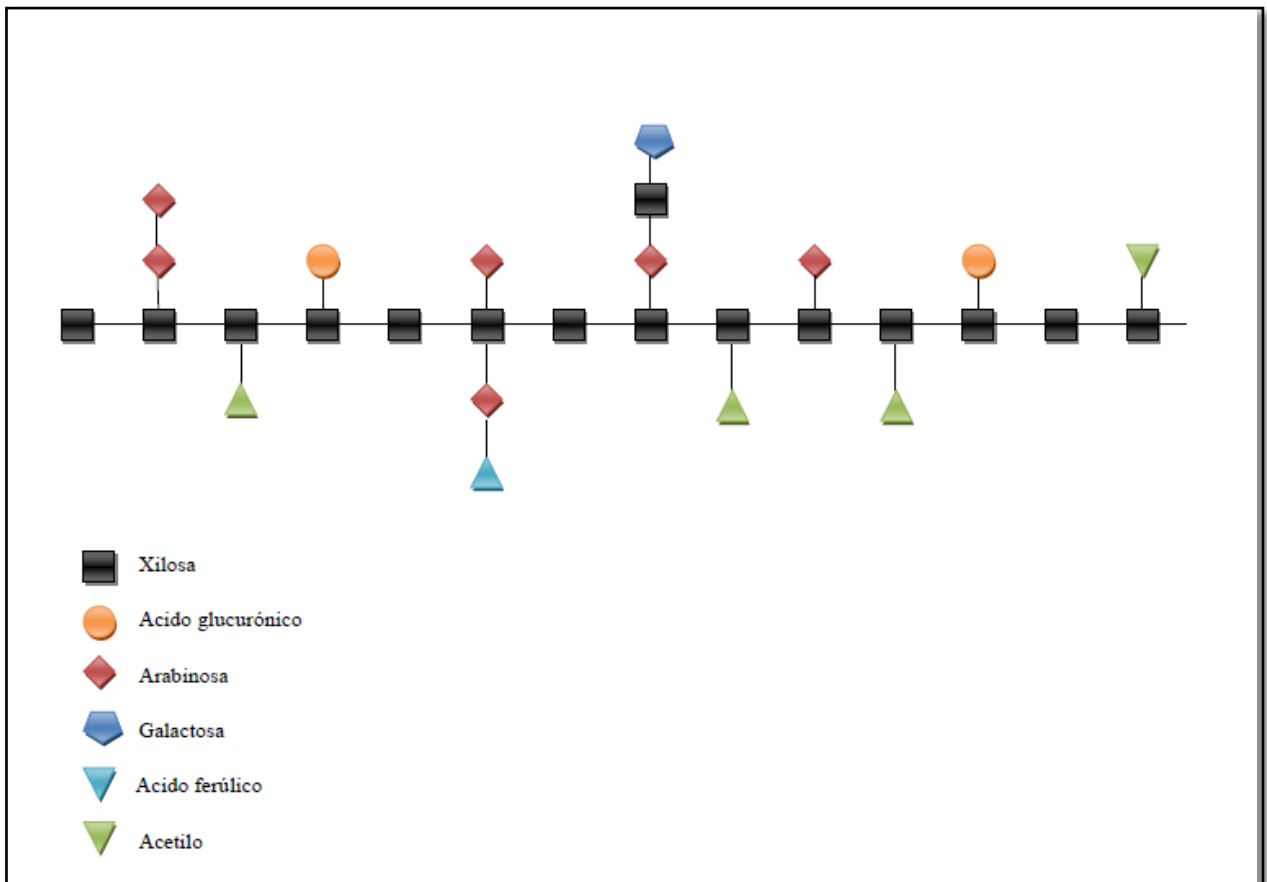
La importancia de esta enzima radica en su uso en la industria de alimentos, donde se emplea en forma de preparados (suplemento de fitasa) combinados con alimentos en animales no rumiantes tales como los cerdos, los cuales no son capaces de utilizar el fosfato presente en el ácido fítico (mayor reservorio de fosforo en vegetales), debido a la ausencia de fitasa en sus intestinos. Este ácido fítico es eliminado en las heces, generando polución del suelo y eutroficación del agua por fosfatos. De esta forma se reducen los efectos contaminantes ya que estos animales pueden tener una mayor biodisponibilidad de fosfato para sus necesidades fisiológicas (Roopesh *et al.*, 2006; Walsh y Casey, 2003).

**2.2 Xilanasas.** Este es el nombre genérico para una familia de enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces xilosídicos internos de la molécula de heteroxilano (xilano), un tipo de polisacárido, el cual es el mayor componente de la hemicelulosa, componente importante de la biomasa de la pared celular en vegetales (Fang *et al.*, 2008; Anthony *et al.*, 2003).

Las enzimas que participan de la biodegradación del heteroxilano son las endoxilanasas (EC 3.2.1.8), las cuales rompen el esqueleto de xilano en pequeños oligosacáridos y las  $\beta$  - xilosidasas

(EC 3.2.1.37), las cuales degradan estos oligosacáridos a moléculas de xilosa (De Vries y Visser, 2001).

La estructura química del xilano presente en la pared celular de plantas difiere grandemente dependiendo de su origen, pero todas ellas contienen un esqueleto de D - xilosa unidos entre sí por enlaces  $\beta$  - 1,4, otras moléculas unidas a este esqueleto, dependiendo de la especie vegetal son arabinosa, galactosa, ácido ferúlico y ácido glucurónico (De Vries y Visser, 2001). Un esquema de la estructura de xilano se muestra en la Figura 2.

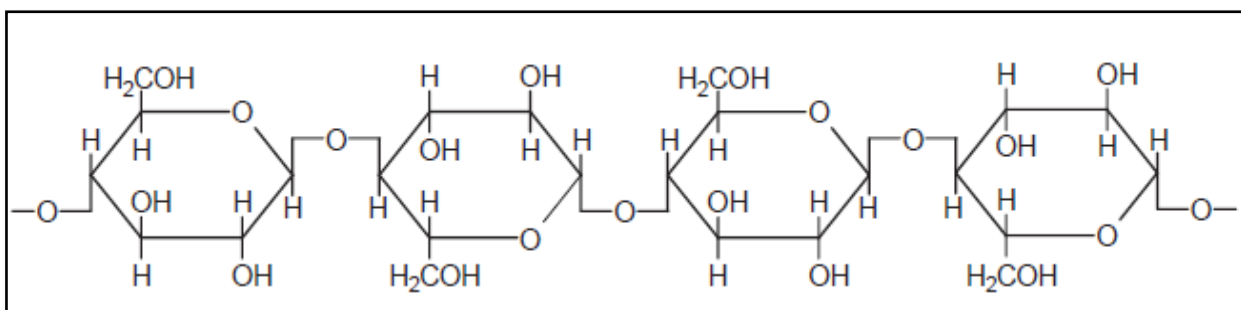


**Figura 2. Representación esquemática de la molécula de xilano.**

Fuente: Adaptación del original (De Vries y Visser, 2001).

El uso de las xilanasas ha sido propuesto para optimizar los procesos de clarificación de vinos y jugos, para extraer café y aceite de plantas (Krishna, 2005; Zhaoxin *et al.*, 2008). También se utiliza para la producción de hidrolizados de desechos agroindustriales y para la biodecoloración de la pulpa de papel (Zhaoxin *et al.*, 2008).

**2.3 Celulasas.** Nombre genérico que reciben un complejo de enzimas capaces de degradar celulosa, un polisacárido formado por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces  $\beta$  - 1,4 (Figura 3) (Krishna, 2005; Yamamoto *et al.*, 1995).



**Figura 3. Estructura química de la celulosa.**

Fuente: (Heldt, 2005).

Este complejo enzimático está conformado por la endo - 1,4 -  $\beta$  - D - glucanasa (EC 3.2.1.4) , cuya función es hidrolizar los enlaces  $\beta$  - 1,4 de la celulosa para producir glucooligosacáridos, la exo - 1,4 -  $\beta$  - D - glucanasa (celobiohidrolasa) (EC 3.2.91) , que produce celobiosa a partir de celulosa y la  $\beta$  - D - glucosidasa (EC 3.2.1.21) que degrada los glucooligosacáridos a glucosa (Blandino *et al.*, 2005; Krishna, 2005; De Vries y Visser, 2001; Yamamoto *et al.*, 1995).



Esta enzima se usa en la producción de glucosa y de etanol, también para extraer componentes del té verde, para producir jarabe de fructosa y para el tratamiento de materiales que contienen lignocelulosa (Blandino *et al.*, 2005; Krishna, 2005).

**2.4 Proteasas.** Estas enzimas son de mucha importancia con respecto a su rol fisiológico y a sus aplicaciones comerciales, ya que son fisiológicamente necesarias para los organismos vivientes tales como plantas, animales y microorganismos (Boer y Peralta, 2000). Además son una de las mayores enzimas fúngicas hidrolíticas producidas por SSF y su producción abarca cerca del 60% del total de enzimas producidas industrialmente en el mundo (Krishna, 2005).

Las aplicaciones de esta enzima son muy variadas, destacándose su uso en la industria del cuero y la seda, en alimentos, medicamentos, también como componente de detergentes y para recuperar la plata usada en películas de rayos X, entre otras (Tunga *et al.*, 2003).

**2.5 Fermentación sobre sustrato sólido (SSF).** De acuerdo a los antecedentes anteriores la SSF se presenta como una técnica apropiada y muy útil para la producción a gran escala de metabolitos de interés a partir de sustratos naturales, subproductos y/o desechos de la agroindustria, a través de la intervención de microorganismos.

Desde un punto de vista medioambiental y de producción limpia, actualmente la industria maneja la idea integral de minimización de residuos, es por ello que toda acción que de utilidad a un residuo industrial o le agregue valor, resulta de sumo conveniente.

Es así como un residuo agroindustrial, de muy bajo costo, puede constituirse en un posible sustrato para la producción de enzimas mediante SSF. En general los residuos agroindustriales contienen aún importantes concentraciones de proteínas, carbohidratos, minerales y otros compuestos, como ácido fítico, la principal reserva de fósforo en vegetales.

La torta de canola es un subproducto de la industria productora de aceite comestible que contiene aproximadamente un 34% de proteínas, un 6% de ácido fólico y un 26% de carbohidratos (Duvnjak y Nair, 1990) y se usa en alimentación de rumiantes. La pomaza de cranberry es un desecho de la industria productora de jugo de cranberry y contiene principalmente carbohidratos y pequeñas cantidades de proteína (Shetty y Zheng, 1998).

**2.6 Hipótesis y objetivos.** En el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL), de la Universidad Austral de Chile se ha estado trabajando con el hongo *Aspergillus ficuum* en la producción de la enzima fitasa en SSF sobre sustratos derivados de cereal. Cabe destacar que *Aspergillus ficuum* es usado para la producción industrial de fitasa mediante cultivo sumergido (SmF). La fitasa producida por este hongo ha sido ampliamente estudiada (Nelson *et al.*, 1968) al igual que el hongo, pudiéndose inferir que esta cepa también puede liberar otras enzimas hidrolíticas tales como celulasas y xilanasas, al igual que *Aspergillus awamori* (Blandino *et al.*, 2005).

En base a todos los antecedentes antes mencionados se planteó la siguiente hipótesis:

“Al cultivar el hongo *Aspergillus ficuum* DSM 932 sobre sustratos que contienen ácido fólico, carbohidratos y proteínas, será posible detectar la liberación de diversas enzimas hidrolíticas tales como celulasas, xilanasas, proteasas y fitasas y determinar su producción en el tiempo.”

En este contexto, la presente tesis se focalizó en el siguiente objetivo general:

- Estimar la potencialidad de la torta de canola y de la pomaza de cranberry para la producción, usando el hongo *Aspergillus ficuum* mediante fermentación en estado sólido, de diversas enzimas hidrolíticas tales como fitasas, celulasas, xilanasas, etc.

Según esto, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Cultivar la cepa de *Aspergillus ficuum* DSM 932 en torta de canola y pomaza de cranberry (sustratos sólidos).
- Determinar la producción en el tiempo de las enzimas fitasa, celulasa, xilanasas y proteasa de la cepa de *Aspergillus ficuum* DSM 932 mediante SSF en torta de canola y pomaza de cranberry.
- Semipurificar y concentrar la enzima fitasa, celulasa y xilanasas.
- Caracterizar las enzimas obtenidas (fitasa, celulasa y xilanasas) respecto a su pH y temperatura óptima.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Materiales

**Reactivos químicos.** Los reactivos químicos usados en la elaboración de la presente tesis fueron los siguientes:

- Tritón X - 100,  $C_{14}H_{22}O (C_2H_4O)_{10}$  (MERCK)
- Sulfato de amonio,  $NH_4 (SO_4)_2$  (MERCK)
- Fosfato diácido de potasio anhidro,  $KH_2PO_4$  (MERCK)
- Acido sulfúrico,  $H_2SO_4$  (MERCK)
- Acido fítico (sal dodecasódica),  $C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$  (SIGMA)
- Sulfato de magnesio heptahidratado,  $MgSO_4 \times 7 H_2O$  (WINKLER)
- Heptamolibdato de amonio tetrahidratado,  $H_{24}Mo_7N_6O_{24} \times 4 H_2O$  (MERCK)
- Acetato de sodio anhidro,  $C_2H_3O_2Na$  (MERCK)
- Acido acético glacial,  $C_2H_4O_2$  (LABSYNTH)
- Acido tricloroacético,  $C_2HO_2Cl_3$  (VETEC ANALYTICAL REAGENTS)
- Sulfato ferroso heptahidratado,  $FeSO_4 \times 7 H_2O$  (MERCK)
- Carboximetilcelulosa (sal sódica) (CALBIOCHEM)
- Glicina,  $C_2H_5NO_2$  (MERCK)
- Hidróxido de sodio,  $NaOH$  (MERCK)
- D (+) - Glucosa,  $C_6H_{12}O_6$  (MERCK)
- Birchwood xilano (SIGMA)
- Acido 3,5 dinitrosalicílico,  $C_7H_4O_7N_2$  (SIGMA)

- Acido cítrico monohidratado,  $C_6H_8O_7 \times H_2O$  (MERCK)
- Citrato de sodio dihidratado,  $C_6H_5O_7Na_3 \times 2 H_2O$  (MERCK)
- D (+) - Xilosa,  $C_5H_{10}O_5$  (MERCK)
- Disolución al 5% albúmina suero bovino (BSA fracción V) (SIGMA)
- Sulfato cúprico pentahidratado,  $CuSO_4 \times 5 H_2O$  (MERCK)
- Carbonato de sodio decahidratado,  $Na_2CO_3 \times 10 H_2O$  (MERCK)
- Tartrato de potasio y sodio tetrahidratado,  $C_4H_4O_6KNa \times 4 H_2O$  (MERCK)
- Reactivo Folin - Ciocalteau (SIGMA)
- Acido clorhídrico, HCl (MERCK)

**Microorganismo.** El microorganismo usado en la presente tesis para la producción por SSF de las diferentes enzimas, fue un hongo del género *Aspergillus*, de la especie *Aspergillus ficuum*.

- Cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932

**Medio de cultivo y sustratos sólidos.**

- Extracto levadura (MERCK)
- D (+) - Glucosa (MERCK)
- Torta canola (OLEOTOP)
- Pomaza cranberry (CRANCHILE)
- Sulfato de amonio,  $NH_4 (SO_4)_2$  (MERCK)

**Equipos e implementos.**

- Baño termostático (MEMMERT)
- Centrífuga Hitachi CR21GII
- Cámara flujo laminar (LABCONCO)
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5
- Estufa (BINDER)
- Agitador orbital termostático (NUOVA THERMOLYNE)
- Incubadora shaker MA 410/CF (MARCONI)
- Balanza analítica AND GR - 200
- Celda ultrafiltración AMICON 8050
- Membranas ultrafiltración 100 kDa (MILLIPORE)
- Tubos ultrafiltración Centriplus YM - 50, YM - 30 e YM - 10 (MILLIPORE)
- Membranas microfiltración 0,45  $\mu\text{m}$  (MILLIPORE)
- pH metro (HANNA)

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Producción de las enzimas fitasas, xilanasas, celulasas y proteasas de la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932 mediante SSF en torta de canola y pomaza de cranberry.

**3.2.1.1 Preparación de inóculos.** Primeramente se procedió a obtener una disolución stock de esporas de *A. ficuum*. Para ello se suspendieron colonias del hongo desde una placa de agar papa dextrosa con 3 mL de Tritón X - 100 al 1% estéril. Luego se tomaron alícuotas de 50 µL de este stock de esporas ( $4,36 \times 10^7$  esporas/mL) y se inocularon respectivamente en dos matraces Erlenmeyer con medio de cultivo líquido que contenía glucosa y extracto de levaduras (250 mL para ensayo torta canola y 100 mL para ensayo pomaza cranberry) y se incubaron en una incubadora shaker a 25°C por 24 h y a 180 rpm para su desarrollo.

**3.2.1.2 Producción de las enzimas hidrolíticas.** Posteriormente se tomaron alícuotas de las esporas brotadas de *A. ficuum* DSM 932 (35 mL para ensayo torta de canola y 5 mL para ensayo pomaza de cranberry) y se depositaron en 3 placas<sup>1</sup> que contenían 65 g de torta de canola c/u y en 3 placas que contenían 150 g de pomaza de cranberry c/u (para ambos sustratos se agregó sulfato de amonio en relación 1:20 respecto al sustrato antes de la siembra) y se incubaron en una estufa a 25°C por 6 días (ensayo con torta canola) y por 14 días (ensayo pomaza de cranberry), tomando muestras en forma diaria (aprox. 7,5 g para ensayo torta canola y aprox. 5,5 g para ensayo pomaza de cranberry), las que fueron guardadas en tubos Falcon y refrigeradas a 4°C.

---

<sup>1</sup> Placas de Petri de 15 cm de diámetro

Después del último día de toma de muestras, para cada ensayo se realizó el proceso de obtención del extracto crudo que contenía las enzimas producidas, para ello se usó una disolución estéril de Tritón X - 100 al 1% a razón 5:1 respecto del peso de la muestra y se procedió a agitar en una incubadora shaker a 25°C por 2 h a 150 rpm para posteriormente centrifugar las muestras a 9.000 rpm por 10 minutos a 4°C, obteniendo así los extractos crudos, que se utilizaron en los diferentes ensayos de actividad enzimática.

### **3.2.1.3 Ensayo evolución de la producción de las enzimas fitasas, xilanasas, celulasas y proteasas de la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932 mediante SSF en torta de canola y pomaza de cranberry.**

**3.2.1.3.1 Fitasas.** Para determinar la actividad fitasa se utilizó el método descrito por Harland y Harland (1980) modificado, el cual hace uso del reactivo de Taussky - Shorr, que permite detectar el fosfato inorgánico (Pi), a través de la medición de la absorbancia a 660 nm producida por el sulfato ferroso formado durante la reducción del ácido fosfomolibdico a partir del fosfato inorgánico en disolución (Taussky y Shorr, 1953).

Las muestras para la confección de la curva de calibración se hicieron una vez y fueron preparadas de acuerdo a lo descrito en la Tabla 1. Las reacciones enzimáticas para este y el resto de estudios donde se requería determinar la actividad fitasa se hicieron en triplicado, de acuerdo al protocolo que se muestra en el Cuadro 1. La preparación de los diversos reactivos usados se detallan en el Cuadro 6 del punto 9.3 de Anexos.



**Tabla 1. Preparación curva de calibración ensayo actividad fitasa.\***

<b>N° TUBO</b>	<b>Pi (<math>\mu\text{mol/mL}</math>)</b>	<b>Volumen (mL) Pi (2 <math>\mu\text{mol/mL}</math>)</b>	<b>Volumen (mL) H<sub>2</sub>O destilada</b>	<b>Volumen (mL) TCA al 10%</b>	<b>Volumen (mL) MgSO<sub>4</sub> 0,1M</b>
1	1,00	1,50	2,50	0,50	1,00
2	0,83	1,25	2,75	0,50	1,00
3	0,60	0,90	3,10	0,50	1,00
4	0,40	0,60	3,40	0,50	1,00
5	0,30	0,45	3,55	0,50	1,00
6	0,20	0,30	3,70	0,50	1,00
7	0,10	0,15	3,85	0,50	1,00
8	0,08	0,12	3,88	0,50	1,00
9	0,04	0,06	3,94	0,50	1,00
Blanco	0,00	0,00	4,00	0,50	1,00

\* Después de agregar todos los reactivos descritos en esta tabla se agregan finalmente a cada tubo 2,40 mL del reactivo de Taussky - Shorr, se espera 10 minutos y se mide su absorbancia a 660 nm.

Tanto la gráfica de la curva (Figura 32) como la tabla con los valores de absorbancias de la misma (Tabla 17) se encuentran detalladas en el punto 9.1.2 de Anexos.

**Cuadro 1. Protocolo ensayo actividad fitasa.****Procedimiento de reacción enzimática en condiciones de:****A. Reacción positiva****Agregar:**

- 1,0 mL de  $\text{MgSO}_4$  0,1M en buffer acetato 0,2 M pH = 5,15
- 0,6 mL de extracto con la enzima (muestra diluida apropiadamente).
- 2,4 mL de ácido fítico 6,82 mM en buffer acetato 0,2 M pH = 5,15

**Incubar por 60 minutos a 55°C.**

**Agregar:**

- 0,5 mL TCA al 10% (para detener la reacción).
- 1,0 mL  $\text{H}_2\text{O}$  (d) y refrigerar por 20 minutos (para disminuir la  $T^\circ$ ).

**Agregar:**

- 2,4 mL reactivo de Taussky - Shorr.

**Esperar 10 minutos y medir absorbancia a 660 nm.**

---

**B. Reacción negativa****Agregar:**

- 1,0 mL de  $\text{MgSO}_4$  0,1M en buffer acetato 0,2 M pH = 5,15
- 0,6 mL de extracto con la enzima (muestra diluida apropiadamente).
- 0,5 mL TCA al 10% (para detener la reacción).
- 2,4 mL de ácido fítico 6,82 mM en buffer acetato 0,2 M pH = 5,15

**Esperar 60 minutos a temperatura ambiente.**

**Agregar:**

- 1,0 mL  $\text{H}_2\text{O}$  (d) y refrigerar por 20 minutos (para equiparar el volumen y la  $T^\circ$  con los ensayos de reacción positiva).

**Agregar:**

- 2,4 mL reactivo de Taussky - Shorr.
- Esperar 10 minutos y medir absorbancia a 660 nm.

En el tratamiento de los resultados, la medición de la absorbancia correspondiente a la cantidad de Pi liberado por la reacción enzimática, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Absorbancia Pi liberado} = \text{Absorbancia reacción (+)} - \text{Absorbancia reacción (-)}$$

La medición de la concentración del Pi liberado, que corresponde a la cantidad de Pi liberado por la reacción enzimática, se calculó en todas las muestras mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración Pi liberado} = \frac{\text{Absorbancia Pi liberado}}{\text{Absorbancia Tubo N° 5 Curva Calibración (triplicado)}}$$

La medición de actividad total de fitasa, fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{FTU/g} = \frac{\text{Concentración Pi liberado} \times \text{Volumen ensayo} \times \text{Factor dilución}}{\text{Volumen enzima} \times \text{Factor extracción} \times \text{Tiempo ensayo}}$$

Donde:

**FTU/g** = Unidades de actividad fitasa por gramo de sustrato sólido.

**Concentración Pi liberado** = Corresponde a los  $\mu$ moles de Pi liberado en 60 minutos por una disolución de enzima diluida.

**Volumen de ensayo** = 3 mL; para equiparar con el volumen en que se calculó la concentración del fosfato inorgánico (Pi) en la curva de calibración.

**Volumen de enzima** = 0,6 mL.

**Factor de extracción** = 0,2 g/mL; correspondiente a la relación de extracción con Tritón X - 100 estéril para obtener los extractos que contenían, en este caso fitasa (5 mL de Tritón X - 100 por cada 1 g de sustrato sólido).

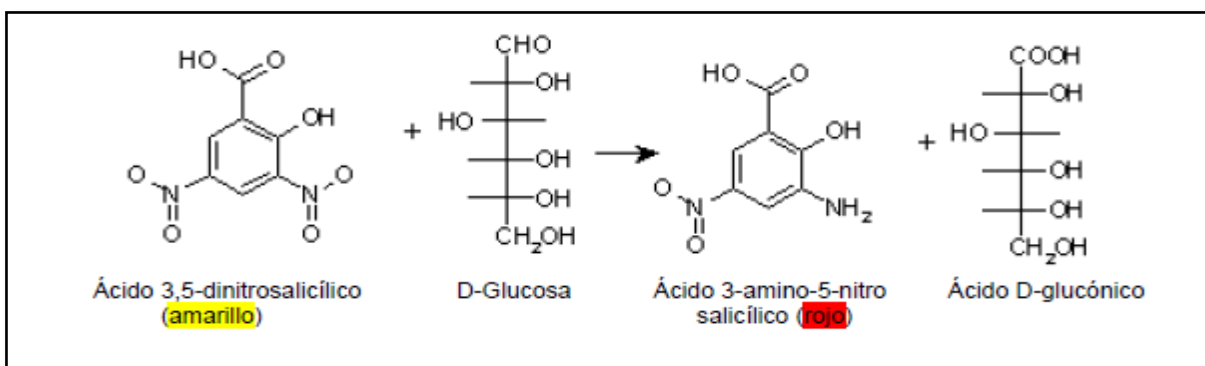
**Tiempo ensayo** = 60 minutos.

**Factor dilución** = Calculado de acuerdo a la fórmula que se muestra en el punto 9.4 de Anexos.

Para obtener la actividad específica de fitasa se dividió el resultado de la fórmula para calcular la actividad total por los mg de proteína obtenidos del análisis de proteínas totales.

**3.2.1.3.2 Celulasas y xilanasas.** Para determinar la actividad celulasa y xilanasas se usó el método propuesto por Miller (1959) modificado, el cual hace uso del reactivo DNS (ácido 3,5 - dinitrosalicílico) de color amarillo, que reacciona con azúcares reductores tales como glucosa, xilosa, fructosa, maltosa, lactosa, entre otros, para generar ácido 3 - amino - 5 - nitro - salicílico de color rojo y cuya absorbancia se mide a 510 nm (Figura 4).

Las muestras para la confección de la curva de calibración para ambas enzimas se hicieron una vez y fueron preparadas de acuerdo a lo descrito en la Tabla 2 y 3 respectivamente. Las reacciones enzimáticas para este y el resto de estudios donde se requería determinar la actividad celulasa y xilanasas se hicieron en triplicado, de acuerdo a los protocolos que se muestran en el Cuadro 2 y 3 respectivamente. La preparación de los diversos reactivos usados para el ensayo de actividad celulasa y xilanasas se detallan en los Cuadros 7 y 8 respectivamente en el punto 9.3 de Anexos.



**Figura 4. Reacción de un azúcar reductor (glucosa) con el reactivo DNS.**

Fuente: Adaptado del original (Chaplin, 1986).

**Tabla 2. Preparación curva calibración ensayo actividad celulasa.\***

N° TUBO	Glucosa (mg/mL)	Volumen (mL) Glucosa (1 mg/mL)	Volumen (mL) H <sub>2</sub> O destilada	Volumen (mL) TCA 0,3 M
1	0,75	1,13	0,37	2,0
2	0,50	0,75	0,75	2,0
3	0,25	0,38	1,12	2,0
4	0,20	0,30	1,20	2,0
5	0,10	0,15	1,35	2,0
Blanco	0,00	0,00	1,50	2,0

\* Después de agregar todos los reactivos descritos en esta tabla se agregan finalmente a cada tubo 3,50 mL del reactivo DNS y se proceden a hervir por 5 minutos y se dejan enfriar en un recipiente con agua por 45 minutos y se mide su absorbancia a 510 nm.

**Cuadro 2. Protocolo ensayo actividad celulasa.**

**Agregar:**

- **1,0 mL de una disolución de carboximetilcelulosa al 1% p/v en buffer glicina - NaOH 0,05 M pH = 9,0**
- **0,5 mL de extracto enzimático (muestra diluida apropiadamente).**

**Incubar a 50°C por 10 minutos (se forma glucosa).**

**Agregar:**

- **2,0 mL de TCA 0,3 M (para detener la reacción).**
- **3,5 mL de reactivo DNS.**

**Hervir por 5 minutos y luego enfriar en un recipiente con agua por 45 minutos.**

**Medir absorbancia a 510 nm.**

La medición de la concentración de glucosa producida por la reacción enzimática, se calculó en todas las muestras mediante el uso de la ecuación de la recta (punto 4.1.3 de Resultados) obtenida en la curva de calibración.

La medición de actividad total de celulasa, fue calculado con la siguiente fórmula:

$$U/g = \frac{\text{Concentración glucosa producida} \times \text{Volumen ensayo} \times \text{Factor dilución}}{\text{Volumen enzima} \times \text{Factor extracción} \times \text{Tiempo ensayo}}$$

Donde:

**U/g** = Unidades de actividad celulasa por gramo de sustrato sólido.

**Concentración glucosa producida** = Corresponde a los  $\mu$ moles de glucosa generados en 10 minutos por una disolución de enzima diluida.

**Volumen de ensayo** = 1,5 mL; para equiparar con el volumen en que se calculó la concentración del glucosa en la curva de calibración.

**Volumen de enzima** = 0,5 mL.

**Factor de extracción** = 0,2 g/mL, correspondiente a la relación de extracción con Tritón X - 100 estéril para obtener los extractos que contenían, en este caso celulasa (5 mL de Tritón X - 100 por cada 1 g de sustrato sólido).

**Tiempo ensayo** = 10 minutos.

**Factor dilución** = Calculado de acuerdo a la fórmula que se muestra en el punto 9.4 de Anexos.

Para obtener la actividad específica de celulasa se dividió el resultado de la fórmula para calcular la actividad total por los mg de proteína obtenidos del análisis de proteínas totales.

**Tabla 3. Preparación curva calibración ensayo actividad xilanasa.\***

<b>N° TUBO</b>	<b>Xilosa (mg/mL)</b>	<b>Volumen (mL) Xilosa (1 mg/mL)</b>	<b>Volumen (mL) H<sub>2</sub>O destilada</b>	<b>Volumen (mL) TCA 0,3 M</b>
1	0,75	1,13	0,37	2,0
2	0,50	0,75	0,75	2,0
3	0,30	0,45	1,05	2,0
4	0,20	0,30	1,20	2,0
5	0,10	0,15	1,35	2,0
Blanco	0,00	0,00	1,50	2,0

\* Después de agregar todos los reactivos descritos en esta tabla se agregan finalmente a cada tubo 3,50 mL del reactivo DNS y se proceden a hervir por 5 minutos y se dejan enfriar en un recipiente con agua por aproximadamente 45 minutos y se mide su absorbancia a 510 nm.

**Cuadro 3. Protocolo ensayo actividad xilanasa.**

**Agregar:**

- **1,0 mL de una disolución de Birchwood xilano al 0,5 % p/v en buffer citrato 0,05 M pH = 5,4**
- **0,5 mL de extracto enzimático (muestra diluida apropiadamente).**

**Incubar a 50°C por 10 minutos (se forma xilosa).**

**Agregar:**

- **2,0 mL de TCA 0,3 M (para detener la reacción).**
- **3,5 mL de reactivo DNS.**

**Hervir por 5 minutos y luego enfriar en un recipiente con agua por 45 minutos**

**Medir absorbancia a 510 nm.**



La medición de la concentración de xilosa producida por la reacción enzimática, se calculó en todas las muestras mediante el uso de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración (punto 4.1.4 de Resultados).

La medición de actividad total de xilanasa, fue calculado con la siguiente fórmula:

$$U/g = \frac{\text{Concentración glucosa producida} \times \text{Volumen ensayo} \times \text{Factor dilución}}{\text{Volumen enzima} \times \text{Factor extracción} \times \text{Tiempo ensayo}}$$

Donde:

**U/g** = Unidades de actividad xilanasa por gramo de sustrato sólido

**Concentración glucosa producida** = Corresponde a los  $\mu$ moles de xilosa generados en 10 minutos por una disolución de enzima diluida.

**Volumen de ensayo** = 1,5 mL; para equiparar con el volumen en que se calculó la concentración de xilosa en la curva de calibración.

**Volumen de enzima** = 0,5 mL.

**Factor de extracción** = 0,2 g/mL, correspondiente a la relación de extracción con Tritón X - 100 estéril para obtener los extractos que contenían, en este caso xilanasa (5 mL de Tritón X - 100 por cada 1 g de sustrato sólido).

**Tiempo ensayo** = 10 minutos.

**Factor dilución** = Calculado de acuerdo a la fórmula que se muestra en el punto 9.4 de Anexos.

Para obtener la actividad específica de xilanasa se dividió el resultado de la fórmula para calcular la actividad total por los mg de proteína obtenidos del análisis de proteínas totales.

**3.2.1.3.3 Proteasas.** Para determinar la actividad proteasa se usó el método descrito por Xu *et al.* (2000) modificado. Las reacciones enzimáticas se realizaron en triplicado, de acuerdo al protocolo que se muestra en el Cuadro 4. La preparación de los diversos reactivos usados en este ensayo se detallan en el Cuadro 9 del punto 9.3 de Anexos.

**Cuadro 4. Protocolo ensayo actividad proteasa.**

**Agregar:**

- **450  $\mu$ L de extracto enzimático (muestra diluida apropiadamente).**
- **50  $\mu$ L de una disolución de BSA (fracción V) al 1% p/v en buffer acetato 0,1 M pH = 4,0**

**Incubar a 37°C por 1 h.**

**Agregar:**

- **500  $\mu$ L de TCA al 10% (para detener la reacción).**

**Incubar a 0°C por 30 minutos.**

**Centrifugar a 6000 rpm por 5 minutos (para remover las proteínas precipitadas).**

**Medir absorbancia del sobrenadante a 280 nm.**

**En forma paralela se prepara una muestra control de forma idéntica a la muestra a analizar pero no se incuba a 37°C.**

En el tratamiento de los resultados, la medición de la absorbancia correspondiente a los residuos de aminoácidos aromáticos producto de la hidrólisis proteica se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Absorbancia Aá} = \text{Absorbancia muestra} - \text{Absorbancia control}$$

La medición de actividad proteasa fue calculada con la siguiente fórmula:

$$U/L = \frac{\text{Absorbancia Aá x Factor dilución}}{\text{Volumen total ensayo x Tiempo ensayo}}$$

Donde:

**U/L** = Unidades de actividad proteasa por litro de volumen total de ensayo. Definidas como el cambio de una unidad de absorbancia por hora a 280 nm por 1,0 mL de volumen total de ensayo.

**Volumen total ensayo** = 1,0 mL (0,001 L).

**Tiempo ensayo** = 1 h.

**Factor dilución** = Calculado de acuerdo a la fórmula que se muestra en el punto 9.4 de Anexos.

Para obtener la actividad específica neta de proteasa se cambia uno de los denominadores, en este caso el volumen total de ensayo por los mg de proteína neta obtenidos del análisis de proteínas totales.

**3.2.1.4 Determinación de proteínas totales.** Para ello se utilizó la técnica descrita por Lowry *et al.* (1951), que consta de dos etapas. La primera en que los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$  - proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

La segunda etapa es una reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin - Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. Uno de los constituyentes principales del reactivo de Folin - Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso al cual se le mide su absorbancia a 750 nm (Figura 5).

Las muestras para la confección de la curva de calibración se hicieron una vez y fueron preparadas de acuerdo a lo descrito en la Tabla 4. Las muestras para este y el resto de estudios donde se requería determinar proteínas totales se hicieron en triplicado, de acuerdo al protocolo que se muestra en el Cuadro 5. La preparación de los diversos reactivos usados para este ensayo se muestran en el Cuadro 10 del punto 9.3 de Anexos.

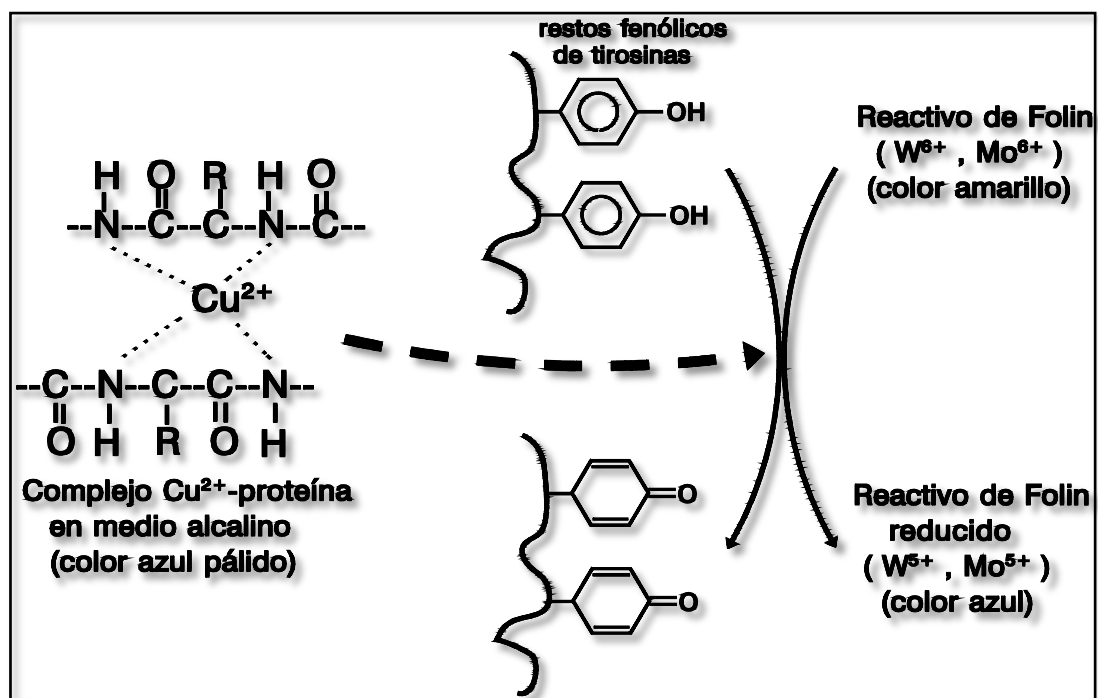


Figura 5. Reacción proteínas con el reactivo Folin - Ciocalteu.

Fuente: (Lowry *et al.*, 1951)

**Tabla 4. Preparación curva calibración determinación proteínas totales.\***

N° TUBO	Proteína (µg/mL)	Volumen (µL) BSA (1,2 mg/mL)	Volumen (mL) H <sub>2</sub> O destilada	Volumen (mL) Disolución C
1	120,00	60,00	0,54	3,0
2	100,00	50,00	0,55	3,0
3	80,00	40,00	0,56	3,0
4	60,00	30,00	0,57	3,0
5	40,00	20,00	0,58	3,0
6	20,00	10,00	0,59	3,0
Blanco	0,00	0,00	0,60	3,0

\* Después de agregar todos los reactivos descritos en esta tabla se espera por 10 minutos a temperatura ambiente (lugar oscuro) y luego de ello se agregan finalmente a cada tubo 0,3 mL del reactivo Folin - Ciocalteau y se espera por 30 minutos a temperatura ambiente (lugar oscuro) y luego se mide su absorbancia a 750 nm.

**Cuadro 5. Protocolo determinación proteínas totales.**

<p><b>Agregar:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>0,6 mL de extracto enzimático (muestra diluida apropiadamente).</b></li> <li>• <b>3,0 mL de disolución C.</b></li> </ul> <p><b>Esperar 10 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro.</b></p> <p><b>Agregar:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>0,3 mL de reactivo Folin - Ciocalteau.</b></li> </ul> <p><b>Esperar 30 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro.</b>  <b>Medir absorbancia a 750 nm.</b></p>
--

La medición de la concentración de proteínas totales, se calculó en todas las muestras mediante el uso de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración (punto 4.1.1 de Resultados).

### **3.2.2 Semipurificación y concentración de las enzimas fitasas, celulasas y xilanasas producidas por la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932 mediante SSF en torta de canola.**

**3.2.2.1 Preparación de inóculos.** Para ello nuevamente se preparó un stock de esporas de *A. ficuum* siguiendo los mismos pasos descritos en el punto 3.2.1.1 de Métodos. Luego se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de este nuevo stock ( $1,02 \times 10^7$  esporas/mL) y se inocularon en un matraz Erlenmeyer con medio de cultivo líquido que contenía glucosa y extracto de levaduras (150 mL) y se incubaron en una incubadora shaker a 25°C por 24 h y a 180 rpm para su desarrollo.

**3.2.2.2 Producción de las enzimas hidrolíticas.** Se tomaron alícuotas de las esporas brotadas de *A. ficuum* DSM 932 (35 mL) y se depositaron en 3 placas<sup>2</sup> que contenían 65 g de torta de canola más 3,3 g de sulfato de amonio c/u y se incubaron en una estufa a 25°C de acuerdo a los días en que se obtuvo la mayor actividad de fitasa, celulasa y xilanasas para torta de canola (véase los puntos 4.1.2, 4.1.3 y 4.1.4 de Resultados que hacen referencia al estudio de la cinética de producción). De esta forma se le asignó de forma arbitraria a cada placa, una de las enzimas.

Pasado el tiempo de incubación, el contenido de cada una de las placas fue dividido para obtener 2 porciones iguales (32,5 g), las cuales se colocaron respectivamente en matraces Erlenmeyer de 1 L (2 matraces por cada enzima) para proceder a las extracciones con 163 mL de Tritón X - 100 al 0,1% estéril c/u mediante agitación en un shaker a 25°C por 90 minutos a 200 rpm y luego se

---

<sup>2</sup> Placas de Petri de 15 cm de diámetro

procedió a centrifugar a 9.000 rpm por 10 minutos a 4°C para obtener los extractos crudos (sobrenadantes) que fueron posteriormente guardados en frascos estériles y refrigerados a 4°C.

**3.2.2.3 Determinación actividad fitasa, celulasa y xilanasa extractos crudos.** Para ello se usó la misma metodología empleada en los puntos 3.2.1.3.1 (fitasa) y 3.2.1.3.2 (celulasa y xilanasa).

**3.2.2.4 Determinación proteínas totales extractos crudos.** Se usó la misma metodología empleada en el punto 3.2.1.4.

**3.2.2.5 Microfiltración de extractos crudos de fitasa, celulasa y xilanasa.** Se hizo pasar los sobrenadantes del proceso de centrifugación (extracto crudo fitasa, celulasa y xilanasa) por una membrana Millipore de 0,45 µm estéril colocada en un embudo de microfiltración estéril acoplado a una bomba de vacío y posterior a ello a cada extracto se le determinó la actividad enzimática y cantidad de proteínas totales.

**3.2.2.6 Ultrafiltración de extractos microfiltrados de fitasa, celulasa y xilanasa.** El extracto microfiltrado de fitasa se hizo pasar por una membrana Millipore de 100 kDa de cut - off estéril colocada en una celda de ultrafiltración AMICON de 50 mL de capacidad también estéril. Luego de cada serie de ultrafiltraciones (3 veces en total) se procedió a diafiltrar el retenido de la tercera ultrafiltración con buffer acetato 0,2 M y pH = 5,15 (3 veces en total). Al final de cada serie de ultrafiltraciones y diafiltraciones se tomaron muestras a las que se les hizo análisis enzimático y determinación de proteínas totales.

El extracto microfiltrado de celulasa también se hizo pasar por una membrana Millipore de 100 kDa de cut-off estéril colocada en una celda de ultrafiltración de 50 mL de capacidad, también estéril e inmediatamente se ultrafiltró mediante tubos Centriplus con membranas de 50 kDa de cut-off (4 veces más 3 diafiltraciones) a 4500 rpm por 60 minutos a 4°C, luego por 30 kDa de cut-off (1 vez más 3 diafiltraciones) a 4500 rpm por 90 minutos a 4°C y finalmente por 10 kDa de cut-off (1 vez más 2 diafiltraciones) a 4500 rpm por 120 minutos a 4°C. De igual forma que para fitasa cada diafiltración se hizo con buffer acetato 0,2 M y pH = 5,15. Al final de cada serie de ultrafiltraciones y diafiltraciones en los tubos Centriplus se tomaron muestras a las que se les hizo análisis enzimático y de proteínas totales.

El extracto microfiltrado de xilanasa se hizo pasar por la misma membrana Millipore de 100 kDa de cut-off estéril colocada en una celda de ultrafiltración también estéril e inmediatamente se ultrafiltró mediante tubos Centriplus con membranas de 50 kDa de cut-off (4 veces más 3 diafiltraciones) a 4500 rpm por 60 minutos a 4°C, luego por 30 kDa de cut-off (1 vez más 3 diafiltraciones) a 4500 rpm por 90 minutos a 4°C y finalmente por 10 kDa de cut-off (1 vez más 2 diafiltraciones) a 4500 rpm por 120 minutos a 4°C. De igual forma que para celulasa cada diafiltración se hizo con buffer acetato 0,2 M y pH = 5,15. Al final de cada serie de ultrafiltraciones y diafiltraciones en los tubos Centriplus se tomaron muestras a las que se les hizo análisis enzimático y de proteínas totales.

### **3.2.3 Caracterización enzima fitasa, celulasa y xilanasa respecto al pH y temperatura.**

**3.2.3.1 Caracterización fitasa respecto al pH y temperatura.** Se usó el extracto correspondiente al tercer diafiltrado (D3) de la membrana de 100 kDa. Para determinar el pH óptimo de la enzima se utilizó el protocolo descrito por Howson y Davis (1983) modificado. Las



reacciones se hicieron a temperatura de trabajo constante (55°C) y la escala de pH's usada fue de 2,0 a 7,5, con intervalos de 0,5 unidades. Los tampones usados para preparar las diluciones de la enzima y para la disolución de su sustrato (ácido fítico) fueron buffer Sorensen glicina I (glicina - HCl 0,1 M) (rango pH 2,0 - 3,5), buffer acetato 0,2 M (rango pH 4,0 - 5,5) y buffer Sorensen citrato II (rango pH 6,0 - 7,5).

Para determinar la temperatura óptima también se utilizó el método descrito por Howson y Davis (1983) modificado. Las reacciones se hicieron a pH de trabajo constante (pH = 5,15) y la escala de temperaturas usada fue de 30°C a 80 °C, con intervalos de 5°C.

Para ambos parámetros se usó el ensayo enzimático para determinar actividad fitasa detallado en el Cuadro 1 en Materiales y Métodos.

**3.2.3.2 Caracterización celulasa respecto al pH y temperatura.** Se usó el extracto correspondiente al cuarto ultrafiltrado (retenido y filtrado; R3 y F3 respectivamente) de la membrana de 50 kDa. Para determinar el pH óptimo de la enzima se utilizó el protocolo descrito por Yamamoto *et al.* (1995) modificado. Las reacciones se hicieron a temperatura de trabajo constante (50°C) y la escala de pH's usados fue de 3,0 a 11,0, con intervalos de 1,0 unidad. El buffer de trabajo usado para preparar las diluciones de la enzima y para la disolución de su sustrato (carboximetilcelulosa) fue glicina - NaOH 0,05 M (rango pH 9,0 - 11,0) y se equilibró con los siguientes buffers para alcanzar los restantes pH's deseados: buffer citrato (para obtener un rango de pH 3,0 - 6,0) y buffer fosfato (para obtener un rango de pH 7,0 - 8,0).

Para determinar la temperatura óptima también se utilizó el método descrito por Yamamoto *et al.* (1995) modificado. Las reacciones se hicieron a pH de trabajo constante (9,0) y la escala de temperaturas usada fue de 45°C a 75 °C, con intervalos de 5°C.

Para ambos parámetros se usó el ensayo enzimático para determinar actividad celulasa, cuyo protocolo se muestra en el Cuadro 2 de Materiales y Métodos.

**3.2.3.3 Caracterización xilanasa respecto al pH y temperatura.** Se usó el extracto correspondiente al cuarto ultrafiltrado (retenido y filtrado; R3 y F3 respectivamente) de la membrana de 50 kDa. Para determinar el pH óptimo de la enzima se utilizó el protocolo descrito por Zhaoxin *et al.* (2008) modificado. Las reacciones se hicieron a temperatura de trabajo constante (50°C) y la escala de pH's usados fue de 3,0 a 7,0, con intervalos de 0,5 unidades. Para preparar las diluciones de la enzima y la disolución de su sustrato (Birchwood xilano) se usaron diversas disoluciones de buffer citrato 0,05 M que tenían los pH deseados.

Para determinar la temperatura óptima también se utilizó el método descrito por Zhaoxin *et al.* (2008) modificado. Las reacciones se hicieron a pH de trabajo constante (5,4) y la escala de temperaturas usada fue de 45°C a 75 °C, con intervalos de 5°C.

Para ambos parámetros se usó el ensayo enzimático para determinar actividad xilanasa, cuyo protocolo se encuentra detallado en el Cuadro 3 en Materiales y Métodos.

## 4. RESULTADOS

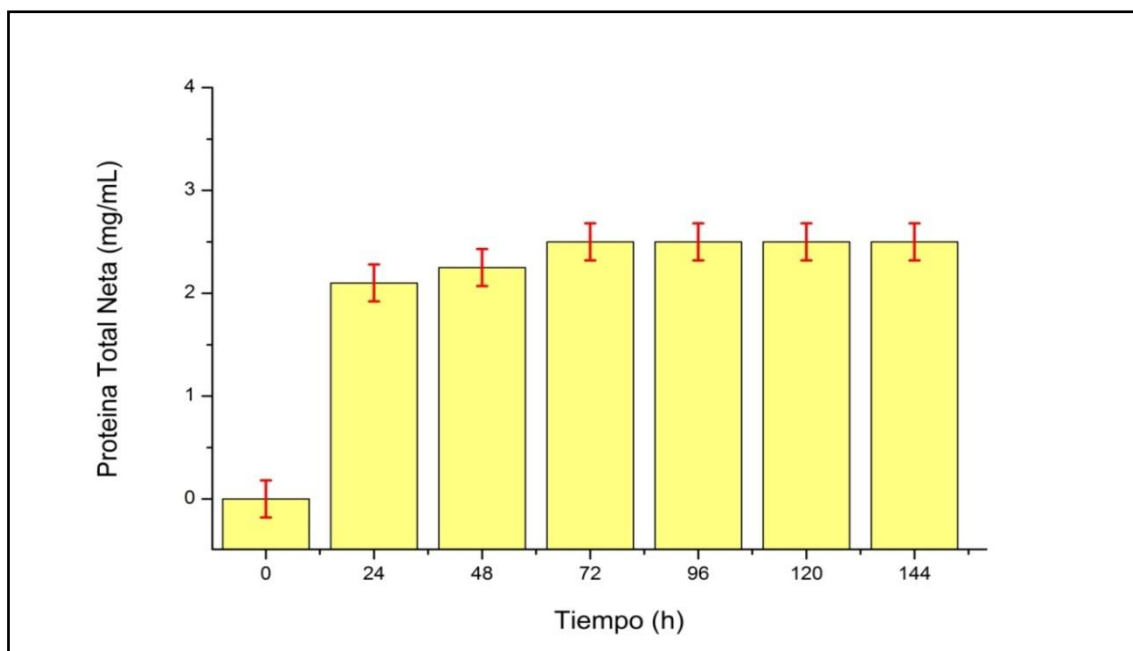
**4.1 Producción de las enzimas fitasas, xilanasas, celulasas y proteasas de la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932 mediante SSF en torta de canola y pomaza de cranberry.** Luego de obtener los extractos crudos y realizar los respectivos análisis enzimáticos se obtuvieron los siguientes resultados:

**4.1.1 Proteínas totales.** Del análisis llevado a cabo para la confección de la curva de calibración (Tabla 14 y Figura 31 respectivamente en el punto 9.1.1 de Anexos) se obtuvo lo siguiente:

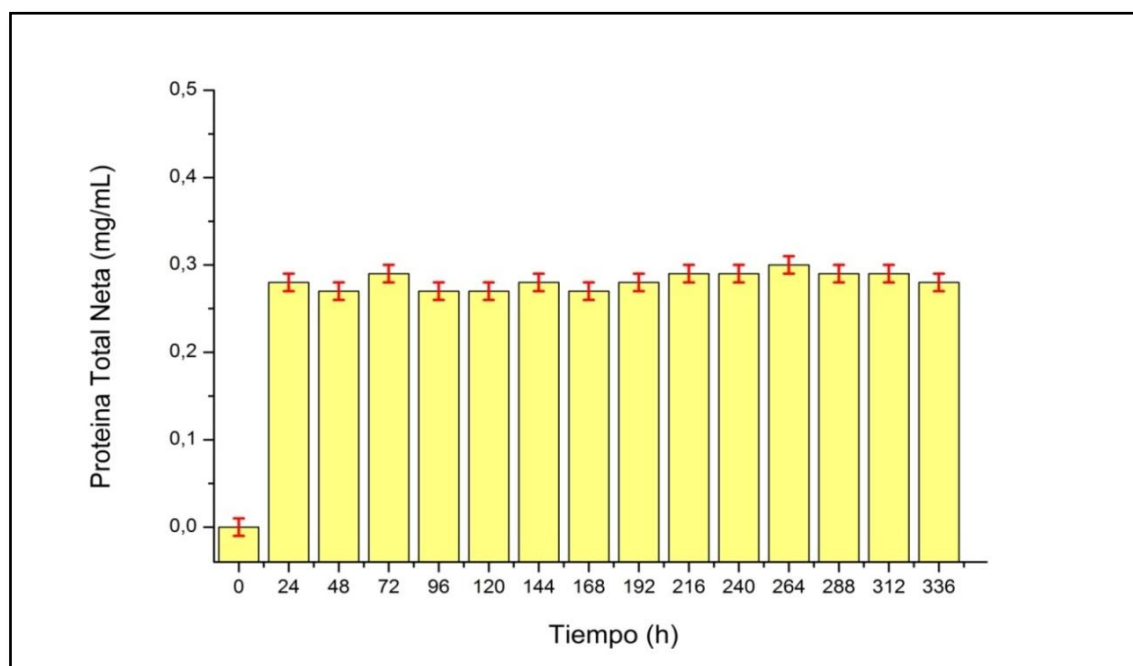
<p><b><math>R^2 = 0,9883</math></b></p> <p><b>Ecuación de la curva (reordenada):</b></p> $\mu\text{g/ml proteína total} = \frac{A_{750} - 0,0116}{0,004}$
---

La ecuación de la curva obtenida se usó para todos los cálculos de determinación de proteínas totales en los diferentes análisis realizados en esta tesis.

Las tablas correspondientes a la determinación de proteínas totales, tanto en torta de canola (Tabla 15) como en pomaza de cranberry (Tabla 16) se encuentran detalladas en el punto 9.1.1 de Anexos.



**Figura 6. Producción en el tiempo de proteínas totales en torta canola (extractos crudos).**



**Figura 7. Producción en el tiempo de proteínas totales en pomaza cranberry (extractos crudos).**

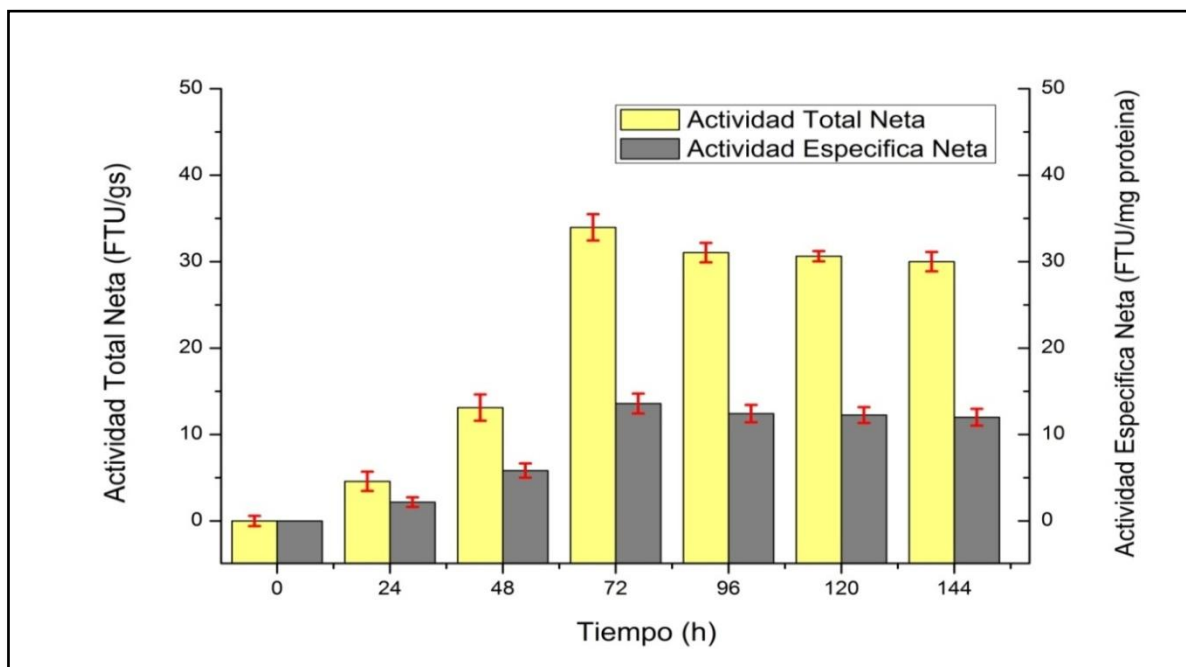
**4.1.2 Fitasas.** Del análisis llevado a cabo para la confección de la curva de calibración (Tabla 17 y Figura 32 respectivamente en el punto 9.1.2 de Anexos) se obtuvo lo siguiente:

$$R^2 = 0,9976$$

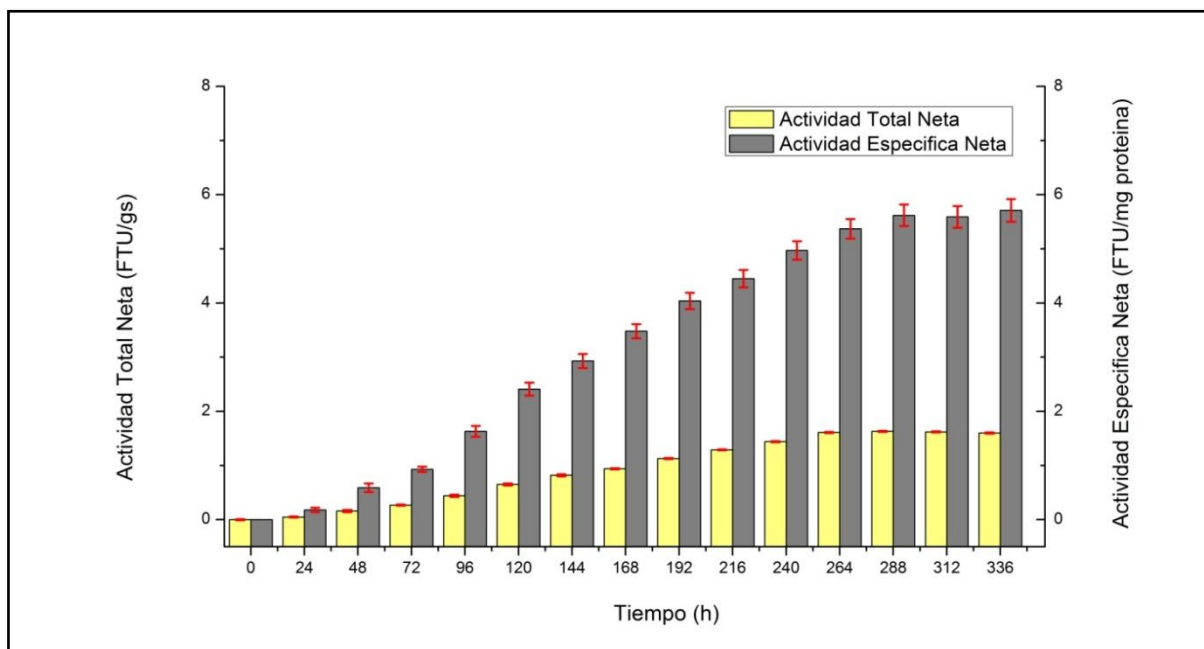
**Ecuación de la curva (reordenada):**

$$\mu\text{mol/ml Pi} = \frac{A_{660} - 0,0181}{1,2657}$$

Las tablas correspondientes a la evolución de la actividad total neta y específica neta de fitasa, tanto en torta de canola (Tabla 18) como en pomaza de cranberry (Tabla 19) se encuentran detalladas en el punto 9.1.2 de Anexos.



**Figura 8. Evolución de la actividad total y específica neta de fitasa en torta canola durante 6 días (extractos crudos).** Cabe señalar que gs = gramos sustrato.



**Figura 9. Evolución de la actividad total y específica neta de fitasa en pomaza cranberry durante 14 días (extractos crudos).** Cabe señalar que gs = gramos sustrato.

**4.1.3 Celulasas.** Del análisis llevado a cabo para la confección de la curva de calibración (Tabla 20 y Figura 33, respectivamente en el punto 9.1.3 de Anexos) se obtuvo lo siguiente:

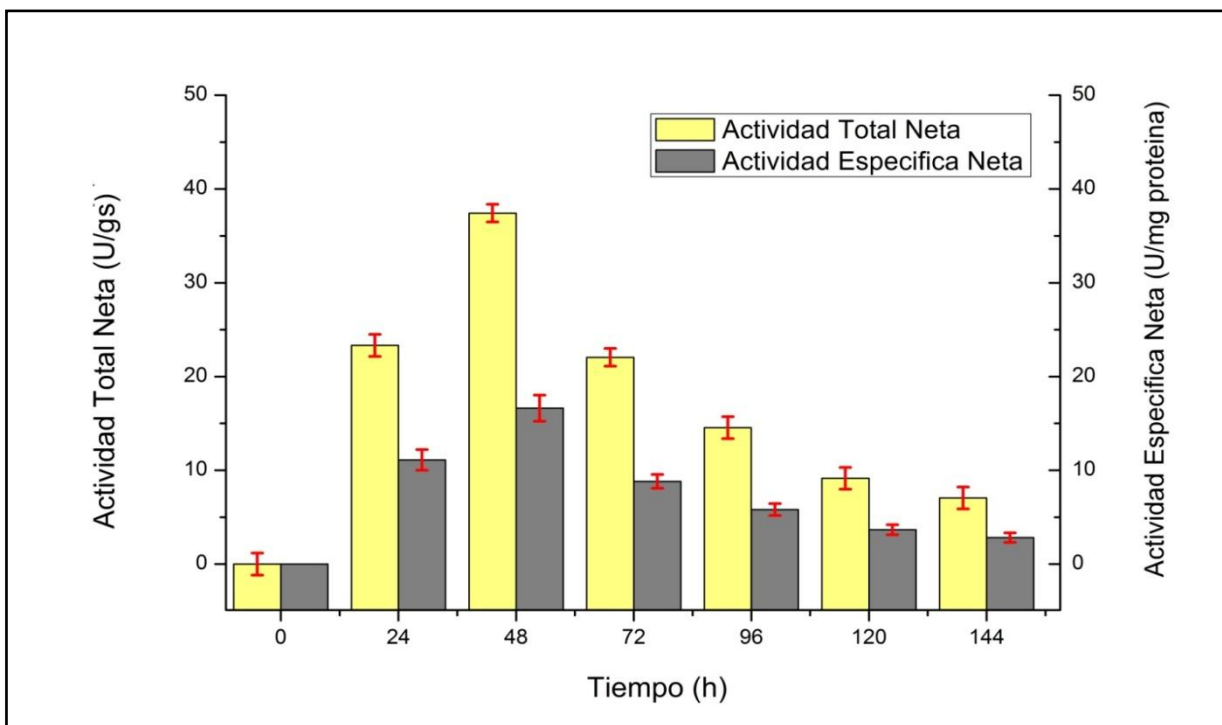
$$R^2 = 0,9994$$

**Ecuación de la curva (reordenada):**

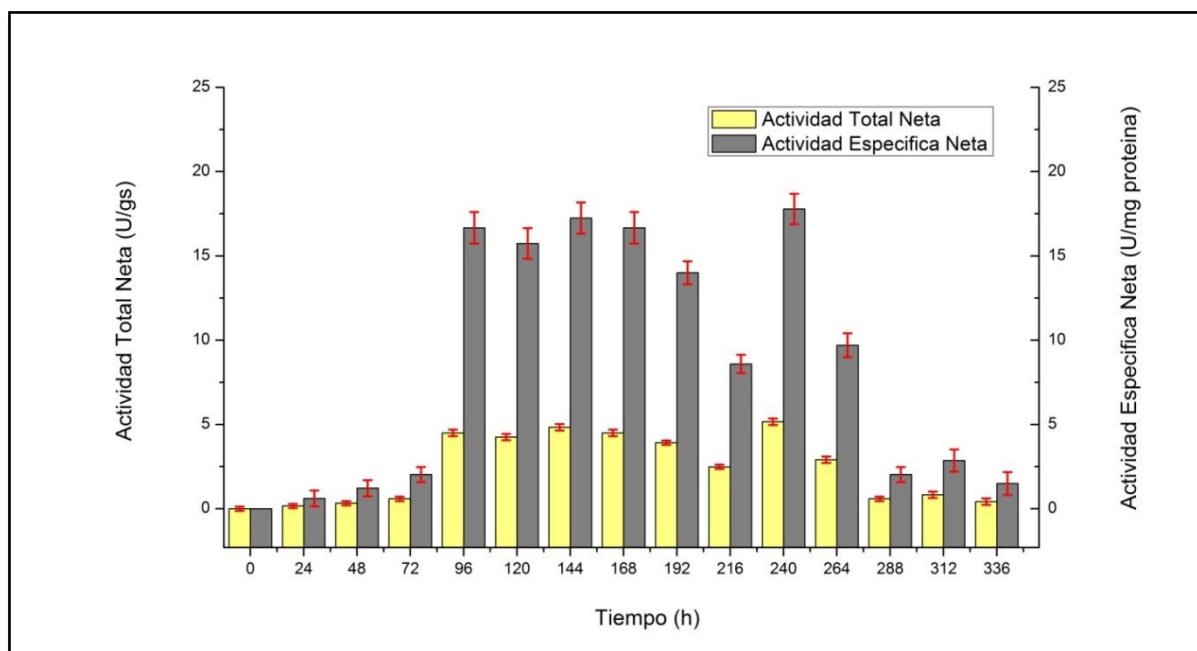
$$\text{mg/ml glucosa} = \frac{A_{510} - 0,006}{1,1162}$$

La ecuación de la curva obtenida se usó para todos los cálculos de determinación de actividad celulasa en los diferentes análisis realizados en esta tesis.

Las tablas correspondientes a la evolución de la actividad total neta y específica neta de celulasa, tanto en torta de canola (Tabla 21) como en pomaza de cranberry (Tabla 22) se encuentran detalladas en el punto 9.1.3 de Anexos.



**Figura 10. Evolución de la actividad total y específica neta de celulasa en torta canola durante 6 días (extractos crudos).** Cabe señalar que gs = gramos sustrato.



**Figura 11. Evolución de la actividad total y específica neta de celulasa en pomaza cranberry durante 14 días (extractos crudos). Cabe señalar que gs = gramos sustrato.**

**4.1.4 Xilanasas.** Del análisis llevado a cabo para la confección de la curva de calibración (Tabla 23 y Figura 34 respectivamente en el punto 9.1.4 de Anexos) se obtuvo lo siguiente:

$$R^2 = 0,999$$

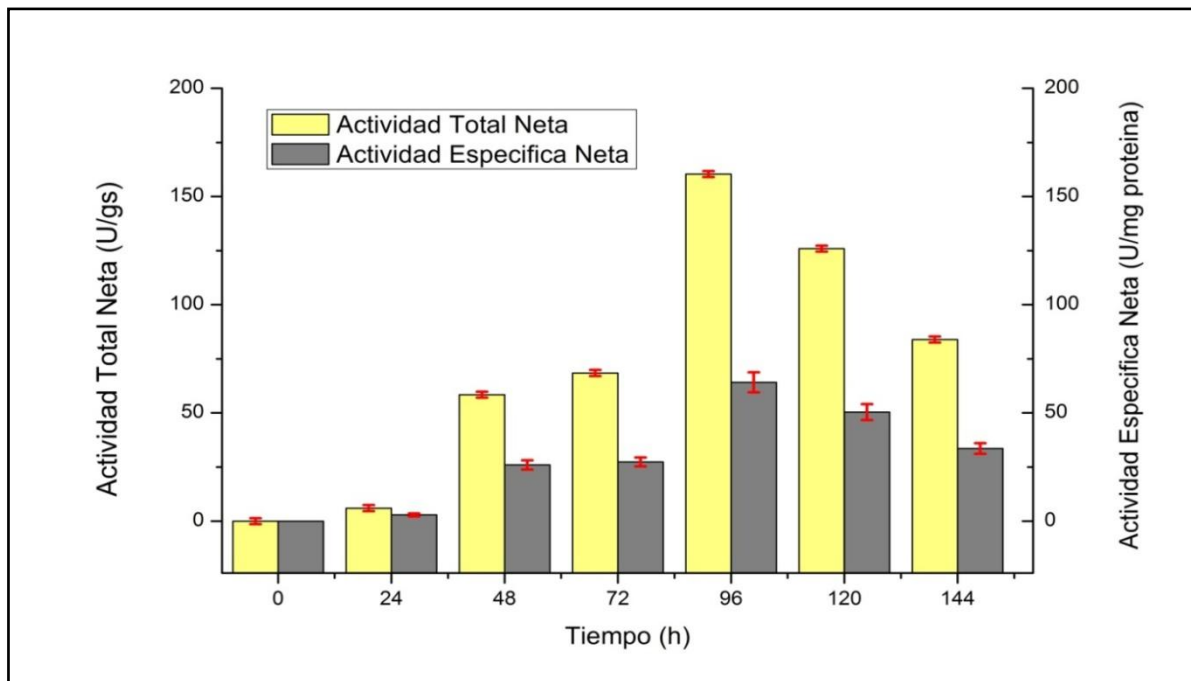
**Ecuación de la curva (reordenada):**

$$\text{mg/ml xilosa} = \frac{A_{510} - 0,0033}{1,2378}$$

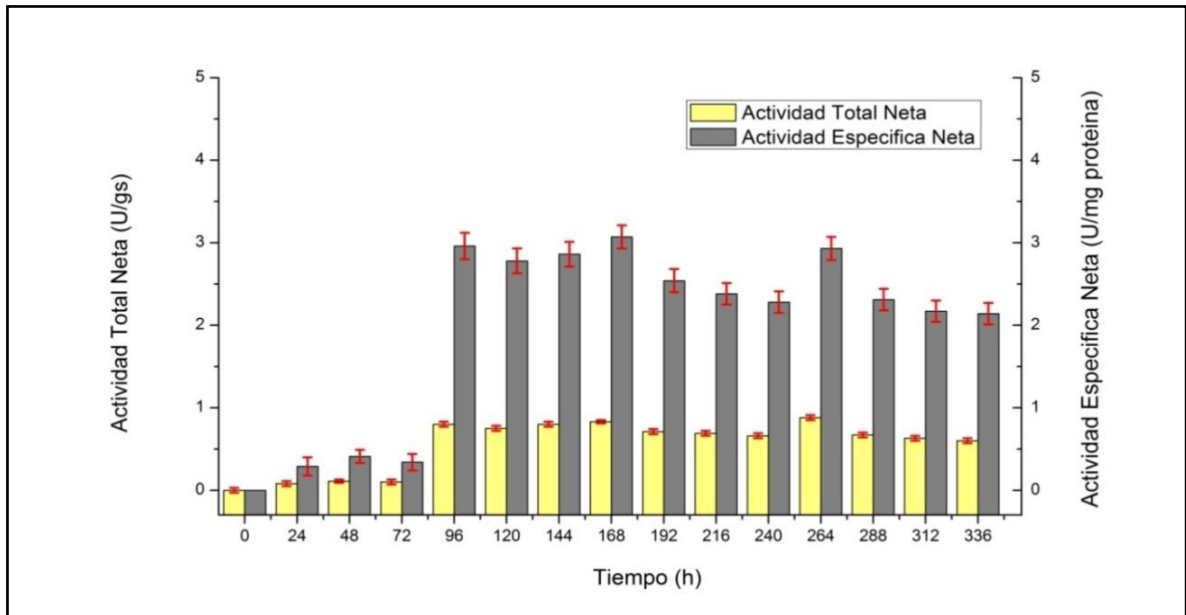
La ecuación de la curva obtenida se usó para todos los cálculos de determinación de actividad celulasa en los diferentes análisis realizados en esta tesis.



Las tablas correspondientes a la evolución de la actividad total neta y específica neta de xilanasa, tanto en torta de canola (Tabla 24) como en pomaza de cranberry (Tabla 25) se encuentran detalladas en el punto 9.1.4 de Anexos.



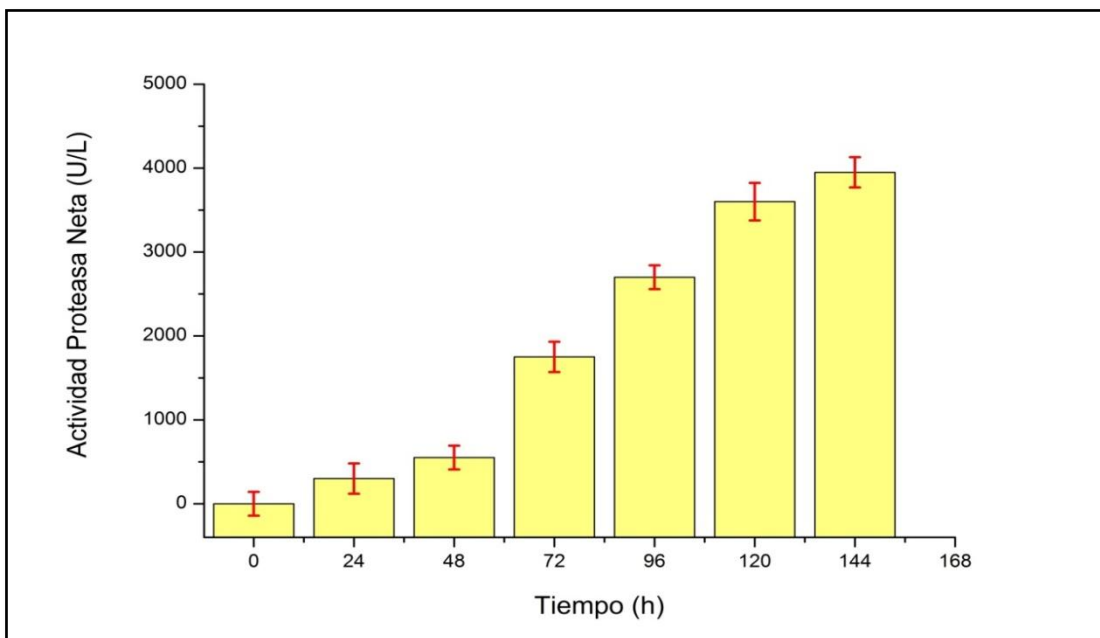
**Figura 12. Evolución de la actividad total y específica neta de xilanasa en torta canola durante 6 días (extractos crudos).** Cabe señalar que gs = gramos sustrato.



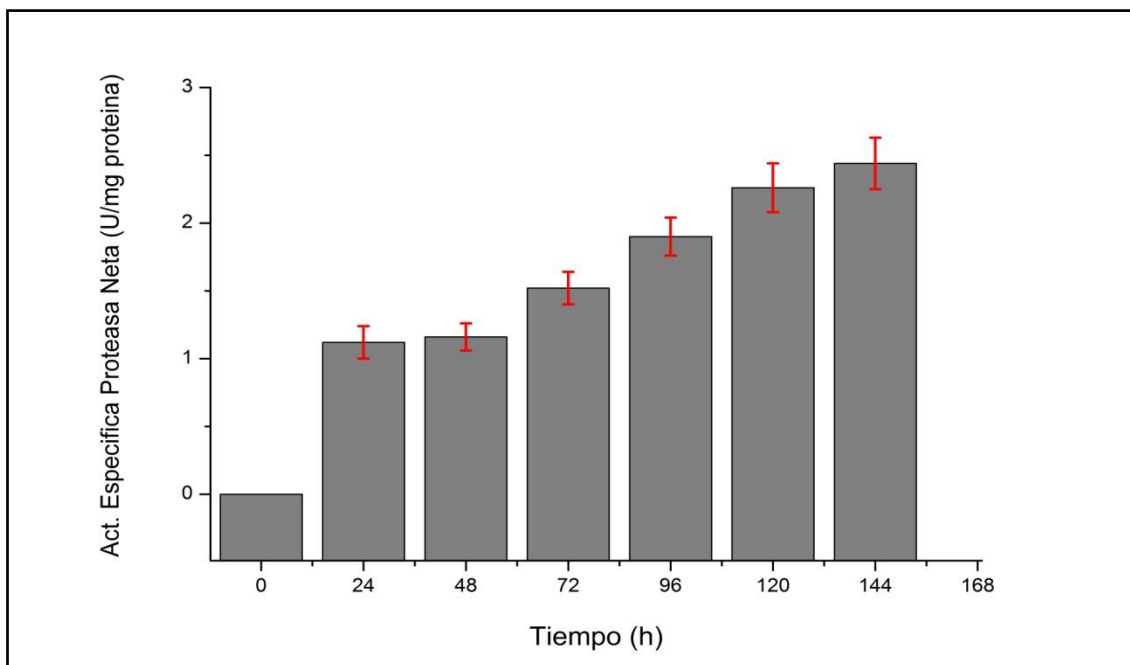
**Figura 13. Evolución de la actividad total y específica neta de xilanasa en pomaza cranberry durante 14 días (extractos crudos). Cabe señalar que gs = gramos sustrato.**

**4.1.5 Proteasas.** Del análisis llevado a cabo para la determinación de la actividad proteásica se obtuvo lo siguiente:

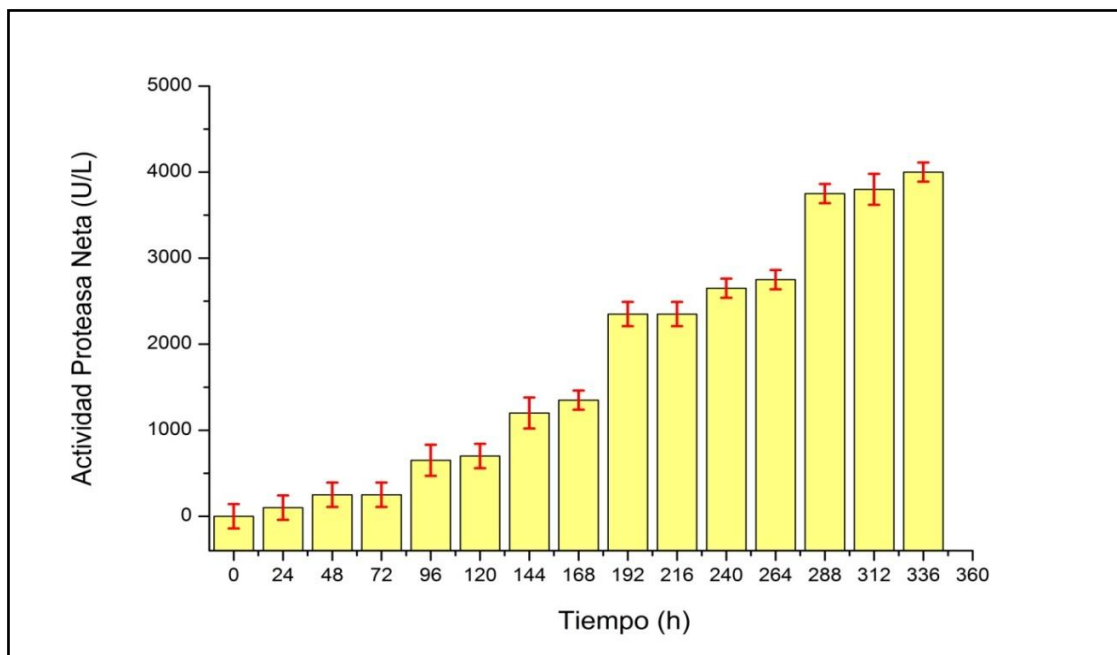
Cabe aclarar que las tablas correspondientes a la evolución de la actividad total neta y específica neta de proteasa, tanto en torta de canola (Tablas 26 y 27 respectivamente) como en pomaza de cranberry (Tablas 28 y 29 respectivamente) se encuentran detalladas en el punto 9.1.5 de Anexos.



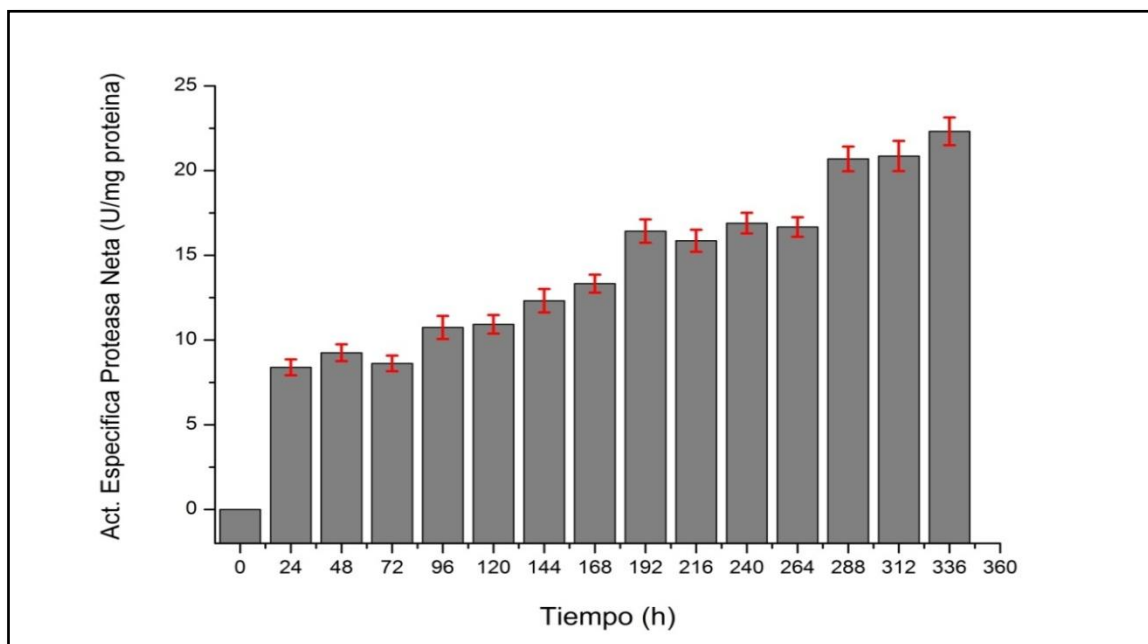
**Figura 14. Evolución de la actividad total neta de proteasa en torta de canola durante 6 días (extractos crudos).**



**Figura 15. Evolución de la actividad específica neta de proteasa en torta de canola durante 6 días (extractos crudos).**



**Figura 16. Evolución de la actividad total neta de proteasa en pomaza de cranberry durante 14 días (extractos crudos).**



**Figura 17. Evolución de la actividad específica neta de proteasa en pomaza de cranberry durante 14 días (extractos crudos).**

**4.2 Semipurificación y concentración de las enzimas fitasas, celulasas y xilanasas producidas por la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932 mediante SSF en torta de canola.** Los extractos crudos obtenidos y que fueron semipurificados entregaron para cada enzima los siguientes resultados:

#### 4.2.1 Extractos crudos (EC).

**Tabla 5. Actividad total y específica enzimas fitasa, celulasa y xilanasas en torta canola (EC).\***

<b>Enzimas</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Total (FTU/g sustrato)</b>	<b>Proteína Total (mg/mL)</b>	<b>Actividad Específica (FTU/mg proteína)</b>
Fitasa	72	28,13 ± 2,08	4,99 ± 0,06	5,64 ± 0,42
<b>Enzimas</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Total (U/g sustrato)</b>	<b>Proteína Total (mg/mL)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg proteína)</b>
Celulasa	48	46,65 ± 1,28	4,99 ± 0,06	9,35 ± 0,28
Xilanasas	96	155,85 ± 0,98	4,99 ± 0,06	31,23 ± 0,42

\* Dilución muestras fitasa (1:500); Dilución muestras celulasa, xilanasas y proteínas (1:50).

#### 4.2.2 Microfiltración (MF).

**Tabla 6. Actividad total y específica enzimas fitasa, celulasa y xilanasas en torta canola (MF).\***

<b>Enzimas</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Total (FTU/g sustrato)</b>	<b>Proteína Total (mg/mL)</b>	<b>Actividad Específica (FTU/mg proteína)</b>
Fitasa	72	22,71 ± 0,83	3,81 ± 0,05	5,96 ± 0,23
<b>Enzimas</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Total (U/g sustrato)</b>	<b>Proteína Total (mg/mL)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg proteína)</b>
Celulasa	48	45,83 ± 1,65	3,81 ± 0,05	12,03 ± 0,46
Xilanasas	96	119,93 ± 0,98	3,81 ± 0,05	31,48 ± 0,49

\* Dilución muestras fitasa (1:500); Dilución muestras celulasa, xilanasas y proteínas (1:50).

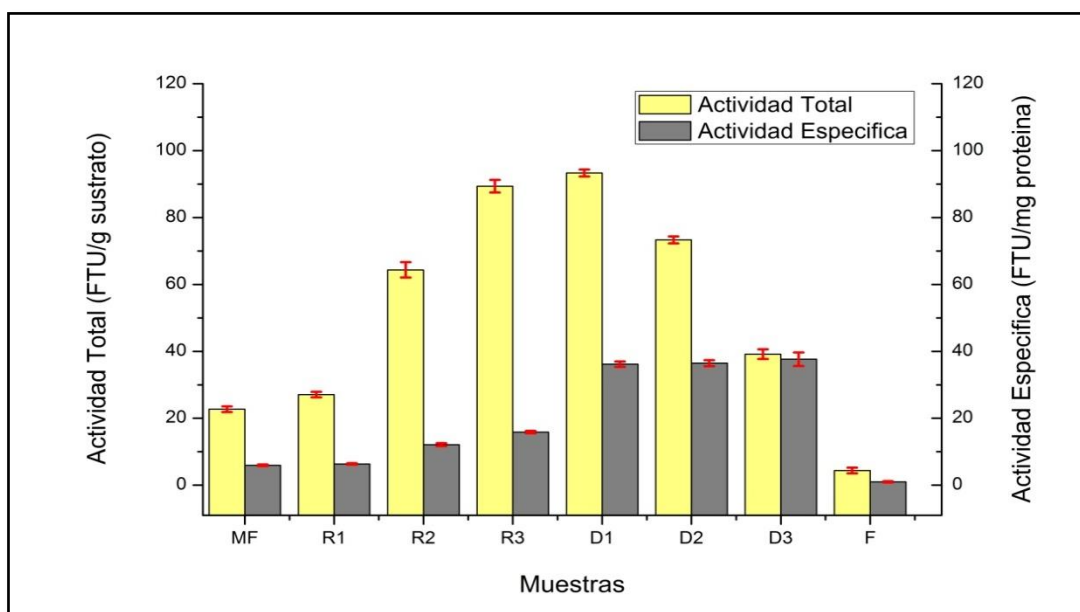
### 4.2.3 Ultrafiltración - diafiltración (UF - DF).

#### 4.2.3.1 Ultrafiltración - diafiltración de extractos fitasa.

**Tabla 7. Proceso de UF - DF de extractos fitasa a través de membranas de 100 kDa.\***

Muestras	Actividad Total (FTU/g sustrato)	Proteína Total (mg/mL)	Actividad Específica (FTU/mg proteína)
MF	22,71 ± 0,83	3,81 ± 0,05	5,96 ± 0,23
R1	27,08 ± 0,83	4,28 ± 0,05	6,33 ± 0,21
R2	64,38 ± 2,29	5,31 ± 0,05	12,12 ± 0,45
R3	89,38 ± 1,88	5,63 ± 0,03	15,88 ± 0,34
D1	93,33 ± 1,04	2,58 ± 0,05	36,17 ± 0,81
D2	73,33 ± 1,04	2,01 ± 0,04	36,48 ± 0,89
D3	39,17 ± 1,46	1,04 ± 0,04	37,66 ± 2,02
F	4,38 ± 0,83	4,40 ± 0,04	1,00 ± 0,19

\* Dilución muestras fitasa (1:500); Dilución muestras proteínas (1:50); MF = microfiltrado, R = retenido, D = diafiltrado, F = filtrado.



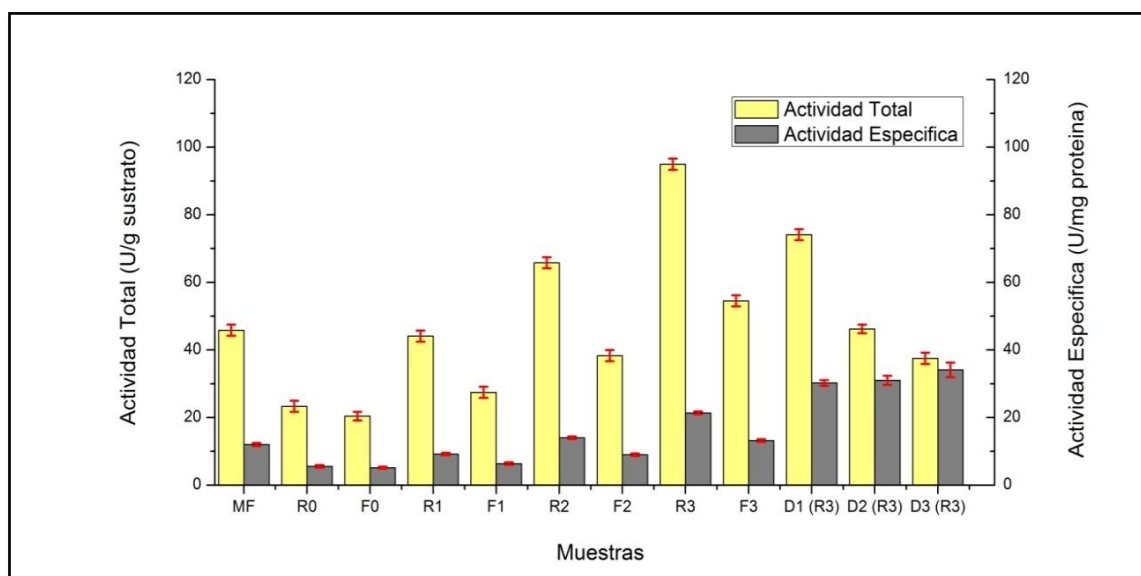
**Figura 18. UF y DF de extractos fitasa a través de membranas de 100 kDa.**

#### 4.2.3.2 Ultrafiltración - diafiltración de extractos celulasa.

**Tabla 8. Proceso de UF - DF de extractos celulasa a través de Centriplus de 50 kDa.\***

Muestras	Actividad Total (U/g sustrato)	Proteína Total (mg/mL)	Actividad Específica (U/mg proteína)
MF	45,83 ± 1,65	3,81 ± 0,05	12,03 ± 0,46
R0	23,33 ± 1,65	4,20 ± 0,04	5,55 ± 0,40
F0	20,40 ± 1,28	3,98 ± 0,04	5,13 ± 0,33
R1	44,10 ± 1,65	4,79 ± 0,03	9,21 ± 0,35
F1	27,45 ± 1,65	4,30 ± 0,06	6,38 ± 0,39
R2	65,78 ± 1,65	4,70 ± 0,04	14,00 ± 0,37
F2	38,33 ± 1,65	4,26 ± 0,03	9,00 ± 0,39
R3	94,95 ± 1,65	4,45 ± 0,05	21,34 ± 0,44
F3	54,53 ± 1,65	4,14 ± 0,03	13,17 ± 0,41
D1 (R3)	74,10 ± 1,65	2,45 ± 0,04	30,24 ± 0,83
D2 (R3)	46,20 ± 1,28	1,49 ± 0,05	31,01 ± 1,35
D3 (R3)	37,50 ± 1,65	1,10 ± 0,05	34,09 ± 2,16

\* Dilución muestras celulasa y proteínas (1:50); MF = microfiltrado, R = retenido, D = diafiltrado, F = filtrado; La muestra F3 se usó en la siguiente etapa de UF.



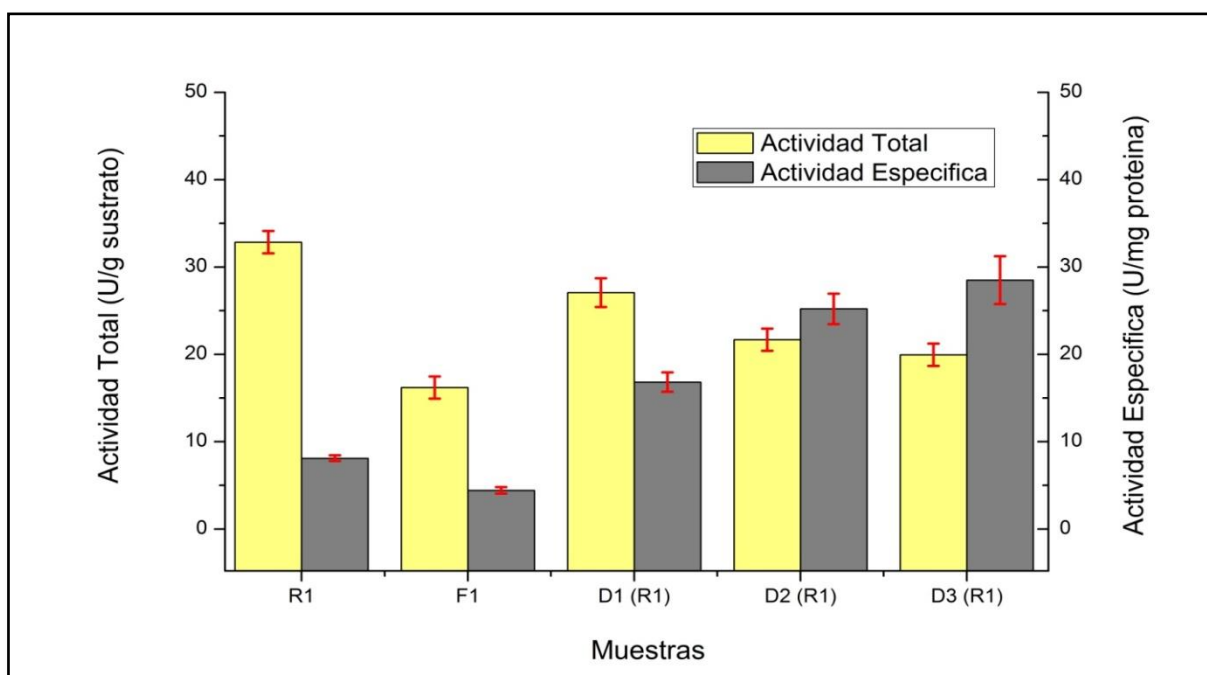
**Figura 19. UF y DF de extractos celulasa a través de Centriplus de 50 kDa.**

**Tabla 9. Proceso de UF - DF de extractos celulasa a través de Centriplus de 30 kDa.\***

Muestras	Actividad Total (U/g sustrato)	Proteína Total (mg/mL)	Actividad Específica (U/mg proteína)
R1	32,85 ± 1,28	4,05 ± 0,05	8,11 ± 0,33
F1	16,20 ± 1,28	3,66 ± 0,05	4,43 ± 0,36
D1 (R1)	27,08 ± 1,65	1,61 ± 0,04	16,82 ± 1,11
D2 (R1)	21,68 ± 1,28	0,86 ± 0,03	25,21 ± 1,73
D3 (R1)	19,95 ± 1,28	0,70 ± 0,05	28,50 ± 2,74

\* R = retenido, D = diafiltrado, F = filtrado; Dilución muestras celulasa y proteínas (1:50);

La muestra F1 se usó en la siguiente etapa de UF.



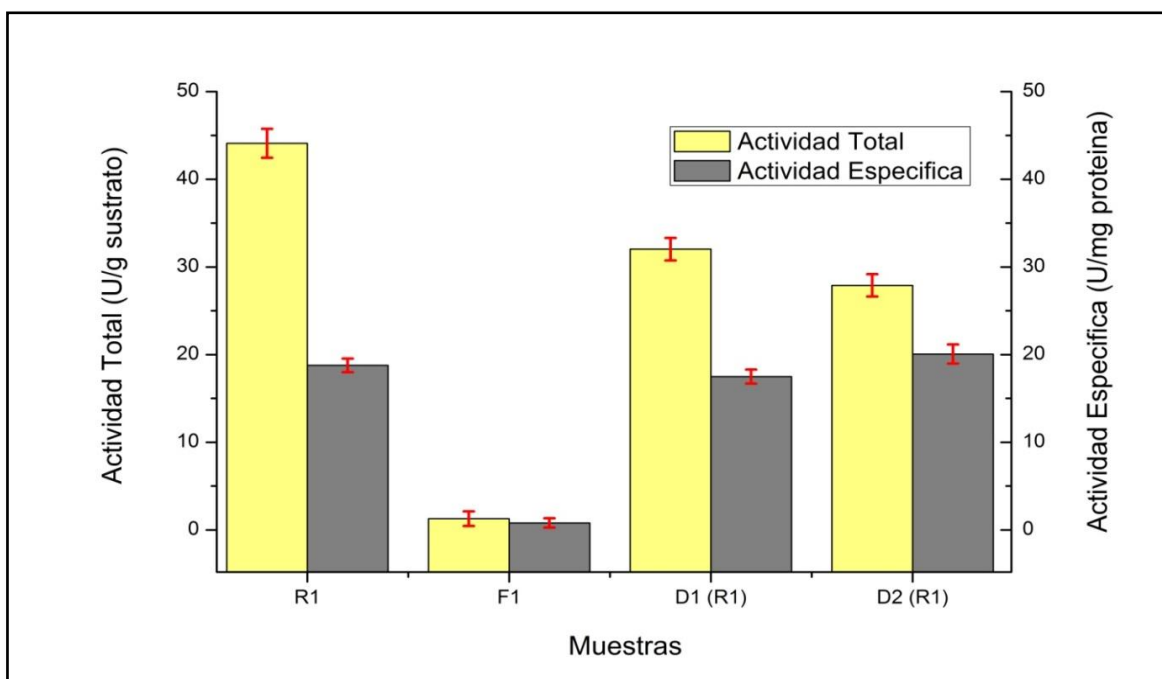
**Figura 20. UF y DF de extractos celulasa a través de Centriplus de 30 kDa.**



**Tabla 10. Proceso de UF - DF de extractos celulasa a través de Centriplus de 10 kDa.\***

<b>Muestras</b>	<b>Actividad Total (U/g sustrato)</b>	<b>Proteína Total (mg/mL)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg proteína)</b>
R1	44,10 ± 1,65	2,35 ± 0,04	18,77 ± 0,77
F1	1,28 ± 0,83	1,59 ± 0,04	0,81 ± 0,53
D1 (R1)	32,03 ± 1,28	1,83 ± 0,04	17,50 ± 0,80
D2 (R1)	27,90 ± 1,28	1,39 ± 0,04	20,07 ± 1,09

\* Dilución muestras celulasa y proteínas (1:50); R = retenido, D = diafiltrado, F = filtrado.



**Figura 21. UF y DF de extractos celulasa a través de Centriplus de 10 kDa.**

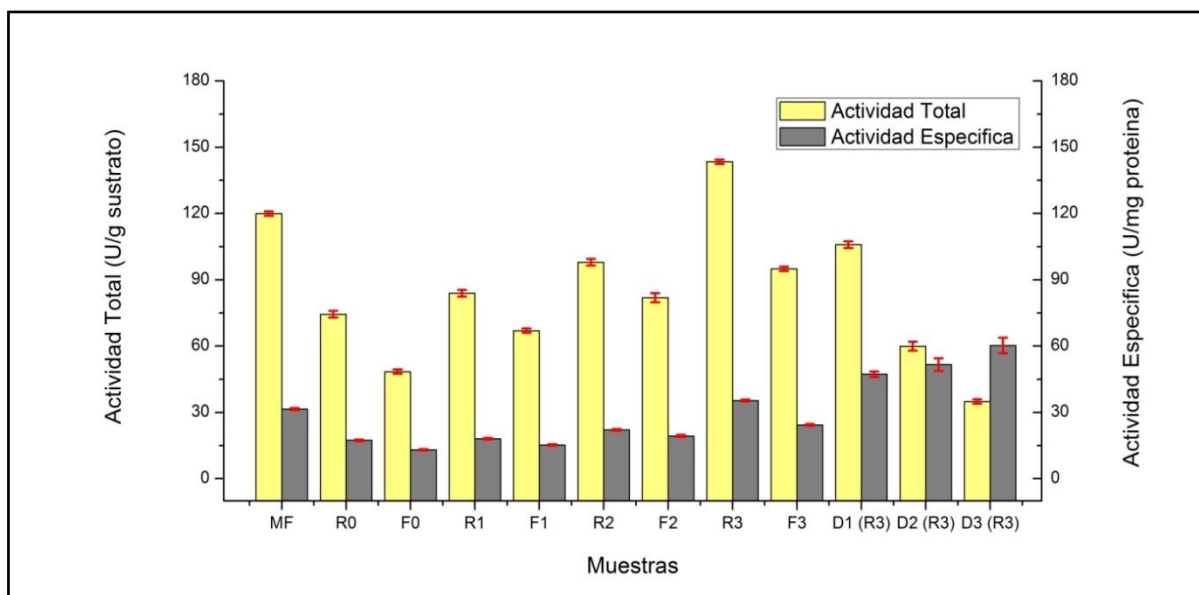
#### 4.2.3.3 Ultrafiltración - diafiltración de extractos xilanasa.

**Tabla 11. Proceso de UF - DF de extractos xilanasa a través de Centriplus de 50 kDa.\***

Muestras	Actividad Total (U/g sustrato)	Proteína Total (mg/mL)	Actividad Específica (U/ mg proteína)
MF	119,93 ± 0,98	3,81 ± 0,05	31,48 ± 0,49
R0	74,40 ± 1,50	4,28 ± 0,03	17,38 ± 0,37
F0	48,45 ± 0,98	3,71 ± 0,04	13,06 ± 0,30
R1	83,93 ± 1,50	4,65 ± 0,04	18,05 ± 0,36
F1	66,98 ± 0,98	4,38 ± 0,05	15,29 ± 0,28
R2	97,95 ± 1,50	4,43 ± 0,04	22,11 ± 0,39
F2	81,90 ± 2,03	4,23 ± 0,04	19,36 ± 0,51
R3	143,40 ± 0,98	4,06 ± 0,04	35,32 ± 0,42
F3	94,95 ± 0,98	3,90 ± 0,05	24,35 ± 0,40
D1 (R3)	105,90 ± 1,50	2,24 ± 0,05	47,28 ± 1,25
D2 (R3)	59,93 ± 2,03	1,16 ± 0,05	51,66 ± 2,83
D3 (R3)	34,95 ± 0,98	0,58 ± 0,03	60,26 ± 3,55

\* Dilución muestras xilanasa y proteínas (1:50); R = retenido, D = diafiltrado, F = filtrado.

La muestra F3 se usó en la siguiente etapa de UF.



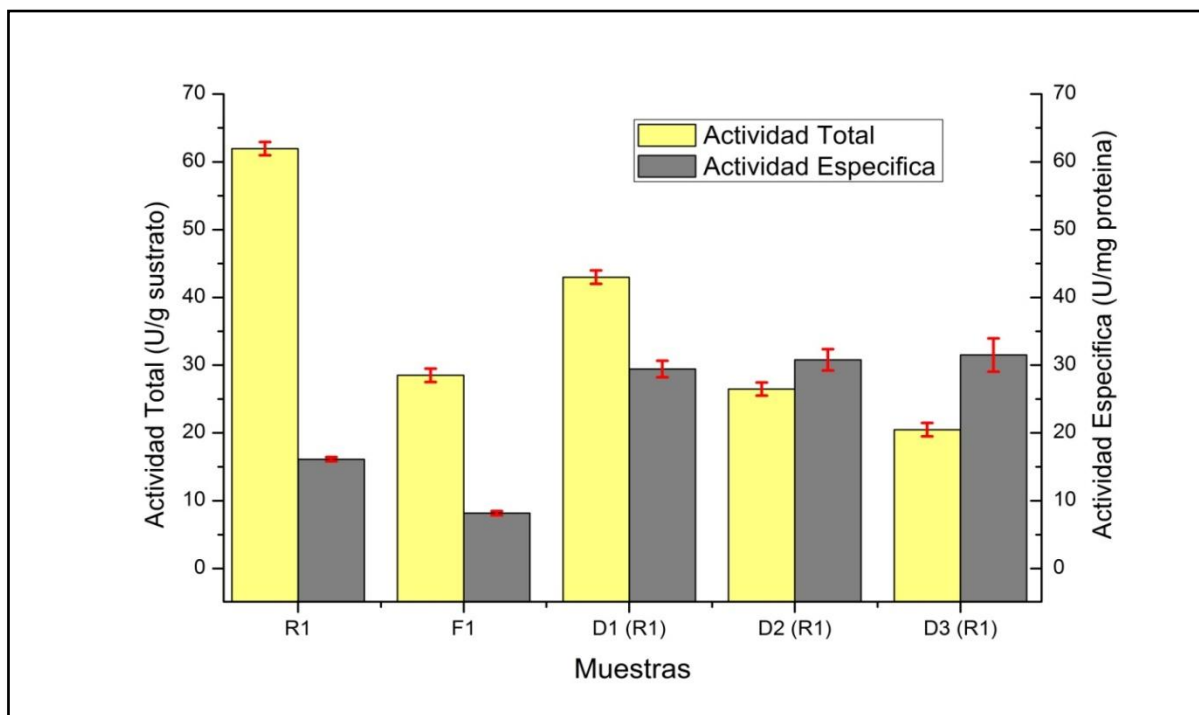
**Figura 22. UF y DF de extractos xilanasa a través de Centriplus de 50 kDa.**

**Tabla 12. Proceso de UF - DF de extractos xilanasa a través de Centriplus de 30 kDa.\***

Muestras	Actividad Total (U/g sustrato)	Proteína Total (mg/mL)	Actividad Específica (U/ mg proteína)
R1	61,95 ± 0,98	3,84 ± 0,04	16,13 ± 0,31
F1	28,50 ± 0,98	3,49 ± 0,04	8,17 ± 0,30
D1 (R1)	42,98 ± 0,98	1,46 ± 0,05	29,44 ± 1,21
D2 (R1)	26,48 ± 0,98	0,86 ± 0,03	30,79 ± 1,57
D3 (R1)	20,48 ± 0,98	0,65 ± 0,04	31,51 ± 2,46

\* Dilución muestras xilanasa y proteínas (1:50); R = retenido, D = diafiltrado, F = filtrado.

La muestra F1 se usó en la siguiente etapa de UF.

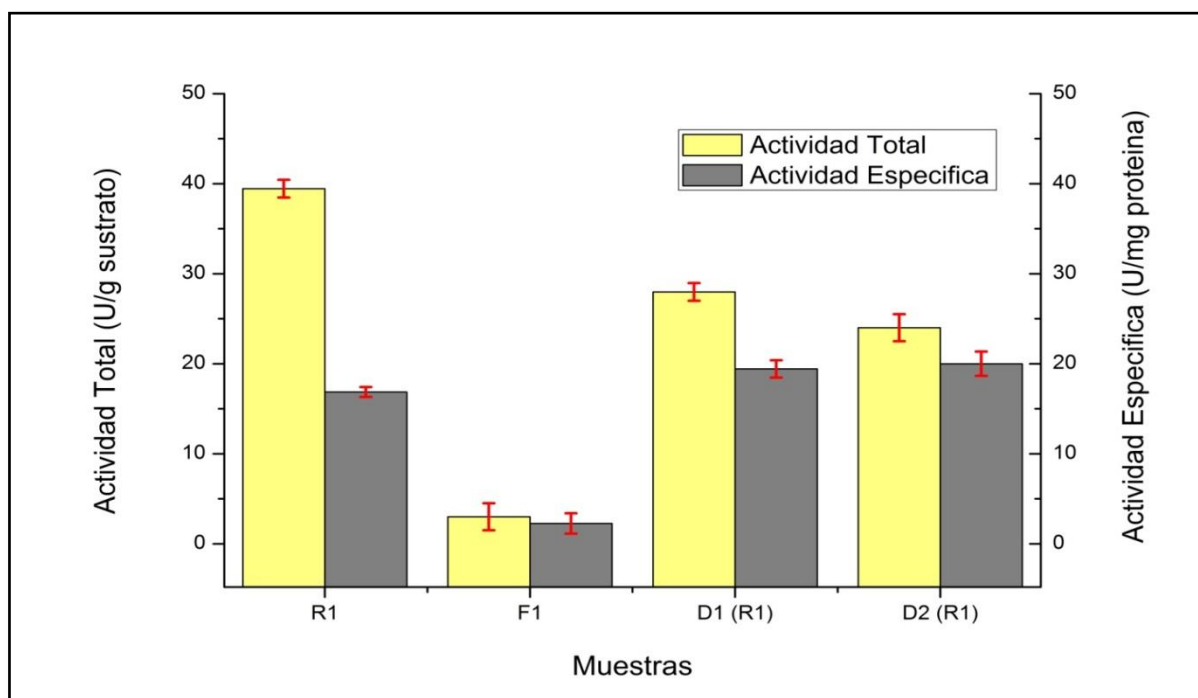


**Figura 23. UF y DF de extractos xilanasa a través de Centriplus de 30 kDa.**

**Tabla 13. Proceso de UF - DF de extractos xilanasa a través de Centriplus de 10 kDa.\***

Muestras	Actividad Total (U/g sustrato)	Proteína Total (mg/mL)	Actividad Específica (U/ mg proteína)
R1	39,45 ± 0,98	2,34 ± 0,05	16,86 ± 0,55
F1	3,00 ± 1,50	1,33 ± 0,04	2,26 ± 1,13
D1 (R1)	27,98 ± 0,98	1,44 ± 0,05	19,43 ± 0,96
D2 (R1)	24,00 ± 1,50	1,20 ± 0,03	20,00 ± 1,35

\* Dilución muestras xilanasa y proteínas (1:50); R = retenido, D = diafiltrado, F = filtrado.

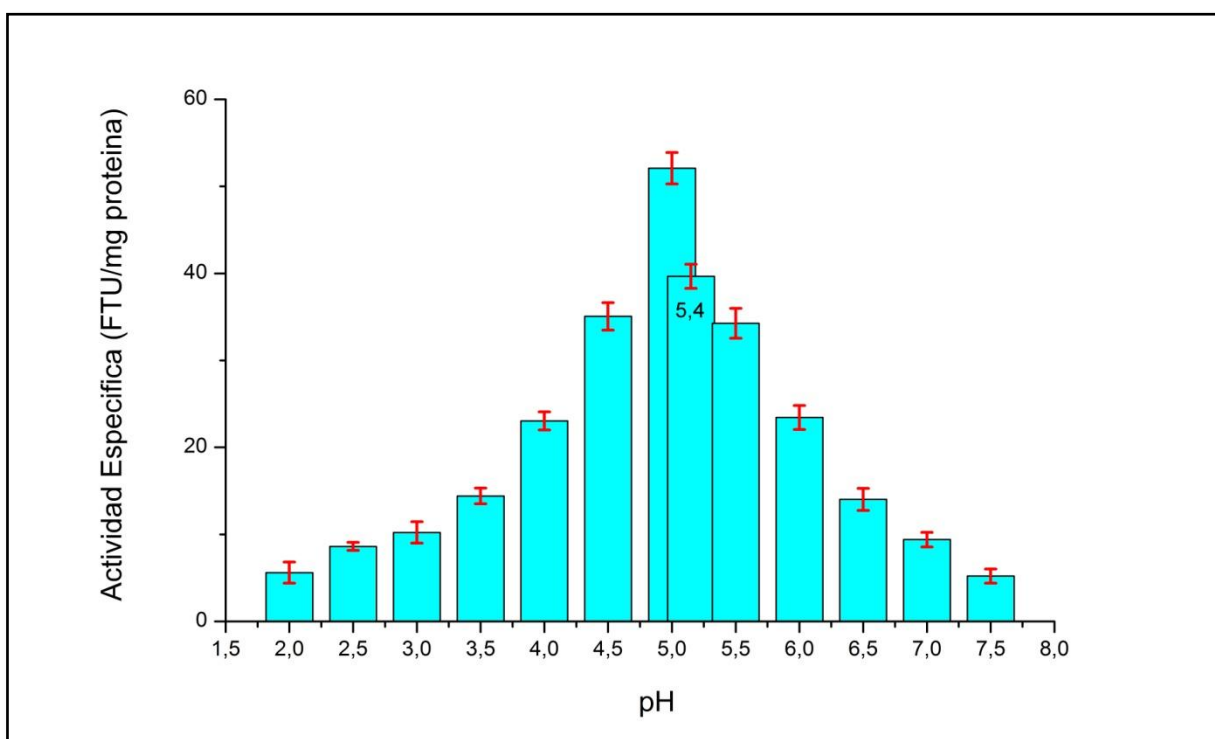


**Figura 24. UF y DF de extractos xilanasa a través de Centriplus de 10 kDa.**

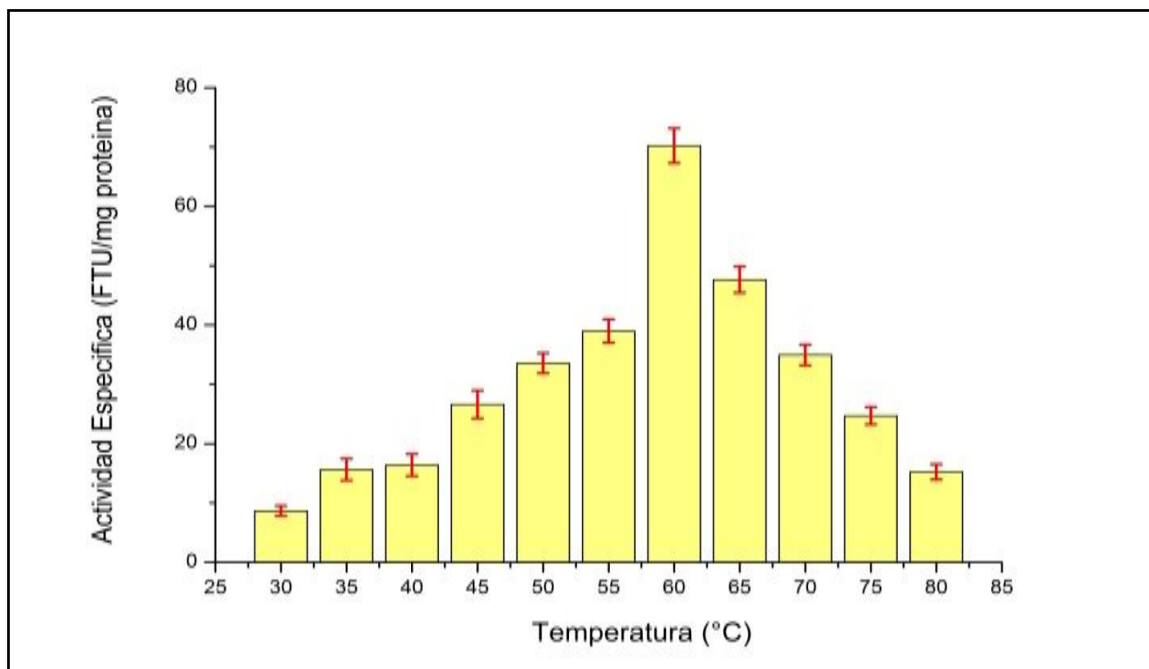
### 4.3 Caracterización de las enzimas fitasa, celulasa y xilanasa respecto al pH y temperatura.

Del análisis llevado a cabo para determinar estos parámetros se obtuvo lo siguiente:

**4.3.1 Caracterización fitasa.** Las tablas correspondientes a la caracterización de esta enzima con respecto al pH (Tabla 30) y a la temperatura (Tabla 31) se encuentran detalladas en el punto 9.2.1 de Anexos.

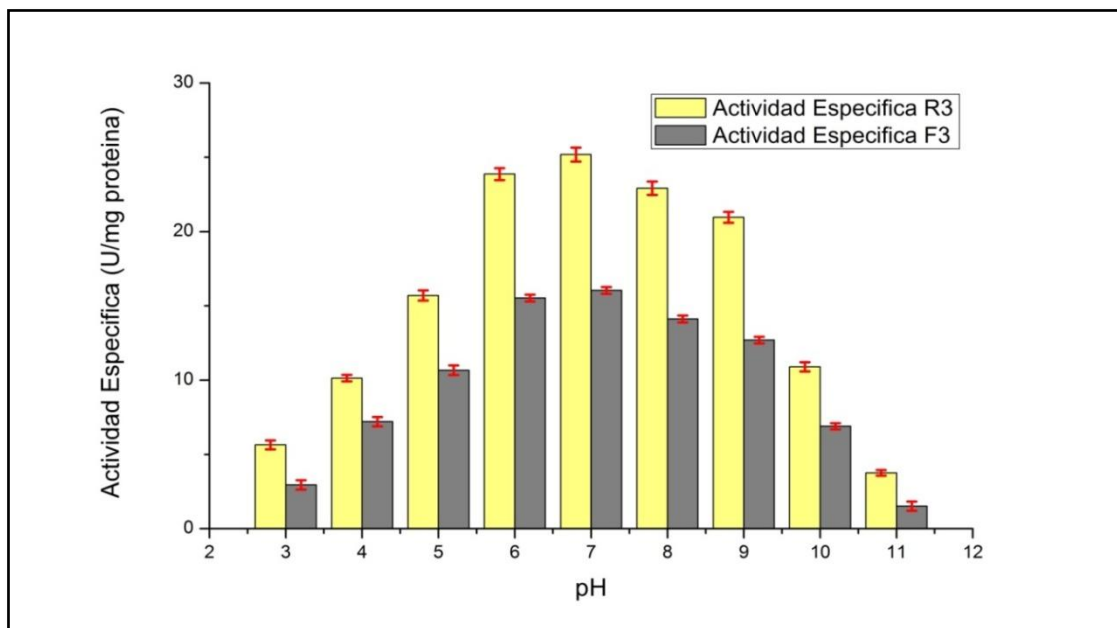


**Figura 25. Caracterización fitasa respecto al pH.**

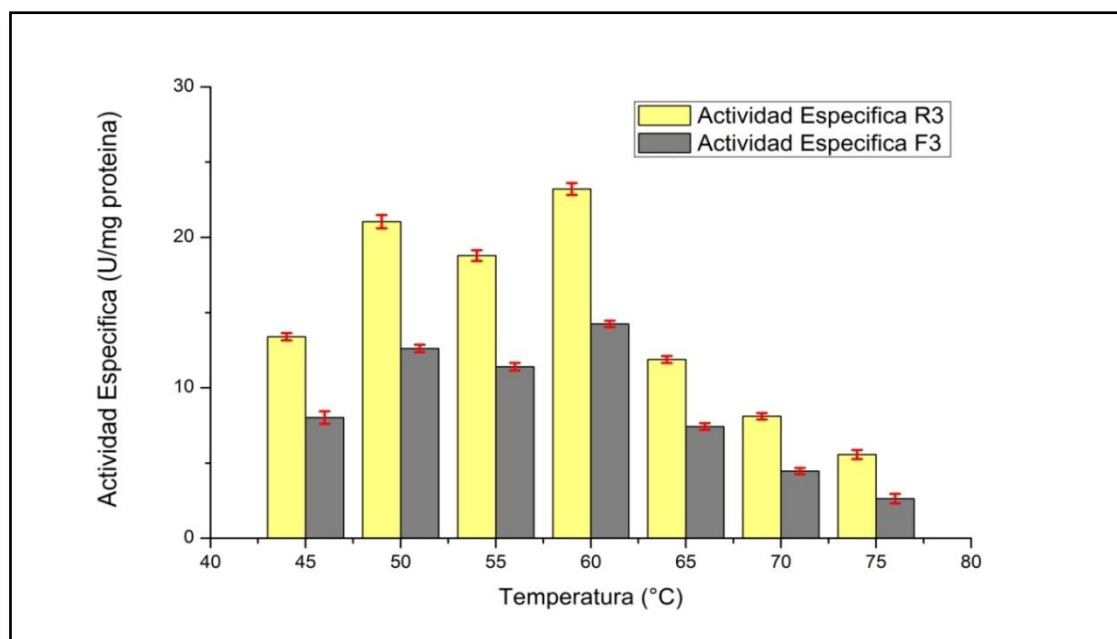


**Figura 26. Caracterización fitasa respecto a la temperatura.**

**4.3.2 Caracterización celulasa.** Las tablas correspondientes a la caracterización de esta enzima con respecto al pH (Tabla 32) y a la temperatura (Tabla 33) se encuentran detalladas en el punto 9.2.2 de Anexos.

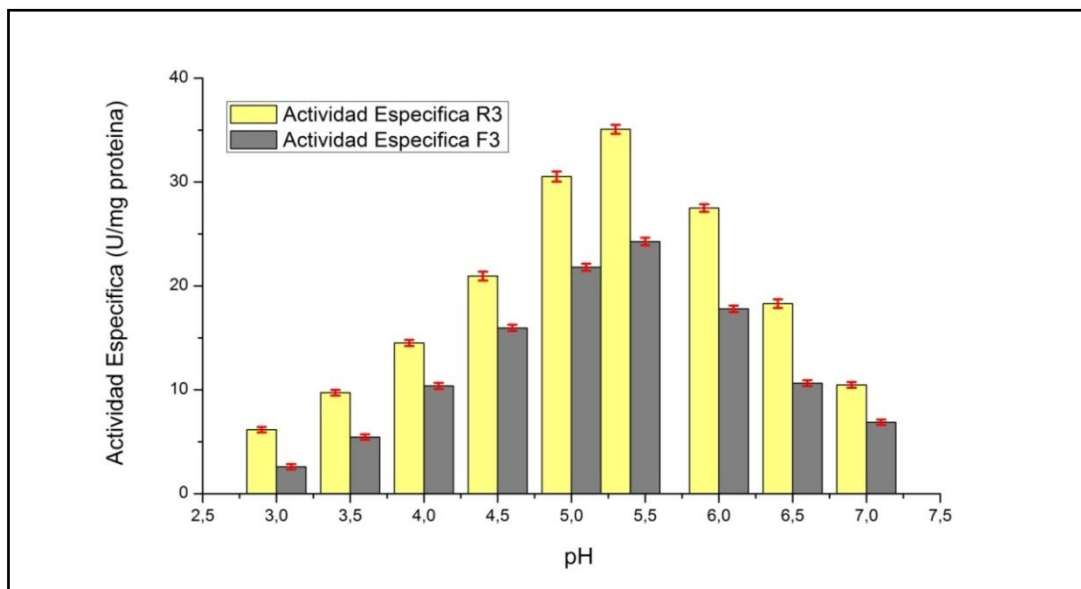


**Figura 27. Caracterización celulasa respecto al pH.**

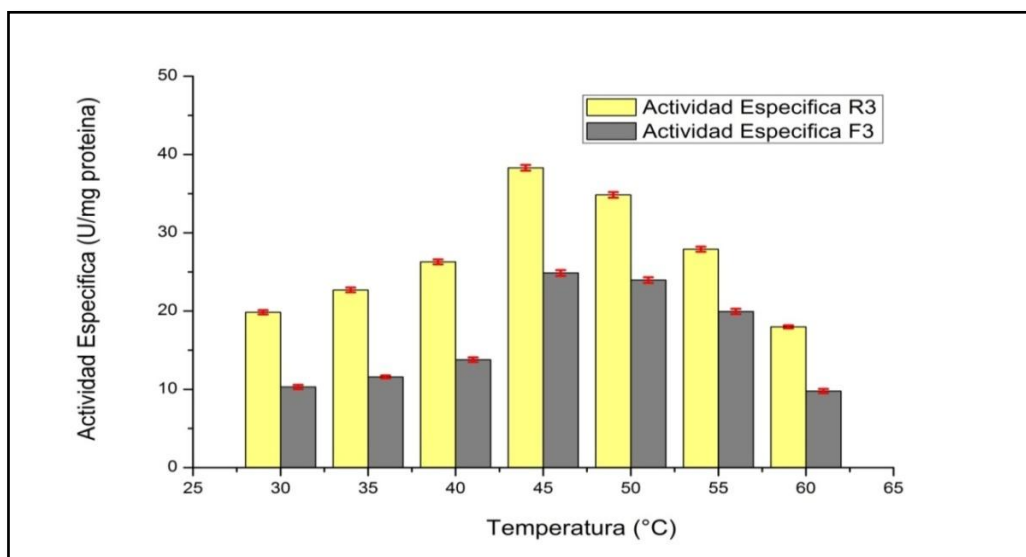


**Figura 28. Caracterización celulasa respecto a la temperatura.**

**4.3.3 Caracterización xilanasa.** Las tablas correspondientes a la caracterización de esta enzima con respecto al pH (Tabla 34) y a la temperatura (Tabla 35) se encuentran detalladas en el punto 9.2.3 de Anexos.



**Figura 29. Caracterización xilanasa respecto al pH.**



**Figura 30. Caracterización xilanasa respecto a la temperatura.**



## 5. DISCUSION

**5.1 Producción de las enzimas en torta de canola y pomaza de cranberry.** En relación a los resultados obtenidos en el estudio para determinar la evolución de la producción de las enzimas fitasa, celulasa, xilanasas y proteasa de la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932 mediante SSF mostraron que:

**5.1.1 Fitasas.** La producción de fitasa llevada a cabo mediante SSF en torta de canola mostró después de 6 días de cultivo, que el nivel máximo de enzima (i.e actividad específica neta) se alcanzó al tercer día (72 h) del proceso de fermentación ( $13,58 \pm 1,15$  FTU/mg proteína) en las condiciones de cultivo realizadas.

Este tiempo obtenido, fue el mismo reportado por Duvnjak *et al.* (1995), quienes realizaron un cultivo SSF usando la cepa *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 (DSM 932) usando como sustrato sólido torta de canola.

La producción de fitasa llevada a cabo mediante SSF en pomaza de cranberry mostró después de 14 días (336 h) de cultivo, el nivel máximo de enzima (i.e actividad específica neta) se alcanzó al decimocuarto día de fermentación ( $5,71 \pm 0,21$  FTU/mg proteína) en las condiciones de cultivo realizadas. Cabe señalar que al observar la Figura 9 correspondiente a este ensayo se observa una mayor actividad específica en comparación a la actividad total, esto se debe a la poca cantidad de proteína del extracto y por consiguiente del sustrato pomaza de cranberry.

No hay registros en la literatura sobre la producción de fitasa mediante SSF en pomaza de cranberry, pero de acuerdo a los resultados obtenidos es factible el uso de ambos sustratos para la producción de esta enzima (aunque la producción máxima fuera casi la mitad en pomaza de cranberry con respecto a torta de canola).

**5.1.2 Celulasas.** La producción de celulasa llevada a cabo mediante SSF en torta de canola mostró después de 6 días de cultivo, el nivel máximo de enzima (i.e actividad específica neta) se alcanzó al segundo día (48 h) del proceso de fermentación ( $16,63 \pm 1,39$  U/mg proteína) en las condiciones de cultivo realizadas.

Este tiempo alcanzado, es mayor que el obtenido por Blandino *et al.* (2005) (máxima producción de celulasa a las 24 h de fermentación), aunque su ensayo lo realizaron empleando el hongo *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 y usando como sustrato sólido pomaza de uva blanca.

La producción de celulasa llevada a cabo mediante SSF en pomaza de cranberry mostró después de 14 días de cultivo, el nivel máximo de enzima (i.e actividad específica neta) se alcanzó al décimo día (240 h) del proceso de fermentación ( $17,79 \pm 0,90$  U/mg proteína) en las condiciones de cultivo realizadas. Cabe señalar que al observar la Figura 11 correspondiente a este ensayo se observa una mayor actividad específica en comparación a la actividad total, la razón es similar a la de fitasa (poca proteína del sustrato pomaza de cranberry).

Tampoco hay registros en la literatura sobre la producción de celulasa mediante SSF en pomaza de cranberry, pero de acuerdo a los resultados obtenidos es factible el uso de ambos sustratos para la producción de esta enzima (en ambos sustratos hubo una producción máxima similar de esta enzima).

**5.1.3 Xilanasas.** La producción de xilanasa llevada a cabo mediante SSF en torta de canola mostró después de 6 días de cultivo, el nivel máximo de enzima (i.e actividad específica neta) se alcanzó al cuarto día (96 h) del proceso de fermentación ( $64,14 \pm 4,65$  U/mg proteína) en las condiciones de cultivo realizadas.

Este tiempo alcanzado, es mayor que el obtenido por Blandino *et al.* (2005) (máxima producción de xilanasa a las 24 h de fermentación), aunque su ensayo lo realizaron empleando el hongo *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1 y usando como sustrato sólido pomaza de uva blanca.

La producción de xilanasa llevada a cabo mediante SSF en pomaza de cranberry mostró después de 14 días de cultivo, el nivel máximo de enzima (i.e actividad específica neta) se alcanzó al séptimo día (168 h) del proceso de fermentación ( $3,07 \pm 0,14$  U/mg proteína), en las condiciones de cultivo realizadas. Cabe señalar que al observar la Figura 13 correspondiente a este ensayo se observa una mayor actividad específica en comparación a la actividad total, la razón es similar que para fitasa y celulasa (poca proteína del sustrato pomaza de cranberry).

Tampoco hay registros en la literatura sobre la producción de xilanasa mediante SSF en pomaza de cranberry.

Al comparar la producción de xilanasa en ambos sustratos se observó que fue muy superior en torta de canola (más de 20 veces con respecto a pomaza de cranberry). De esta manera resultó ser un mejor sustrato para el hongo la torta de canola bajo las condiciones de trabajo, aun así igual la producción de esta enzima es posible en pomaza de cranberry.

**5.1.4 Proteasas.** La producción de proteasa llevada a cabo mediante SSF en torta de canola mostró después de 6 días de cultivo, el nivel máximo de enzima (i.e actividad total y específica neta) se alcanzó al sexto día (144 h) de fermentación ( $3950,00 \pm 180,28$  U/L y  $2,44 \pm 0,19$  U/mg proteína), en las condiciones de cultivo realizadas.

Este comportamiento fue muy similar al descrito por Xu *et al.* (2000), los cuales usaron una cepa de *Aspergillus niger*.

La producción de proteasa llevada a cabo mediante SSF en pomaza de cranberry mostró después de 14 días de cultivo, el nivel máximo de enzima (i.e actividad total y específica neta) se alcanzó al decimocuarto día (336 h) del proceso fermentativo ( $4000,00 \pm 111,80$  U/L y  $22,32 \pm 0,82$  U/mg proteína) en las condiciones de cultivo realizadas.

No hay registros en la literatura sobre la producción de proteasa mediante SSF en pomaza de cranberry, pero de acuerdo a los resultados obtenidos es factible el uso de ambos sustratos para la producción de esta enzima.

**5.2 Purificación de extractos enzimáticos.** La segunda SSF, realizada con el fin de hacer una semipurificación y concentración de las enzimas fitasa, celulasa y xilanasas de la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932 mediante SSF en torta de canola mostraron que:

El valor de producción de enzima fitasa obtenido mediante el proceso de microfiltración ( $5,96 \pm 0,23$  FTU/mg proteína) fue ligeramente mayor que la presentada en la muestra correspondiente al extracto crudo ( $5,64 \pm 0,42$  FTU/mg proteína). Así la etapa de microfiltración cumplió el objetivo de eliminar microorganismos y además concentró aproximadamente un 5,7 % del extracto.

El valor de producción de enzima celulasa obtenido mediante el proceso de microfiltración ( $12,03 \pm 0,46$  U/mg proteína) fue mayor que la presentada en la muestra correspondiente al

extracto crudo ( $9,35 \pm 0,28$  U/mg proteína). La mayor concentración presente en el extracto microfiltrado (se concentró aproximadamente en un 29%) confirma también el objetivo de este proceso.

Finalmente el valor de producción de enzima xilanasa obtenida mediante el proceso de microfiltración ( $31,48 \pm 0,49$  U/mg proteína) fue ligeramente mayor que la presentada en la muestra correspondiente al extracto crudo ( $31,23 \pm 0,42$  U/mg proteína). De igual forma que para las dos enzimas anteriores el proceso de microfiltración cumplió su objetivo (se concentró aproximadamente en un 0,8 %).

Respecto de los resultados obtenidos en el proceso de ultrafiltración, se observó que:

Para el caso de fitasa, el proceso de ultrafiltración realizado mediante el uso de una celda con membrana de 100 kDa de cut - off, en la muestra correspondiente al tercer diafiltrado del retenido (D3) se obtuvo una actividad fitasa de  $37,66 \pm 2,02$  FTU/mg proteína. Al ser mayor esta actividad en comparación a la obtenida en la etapa de microfiltración; indica que la enzima fitasa de *Aspergillus ficuum* es retenida mediante el uso de esta membrana. Este resultado es esperable, de acuerdo con lo reportado por Drořáková *et al.* (1997) quienes realizaron una caracterización de la enzima fitasa de *Aspergillus niger* y obtuvieron un peso molecular aproximado de 100 kDa.

Por su parte Ullah y Gibson (1987) indican que el peso aproximado de la enzima nativa oscila entre 85 a 100 kDa. Por otro lado Walsh y Casey (2003) reportan para la fitasa de *Aspergillus niger* ATCC 9142 un peso molecular aproximado de 84 kDa.

Por otra parte, la muestra correspondiente al filtrado (F) presentó una actividad muy baja ( $1,00 \pm 0,19$  FTU/mg proteína) ratificando prácticamente la total retención de la enzima.

Para celulasa, el proceso de ultrafiltración realizado mediante el uso de tubos Centriplus con una membrana de 50 kDa de cut - off, en la muestra correspondiente al tercer diafiltrado del cuarto

retenido (D3 R3) se obtuvo una actividad celulasa de  $34,09 \pm 2,16$  U/mg proteína. Al ser mayor esta actividad en comparación a la que se obtuvo en la etapa de microfiltración; indica que la enzima celulasa de *Aspergillus ficuum* queda retenida mediante el uso de esta membrana. Este resultado es esperable, de acuerdo a De Vries y Visser (2001) quienes indican que los pesos moleculares de parte de las enzimas que forman parte del complejo celulasa oscilan, dependiendo de la especie de *Aspergillus*, entre 50 kDa (*Aspergillus nidulans*) y 96 kDa (*Aspergillus niger*).

Por otra parte, la muestra correspondiente al cuarto filtrado (F3) presenta una actividad nada despreciable ( $13,17 \pm 0,41$  U/mg proteína), lo cual indica que parte de las enzimas de este complejo enzimático tienen pesos moleculares inferiores a 50 kDa.

Continuando con celulasa, durante el proceso de ultrafiltración realizado mediante el uso de tubos Centriplus con una membrana de 30 kDa de cut - off, se obtuvo tanto para la muestra correspondiente al tercer diafiltrado del retenido (D3 R1) como para la muestra correspondiente al filtrado (F1) una actividad celulasa de  $28,50 \pm 2,74$  U/mg proteína y  $4,43 \pm 0,36$  U/mg proteína, respectivamente. Esto indica que una gran parte de la enzima queda retenida mediante el uso de esta membrana. Este resultado es esperable, de acuerdo a De Vries y Visser (2001) quienes indican que existen enzimas del complejo con pesos moleculares que oscilan, dependiendo de la especie de *Aspergillus* entre 31 kDa (*Aspergillus oryzae*) y 49 kDa (*Aspergillus niger*). Por su parte Yamamoto *et al.* (1995) reporta para una de las enzimas del complejo celulasa de *Aspergillus niger* IFO 31125 un peso molecular aproximado de 40 kDa.

Debido a que la actividad registrada en el filtrado (F1) no es despreciable, indica que existen enzimas de este complejo enzimático con pesos moleculares menores a 30 kDa.

Finalmente durante el proceso de ultrafiltración realizado mediante el uso de tubos Centriplus con una membrana de 10 kDa de cut - off, se obtuvo tanto para la muestra correspondiente al segundo

diafiltrado del retenido (D2 R1) como para la muestra correspondiente al filtrado (F1) una actividad celulasa de  $20,07 \pm 1,09$  U/mg proteína y  $0,81 \pm 0,53$  U/mg proteína, respectivamente. Esto indica que casi la totalidad de la enzima queda retenida mediante el uso de esta membrana. Este resultado es esperable, de acuerdo a De Vries y Visser (2001) quienes indican que existen enzimas del complejo con pesos moleculares que oscilan, dependiendo de la especie de *Aspergillus* entre 12,5 kDa (*Aspergillus fumigatus*) y 29 kDa (*Aspergillus nidulans*). Debido a que la actividad registrada en el filtrado (F1) es muy pequeña y se puede despreciar, ya que en la literatura no se tienen indicios de enzimas de este complejo con pesos moleculares inferiores a 10 kDa.

Para xilanasa, el proceso de ultrafiltración realizado mediante el uso de tubos Centriplus con una membrana de 50 kDa de cut - off, en la muestra correspondiente al tercer diafiltrado del cuarto retenido (D3 R3) se obtuvo una actividad xilanasa de  $60,26 \pm 3,55$  U/mg proteína. Al ser mayor esta actividad en comparación a la que se obtuvo en la etapa de microfiltración; indica que la enzima xilanasa de *Aspergillus ficuum* queda retenida mediante el uso de esta membrana. Este resultado es esperable, de acuerdo a De Vries y Visser (2001) quienes indican que los pesos moleculares de parte de las enzimas que forman parte del complejo xilanasa oscilan, dependiendo de la especie de *Aspergillus*, entre 52 kDa (*Aspergillus aculeatus*) y 90 kDa (*Aspergillus fumigatus*).

Por otra parte, la muestra correspondiente al cuarto filtrado (F3) presenta una actividad nada despreciable ( $24,35 \pm 0,40$  U/mg proteína), lo cual indica que parte de las enzimas de este complejo enzimático tienen pesos moleculares inferiores a 50 kDa.

Continuando con xilanasa, durante el proceso de ultrafiltración realizado mediante el uso de tubos Centriplus con una membrana de 30 kDa de cut - off, se obtuvo, tanto para la muestra

correspondiente al tercer diafiltrado del retenido (D3 R1), como para la muestra correspondiente al filtrado (F1) una actividad xilanasa de  $31,51 \pm 2,46$  U/mg proteína y  $8,17 \pm 0,30$  U/mg proteína, respectivamente. Esto indica que una gran parte de la enzima queda retenida mediante el uso de esta membrana. Este resultado es esperable, de acuerdo a De Vries y Visser (2001) quienes indican que existen enzimas del complejo con pesos moleculares que oscilan, dependiendo de la especie de *Aspergillus* entre 30 kDa (*Aspergillus sydowii*) y 46,5 kDa (*Aspergillus oryzae*). Por su parte Zhaoxin *et al.* (2008) reportan para una de las enzimas del complejo xilanasa de *Aspergillus ficuum* AF - 98 un peso molecular aproximado de 35 kDa.

Debido a que la actividad registrada en el filtrado (F1) no es despreciable, indica que existen enzimas de este complejo enzimático con pesos moleculares menores a 30 kDa.

Finalmente durante el proceso de ultrafiltración realizado mediante el uso de tubos Centriplus con una membrana de 10 kDa de cut - off, se obtuvo tanto para la muestra correspondiente al segundo diafiltrado del retenido (D2 R1) como para la muestra correspondiente al filtrado (F1) una actividad celulasa de  $20,00 \pm 1,35$  U/mg proteína y de  $2,26 \pm 1,13$  U/mg proteína, respectivamente. Esto indica que casi la totalidad de la enzima queda retenida mediante el uso de esta membrana. Este resultado es esperable, de acuerdo a De Vries y Visser (2001) quienes indican que existen enzimas del complejo con pesos moleculares que oscilan, dependiendo de la especie de *Aspergillus* entre 10 kDa (*Aspergillus fumigatus*) y 29 kDa (*Aspergillus kawachii*). Por su parte Fang *et al.* (2008) reportan para una de las enzimas del complejo xilanasa de *Aspergillus carneus* M 34 un peso molecular aproximado de 18,8 kDa.

Debido a que la actividad registrada en el filtrado (F1) es baja, se puede despreciar ya que de acuerdo a la literatura no se han reportado enzimas de este complejo con pesos moleculares inferiores a 10 kDa.



**5.3 Caracterización de los extractos enzimáticos respecto al pH y temperatura.** En relación a los resultados obtenidos durante el estudio de caracterización de las enzimas fitasa, celulasa y xilanasas de acuerdo al pH y temperatura, se observa que:

Para el extracto ultrafiltrado de enzima fitasa (D3), se obtuvo un pH óptimo de 5,0 en las condiciones de trabajo realizadas. Dicho pH óptimo es reportado también por Drořáková *et al.* (1997) pero para una fitasa de *Aspergillus niger*, por su parte Duvnjak y Al - Asheh (1994) reportaron un pH óptimo de 4,7 para una fitasa de *Aspergillus carbonarius* NRC 401121, en tanto que Howson y Davis (1983) reportaron para una fitasa de *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 (DSM 932) dos pH's óptimos, uno a 2,0 y otro a 5,5, aunque ellos explican posteriormente que el pH óptimo a 2,0 se debe a una fosfatasa ácida no específica que enmascara la actividad fitasa que a ese pH igual existe pero es muy baja y que el pH óptimo de 5,5 es el que corresponde a fitasa.

Cabe destacar que la actividad enzimática en el pH óptimo es un 31% mayor que la obtenida al pH de trabajo (5,15) y que la enzima es estable en el rango de pH's comprendidos entre 4,5 y 5,5. Respecto a la temperatura óptima de este extracto enzimático, esta alcanzó los 60°C en las condiciones de trabajo realizadas. Dicha temperatura óptima es menor a la reportada por Walsh y Casey (2003) para la fitasa de *Aspergillus niger* que fue de 65°C y mayor a la reportada por Duvnjak y Al - Asheh (1994) para una fitasa de la cepa *Aspergillus carbonarius* NRC 401121 que fue de 53°C y a la reportada por Howson y Davis (1983) para una fitasa de *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 (DSM 932) que fue de 55°C.

Cabe destacar que la actividad enzimática a la temperatura óptima es un 80% mayor que la obtenida a la temperatura de trabajo (55°C) y que la enzima es estable en el rango de temperaturas comprendidas entre 50°C y 70°C.

Para el extracto ultrafiltrado de celulasa (R3 y F3), se obtuvo en ambos un pH óptimo de 7,0 en las condiciones de trabajo realizadas. Dicho pH óptimo es reportado por Yamamoto *et al.* (1995) quienes determinaron que el pH óptimo de una de las enzimas del complejo celulasa de *Aspergillus niger* IFO 31125 oscila entre 6,0 y 7,0.

Cabe destacar que la actividad enzimática en el pH óptimo es un 20% mayor que la obtenida al pH de trabajo (9,0) y que la enzima es estable en el rango de pH's comprendidos entre 6,0 y 9,0.

Respecto a la temperatura óptima de este extracto enzimático, esta alcanzó los 60°C en las condiciones de trabajo realizadas. Dicha temperatura óptima es menor a la reportada por Yamamoto *et al.* (1995) quienes determinaron que la temperatura óptima de una de las enzimas del complejo celulasa de *Aspergillus niger* IFO 31125 es de 70°C.

Cabe destacar que la actividad enzimática a la temperatura óptima es un 10% mayor que la obtenida a la temperatura de trabajo (50°C) y que la enzima es estable en el rango de temperaturas comprendidas entre 45°C y 65°C.

Para el extracto ultrafiltrado de xilanasa (R3 y F3), se obtuvo en ambos un pH óptimo de 5,4 en las condiciones de trabajo realizadas. Dicho pH óptimo es mayor al reportado por Zhaoxin *et al.* (2008) quienes determinaron que el pH óptimo de una de las enzimas del complejo xilanasa de *Aspergillus ficuum* AF - 98 es de 5,0 y menor al reportado por Fang *et al.* (2008) quienes determinaron que el pH óptimo de una de las enzimas del complejo xilanasa de *Aspergillus carneus* M 34 es de 6,0.

Cabe destacar que la actividad enzimática en el pH óptimo correspondió al pH de trabajo (5,4) y que la enzima es estable en el rango de pH's comprendidos entre 5,0 y 6,0.

Respecto a la temperatura óptima de este extracto enzimático, esta alcanzó los 45°C en las condiciones de trabajo realizadas. Dicha temperatura óptima es reportada por Zhaoxin *et al.*

(2008) para una de las enzimas del complejo xilanasa de *Aspergillus ficuum* AF - 98, por su parte Fang *et al.* (2008) determinaron que la temperatura óptima de una de las enzimas del complejo xilanasa de *Aspergillus carneus* M 34 es de 50°C.

Cabe destacar que la actividad enzimática a la temperatura óptima es un 10% mayor que la obtenida a la temperatura de trabajo (50°C) y que la enzima es estable en el rango de temperaturas comprendidas entre 40°C y 55°C.

## 6. CONCLUSIONES

- La producción, tanto de fitasa, celulasa, xilanasa y proteasa de la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932, es factible de llevar a cabo mediante una SSF, con un medio sólido a base de torta de canola.
- La producción, tanto de fitasa, celulasa, xilanasa y proteasa de la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932, es factible de llevar a cabo mediante una SSF, con un medio sólido a base de pomaza de cranberry.
- Las técnicas de microfiltración y ultrafiltración (diafiltración) aplicadas, son adecuadas para lograr un extracto semipurificado y concentrado tanto de fitasa, celulasa y xilanasa proveniente de un cultivo de *Aspergillus ficuum* en medio sólido de torta de canola.
- La enzima fitasa obtenida queda retenida al ultrafiltrar el extracto por una membrana de 100 kDa de cut - off y ello indicaría que la enzima tiene un peso molecular aproximado de 100 kDa.
- Tanto las enzimas celulasa como xilanasa quedan retenidas al ultrafiltrar el extracto por tubos Centriplus con membranas de 50 kDa, 30 kDa y 10 kDa de cut - off, lo que indicaría que las enzimas de ambos complejos tienen pesos moleculares que oscilan entre 10 kDa y < 100 kDa.
- La enzima fitasa tiene un pH óptimo de 5,0 y una temperatura óptima de 60°C, en tanto que el complejo celulasa tiene un pH óptimo de 7,0 y una temperatura óptima de 60°C, por su parte el complejo xilanasa tiene un pH óptimo de 5,4 y una temperatura óptima de 45°C.

## 7. PROYECCIONES

En síntesis, producto de los resultados obtenidos; el trabajo desarrollado en la presente tesis muestra una gran proyección a futuro, ya que la producción de enzimas mediante SSF usando como sustratos subproductos y desechos de la agroindustria como por ejemplo fitasa se ha visto cada vez más favorecida, al mejorar la utilización de varios nutrientes (minerales, aminoácidos, energía), ayudar en la disminución de costos, disminuyendo el grado de polución ambiental (menor eliminación de Pi en efluentes). De igual forma la utilización de celulasas, xilanasas y proteasas en diversos procesos industriales tiene gran proyección hoy en día.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Abarca, M.L (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev. Iberoam. Micol.*, 17 (3), S79 - S84.

Anthony, T., Chandra Raj, K., Rajendran, A. y Gunasekaran, P. (2003). High molecular weight cellulase - free xylanase from alkali - tolerant *Aspergillus fumigatus* AR 1. *Enzyme and Microbial Technology.*, 32, 647 - 654.

Blandino, A., Botella, C., De Ory, I., Webb, C. y Cantero, D. (2005). Hydrolitic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal.*, 26, 100 - 106.

Boer, C.G y Peralta, R.M. (2000). Production of extracellular protease by *Aspergillus tamaris*. *J. Basic Microbiol.*, 40 (2), 75 - 81.

Chaplin, M.F. (1986) Monosaccharides. En: Chaplin M.F., Kennedy J.F. (eds.) *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*: 1-36. IRL Press (Oxford, England).

De Ory, I., Caro, I., Díaz, A.B. y Blandino, A. (2007). Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme and Microbial Technology.*, 41, 302 - 306.

De Vries, R.P. y Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65 (4), 497 - 522.

Doelle, H.W., Mitchell, D.A y Rolz, C.E. (1992). Solid Substrate Cultivation. *Elsevier Applied Science*, London & New York.

Droňáková, J., Volfová, O. y Kopecký, J. (1997). Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica*, 42 (4), 349 - 352.

Duvnjak, Z. y Al - Asheh, S. (1994). Characteristics of phytase produced by *Aspergillus carbonarius* NRC 401121 in canola meal. *Acta Biotechnologica.*, 14 (3), 223 - 233.

Duvnjak, Z. y Nair, V.C. (1990). Reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus ficuum* in solid state fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 183 - 188.

Duvnjak, Z., Ebune, A. y Al - Asheh, S. (1995). Production of phytase during solid state fermentation using *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 in canola meal. *Bioresource Technology.*, 53, 7 - 12.

Fang, H-Y., Chang, S-M., Lan, C-H y Fang, T.J. (2008). Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M 34 and its potential use in photoprotectant preparation. *Process Biochemistry.*, 43, 49 - 55.

Harland, B.F. y Harland, J. (1980). Fermentative reduction of phytase in rye, white, and whole wheat breads. *Cereal Chem.*, 57 (3), 226 - 229.

Heldt, H.W. (2005). Plant Biochemistry. 3<sup>a</sup> Ed. Elsevier Academic Press, 630 pp.

Howson, S.J. y Davis, R.P. (1983). Production of phytate - hydrolyzing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb. Technol.*, 5 (5), 377 - 382.

Krishna, C. (2005). Solid State Fermentation Systems - An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology.*, 25, 1 - 30.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 - 275.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.*, 31 (3), 426 - 428.

Nelson, T.S., Shieh, T.R., Wodzinski, R.J y Ware, J.H. (1968). The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poult. Sci.*, 47, 1842 - 1848.

Ochiai, E-I. (1985). Química bioinorgánica. Una introducción. Editorial Reverté. 518 pp.

Ostanin, K., Harms, E.H., Stevis, P.E., Kuciel, R., Zhou M-M. y Van Etten, R.L. (1992). Overexpression, site directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 267, 22830 - 22836.

Raper, K.B y Fennell, D.I. (1965). *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Roopesh, K., Ramachandran, S., Nampoothiri, K.M., Szakacs, G. y Pandey, A. (2006). Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource Technology.*, 97, 506 - 511.

Shetty, K. y Zheng, Z. (1998). Cranberry processing waste for solid state fungal inoculant production. *Process Biochemistry.*, 33 (3), 323 - 329.



Singh, D. y Nigam, P. (1994). Solid state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *J. Basic Microbiol.*, 34 (6), 405 - 423.

Taussky, H. y Shorr, E. (1953). A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *Journal of Biological Chemistry.*, 202 (2), 675 - 685.

Tunga, R., Shrivastava, B. y Banerjee, R. (2003). Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry.*, 38, 1553 - 1558.

Ullah, A.H. y Gibson D.M. (1987). Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep. Biochem.*, 17 (1), 63 - 91.

Van Etten, R.L. (1982). Human prostatic acid phosphatase: a histidine phosphatase. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 390, 27 - 51.

Van Etten, R.L, Davidson, R., Panayiotis, E.S., MacArthur, H. y Moore, D.L. (1991). Covalent structure, disulfide bonding and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 266, 2313 - 2319.

Walsh, G. y Casey, A. (2003). Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresource Technology.* 86, 183 - 188.

Ward, O.P. (1989). Fermentation biotechnology. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Xu, J., Wang, L., Ridgway, D., Gu, T. y Moo - Young, M. (2000). Increased heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation through extracellular proteases inhibition by pelleted growth. *Biotechnol. Prog.*, 16, 222 - 227.

Yamamoto, K., Akiba, S., Kimura, Y. y Kumagai, H. (1995). Purification and characterization of a protease - resistant cellulase from *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Bioeng.*, 79 (2), 125 - 130.

Zhaoxin, L., Fengxia, L., Mei, L., Xiaomei, B., Haizhen, Z. y Yi, W. (2008). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF - 98. *Bioresource Technology.*, 99, 5938 - 5941.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Producción de las enzimas fitasas, celulasas, xilanasas y proteasas de la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932 mediante SSF en torta de canola y pomaza de cranberry.

#### 9.1.1 Proteínas totales.

Tabla 14. Curva calibración ensayo proteínas totales.

TUBO	Proteína Total (µg/mL)	A <sub>750</sub>
1	120,00	0,469
2	100,00	0,406
3	80,00	0,362
4	60,00	0,273
5	40,00	0,171
6	20,00	0,083
Blanco	0,00	0,000

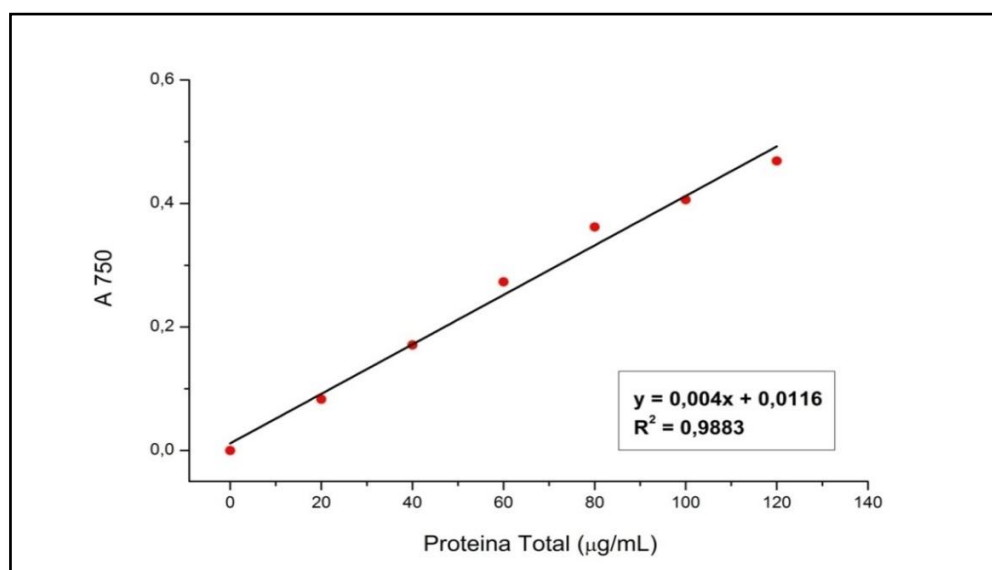


Figura 31. Gráfico curva calibración determinación proteínas totales.

**Tabla 15. Determinación proteínas torta canola (extractos crudos).\***

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Proteína Total Neta (mg/mL)</b>
0	0,00 ± 0,18
24	2,10 ± 0,18
48	2,25 ± 0,18
72	2,50 ± 0,18
96	2,50 ± 0,18
120	2,50 ± 0,18
144	2,50 ± 0,18

\* Dilución muestras (1:500).

**Tabla 16. Determinación proteínas pomaza cranberry (extractos crudos).\***

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Proteína Total Neta (mg/mL)</b>
0	0,00 ± 0,01
24	0,28 ± 0,01
48	0,27 ± 0,01
72	0,29 ± 0,01
96	0,27 ± 0,01
120	0,27 ± 0,01
144	0,28 ± 0,01
168	0,27 ± 0,01
192	0,28 ± 0,01
216	0,29 ± 0,01
240	0,29 ± 0,01
264	0,30 ± 0,01
288	0,29 ± 0,01
312	0,29 ± 0,01
336	0,28 ± 0,01

\* Dilución muestras (1:10).

### 9.1.2 Fitasas.

Tabla 17. Curva de calibración ensayo de actividad fitasa.

N° TUBO	Pi ( $\mu\text{mol/ml}$ )	A <sub>660</sub>
1	1,00	1,242
2	0,83	1,086
3	0,60	0,798
4	0,40	0,553
5	0,30	0,419
6	0,20	0,264
7	0,10	0,141
8	0,08	0,112
9	0,04	0,059
Blanco	0,00	0,000

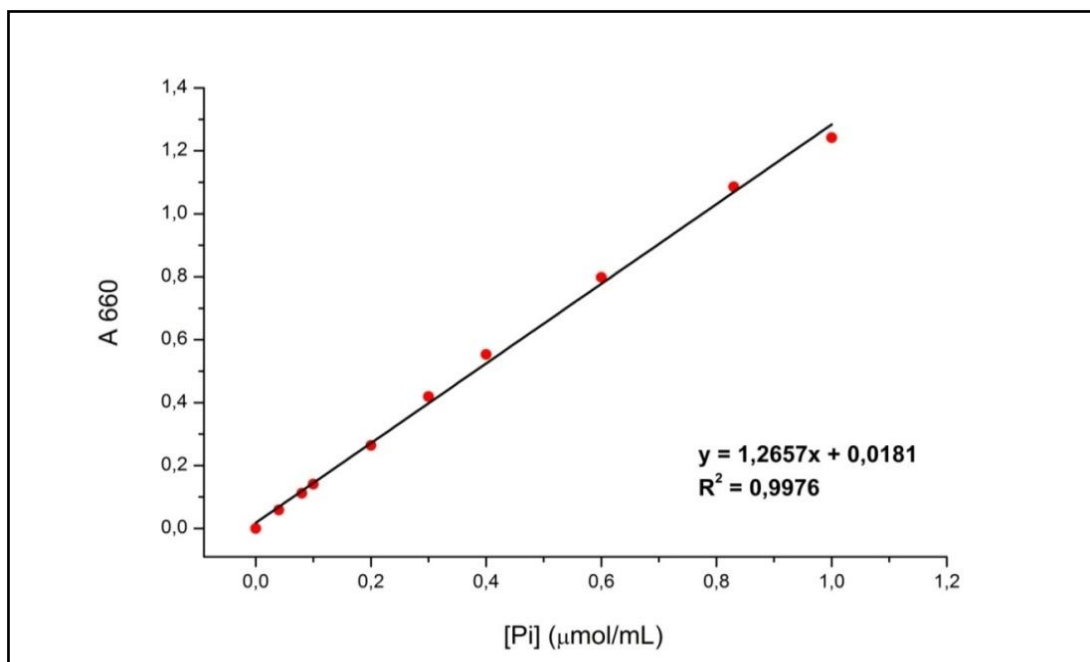


Figura 32. Gráfico curva de calibración ensayo de actividad fitasa.

**Tabla 18. Evolución de la actividad total y específica neta fitasa en torta canola (EC).\***

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Total Neta (FTU/g sustrato)</b>	<b>Proteína Total Neta (mg/mL)</b>	<b>Actividad Específica Neta (FTU/mg proteína)</b>
0	0,00 ± 0,59	0,00 ± 0,18	0,00 ± 0,00
24	4,58 ± 1,12	2,10 ± 0,18	2,18 ± 0,56
48	13,12 ± 1,52	2,25 ± 0,18	5,83 ± 0,82
72	33,96 ± 1,52	2,50 ± 0,18	13,58 ± 1,15
96	31,04 ± 1,12	2,50 ± 0,18	12,42 ± 1,00
120	30,62 ± 0,59	2,50 ± 0,18	12,25 ± 0,91
144	30,00 ± 1,12	2,50 ± 0,18	12,00 ± 0,97

\* Dilución muestras (1:500); EC = extractos crudos.

**Tabla 19. Evolución de la actividad total y específica neta fitasa en pomaza cranberry (EC).\***

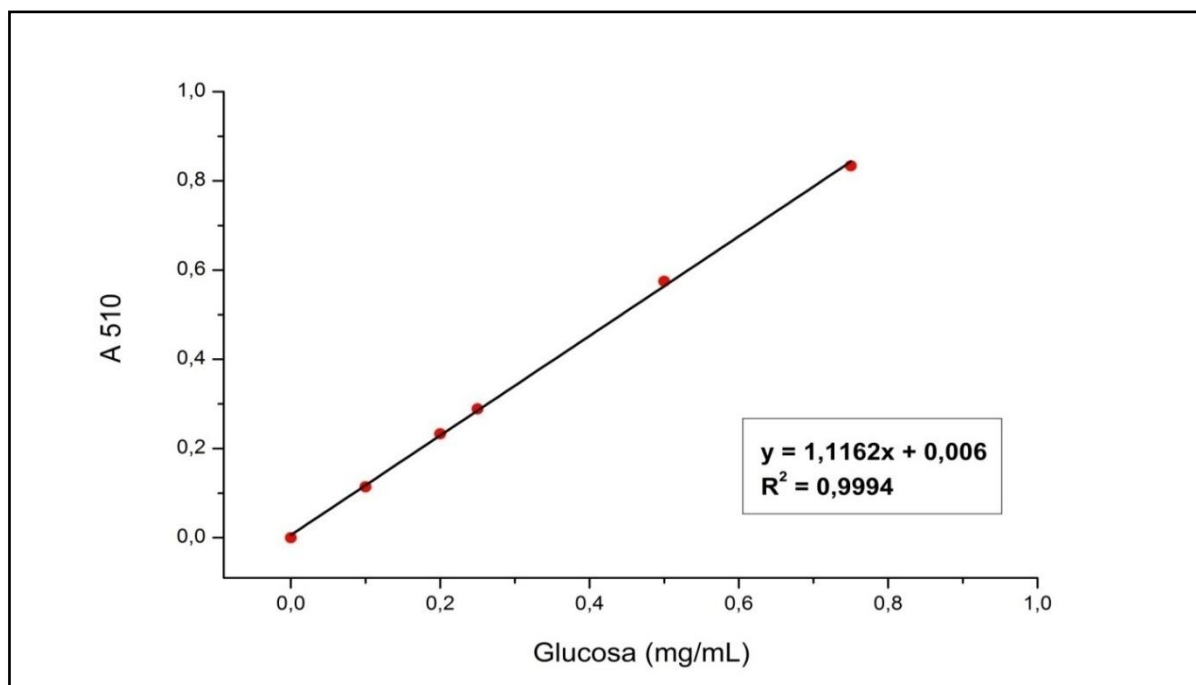
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Total Neta (FTU/g sustrato)</b>	<b>Proteína Total Neta (mg/mL)</b>	<b>Actividad Específica Neta (FTU/mg proteína)</b>
0	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00
24	0,05 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,18 ± 0,04
48	0,16 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,59 ± 0,08
72	0,27 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,93 ± 0,05
96	0,44 ± 0,02	0,27 ± 0,01	1,63 ± 0,10
120	0,65 ± 0,02	0,27 ± 0,01	2,41 ± 0,12
144	0,82 ± 0,02	0,28 ± 0,01	2,93 ± 0,13
168	0,94 ± 0,01	0,27 ± 0,01	3,48 ± 0,13
192	1,13 ± 0,01	0,28 ± 0,01	4,04 ± 0,15
216	1,29 ± 0,01	0,29 ± 0,01	4,45 ± 0,16
240	1,44 ± 0,01	0,29 ± 0,01	4,97 ± 0,17
264	1,61 ± 0,01	0,30 ± 0,01	5,37 ± 0,18
288	1,63 ± 0,01	0,29 ± 0,01	5,62 ± 0,20
312	1,62 ± 0,01	0,29 ± 0,01	5,59 ± 0,20
336	1,60 ± 0,01	0,28 ± 0,01	5,71 ± 0,21

\* Dilución muestras (1:10); EC = extractos crudos.

### 9.1.3 Celulasas.

**Tabla 20. Curva de calibración para ensayo actividad celulasa.**

N° TUBO	Glucosa (mg/mL)	A <sub>510</sub>
1	0,75	0,834
2	0,50	0,575
3	0,25	0,289
4	0,20	0,233
5	0,10	0,114
Blanco	0,00	0,000



**Figura 33. Gráfico curva de calibración ensayo de actividad celulasa.**

**Tabla 21. Evolución de la actividad total y específica neta celulasa en torta canola (EC).\***

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Total Neta (U/g sustrato)</b>	<b>Proteína Total Neta (mg/mL)</b>	<b>Actividad Específica Neta (U/mg proteína)</b>
0	0,00 ± 1,17	0,00 ± 0,18	0,00 ± 0,00
24	23,32 ± 1,17	2,10 ± 0,18	11,10 ± 1,10
48	37,42 ± 0,94	2,25 ± 0,18	16,63 ± 1,39
72	22,05 ± 0,94	2,50 ± 0,18	8,82 ± 0,74
96	14,55 ± 1,17	2,50 ± 0,18	5,82 ± 0,63
120	9,15 ± 1,17	2,50 ± 0,18	3,66 ± 0,54
144	7,05 ± 1,17	2,50 ± 0,18	2,82 ± 0,51

\* Dilución muestras (1:50); EC = extractos crudos.

**Tabla 22. Evolución de la actividad total y específica neta celulasa en pomaza cranberry (EC).\***

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Total Neta (U/g sustrato)</b>	<b>Proteína Total Neta (mg/mL)</b>	<b>Actividad Específica Neta (U/mg proteína)</b>
0	0,00 ± 0,13	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00
24	0,17 ± 0,13	0,28 ± 0,01	0,61 ± 0,47
48	0,33 ± 0,13	0,27 ± 0,01	1,22 ± 0,48
72	0,59 ± 0,13	0,29 ± 0,01	2,03 ± 0,45
96	4,50 ± 0,19	0,27 ± 0,01	16,67 ± 0,94
120	4,25 ± 0,19	0,27 ± 0,01	15,74 ± 0,91
144	4,83 ± 0,19	0,28 ± 0,01	17,25 ± 0,92
168	4,50 ± 0,19	0,27 ± 0,01	16,67 ± 0,94
192	3,92 ± 0,13	0,28 ± 0,01	14,00 ± 0,68
216	2,49 ± 0,13	0,29 ± 0,01	8,59 ± 0,54
240	5,16 ± 0,19	0,29 ± 0,01	17,79 ± 0,90
264	2,91 ± 0,19	0,30 ± 0,01	9,70 ± 0,71
288	0,59 ± 0,13	0,29 ± 0,01	2,03 ± 0,45
312	0,83 ± 0,19	0,29 ± 0,01	2,86 ± 0,66
336	0,42 ± 0,19	0,28 ± 0,01	1,50 ± 0,68

\* Dilución muestras (1:10); EC = extractos crudos.



### 9.1.4 Xilanasas.

Tabla 23. Curva de calibración ensayo xilanasas.

N° TUBO	Xilosa (mg/mL)	A <sub>510</sub>
1	0,75	0,920
2	0,50	0,642
3	0,30	0,375
4	0,20	0,244
5	0,10	0,129
Blanco	0,00	0,000

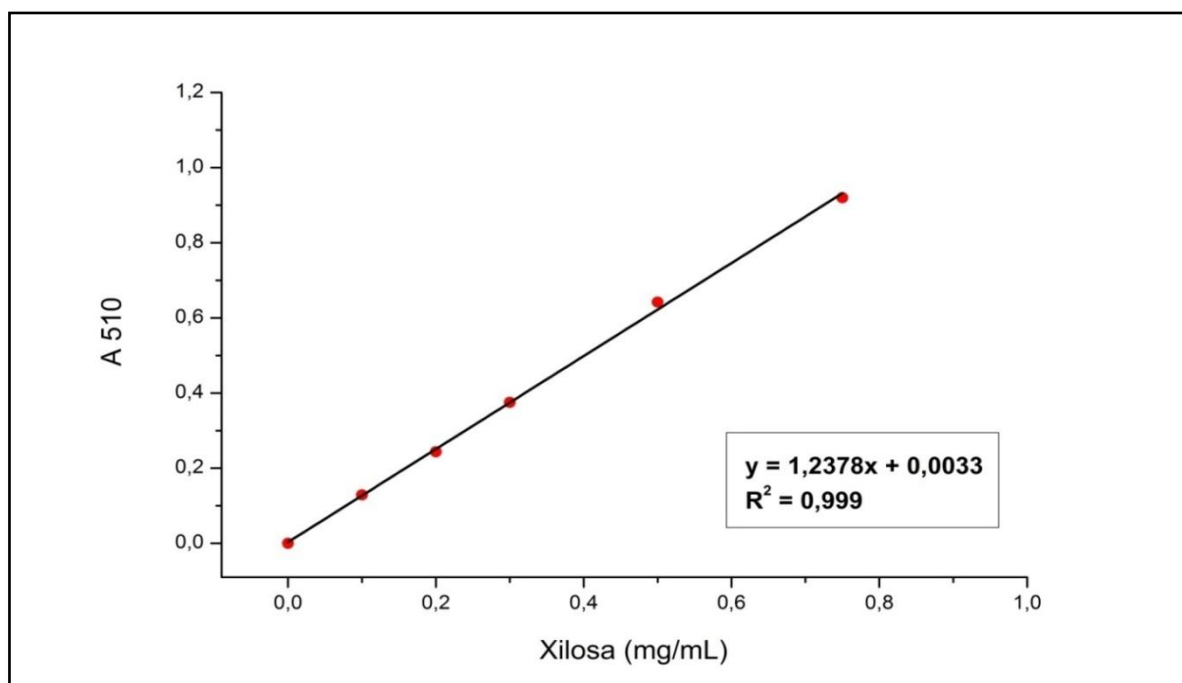


Figura 34. Gráfico curva de calibración ensayo de actividad xilanasas.

**Tabla 24. Evolución de la actividad total y específica neta xilanasa en torta canola (EC).\***

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Total Neta (U/g sustrato)</b>	<b>Proteína Total Neta (mg/mL)</b>	<b>Actividad Específica Neta (U/mg proteína)</b>
0	0,00 ± 1,39	0,00 ± 0,18	0,00 ± 0,00
24	6,00 ± 1,39	2,10 ± 0,18	2,86 ± 0,71
48	58,42 ± 1,39	2,25 ± 0,18	25,96 ± 2,17
72	68,47 ± 1,39	2,50 ± 0,18	27,39 ± 2,05
96	160,35 ± 1,39	2,50 ± 0,18	64,14 ± 4,65
120	125,92 ± 1,39	2,50 ± 0,18	50,37 ± 3,67
144	83,92 ± 1,39	2,50 ± 0,18	33,57 ± 2,48

\* Dilución muestras (1:50); EC = extractos crudos.

**Tabla 25. Evolución de la actividad total y específica neta xilanasa en pomaza cranberry (EC).\***

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Total Neta (U/g sustrato)</b>	<b>Proteína Total Neta (mg/mL)</b>	<b>Actividad Específica Neta (U/mg proteína)</b>
0	0,00 ± 0,03	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00
24	0,08 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,11
48	0,11 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,41 ± 0,08
72	0,10 ± 0,03	0,29 ± 0,01	0,34 ± 0,10
96	0,80 ± 0,03	0,27 ± 0,01	2,96 ± 0,16
120	0,75 ± 0,03	0,27 ± 0,01	2,78 ± 0,15
144	0,80 ± 0,03	0,28 ± 0,01	2,86 ± 0,15
168	0,83 ± 0,02	0,27 ± 0,01	3,07 ± 0,14
192	0,71 ± 0,03	0,28 ± 0,01	2,54 ± 0,14
216	0,69 ± 0,03	0,29 ± 0,01	2,38 ± 0,13
240	0,66 ± 0,03	0,29 ± 0,01	2,28 ± 0,13
264	0,88 ± 0,03	0,30 ± 0,01	2,93 ± 0,14
288	0,67 ± 0,03	0,29 ± 0,01	2,31 ± 0,13
312	0,63 ± 0,03	0,29 ± 0,01	2,17 ± 0,13
336	0,60 ± 0,03	0,28 ± 0,01	2,14 ± 0,13

\* Sin dilución; EC = extractos crudos.

### 9.1.5 Proteasas.

**Tabla 26. Evolución de la actividad neta de proteasa en torta canola (EC).\***

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Proteasa Neta (U/L)</b>
0	0,00 ± 141,42
24	300,00 ± 180,28
48	550,00 ± 141,42
72	1750,00 ± 180,28
96	2700,00 ± 141,42
120	3600,00 ± 223,61
144	3950,00 ± 180,28

\* Dilución muestras (1:50); EC = extractos crudos.

**Tabla 27. Evolución de la actividad específica neta de proteasa en torta canola (EC).\***

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Específica Proteasa Neta (U/mg proteína)</b>
0	0,00 ± 0,00
24	1,12 ± 0,12
48	1,16 ± 0,10
72	1,52 ± 0,12
96	1,90 ± 0,14
120	2,26 ± 0,18
144	2,44 ± 0,19

\* Dilución muestras (1:50); EC = extractos crudos.

**Tabla 28. Evolución de la actividad neta de proteasa en pomaza cranberry (EC).\***

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Proteasa Neta (U/L)</b>
0	0,00 ± 141,42
24	100,00 ± 141,42
48	250,00 ± 141,42
72	250,00 ± 141,42
96	650,00 ± 180,28
120	700,00 ± 141,42
144	1200,00 ± 180,28
168	1350,00 ± 111,80
192	2350,00 ± 141,42
216	2350,00 ± 141,42
240	2650,00 ± 111,80
264	2750,00 ± 111,80
288	3750,00 ± 111,80
312	3800,00 ± 180,28
336	4000,00 ± 111,80

\* Dilución muestras (1:50); EC = extractos crudos.

**Tabla 29. Evolución de la actividad específica neta de proteasa en pomaza cranberry (EC).\***

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad Específica Proteasa Neta (U/mg proteína)</b>
0	0,00 ± 0,00
24	8,39 ± 0,47
48	9,25 ± 0,50
72	8,62 ± 0,46
96	10,74 ± 0,68
120	10,93 ± 0,55
144	12,32 ± 0,69
168	13,33 ± 0,53
192	16,43 ± 0,69
216	15,86 ± 0,65
240	16,90 ± 0,61
264	16,67 ± 0,58
288	20,69 ± 0,73
312	20,86 ± 0,89
336	22,32 ± 0,82

\* Dilución muestras (1:50); EC = extractos crudos.

## 9.2 Caracterización enzima fitasa, celulasa y xilanasa respecto al pH y temperatura.

### 9.2.1 Caracterización fitasa.

**Tabla 30. Caracterización fitasa respecto al pH.**

<b>Muestras (1:500)</b>	<b>Actividad Específica (FTU/mg proteína)</b>
D3 (pH = 2,0)	5,61 ± 1,21
D3 (pH = 2,5)	8,62 ± 0,47
D3 (pH = 3,0)	10,22 ± 1,24
D3 (pH = 3,5)	14,42 ± 0,90
D3 (pH = 4,0)	23,04 ± 1,04
D3 (pH = 4,5)	35,06 ± 1,57
D3 (pH = 5,0)	52,09 ± 1,80
D3 (pH = 5,15)	39,66 ± 1,39
D3 (pH = 5,5)	34,26 ± 1,72
D3 (pH = 6,0)	23,44 ± 1,38
D3 (pH = 6,5)	14,02 ± 1,27
D3 (pH = 7,0)	9,41 ± 0,84
D3 (pH = 7,5)	5,21 ± 0,81

**Tabla 31. Caracterización fitasa respecto a la temperatura.**

<b>Muestras (1:500)</b>	<b>Actividad Específica (FTU/mg proteína)</b>
D3 (30°C)	8,69 ± 0,83
D3 (35°C)	15,63 ± 1,83
D3 (40°C)	16,40 ± 1,84
D3 (45°C)	26,62 ± 2,34
D3 (50°C)	33,56 ± 1,70
D3 (55°C)	38,96 ± 1,98
D3 (60°C)	70,21 ± 2,93
D3 (65°C)	47,65 ± 2,22
D3 (70°C)	34,95 ± 1,74
D3 (75°C)	24,69 ± 1,47
D3 (80°C)	15,24 ± 1,29

### 9.2.2 Caracterización celulasa.

**Tabla 32. Caracterización celulasa respecto al pH.**

<b>Muestras (1:50)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg proteína)</b>
R3 (pH = 3,0)	5,64 ± 0,30
F3 (pH = 3,0)	2,95 ± 0,31
R3 (pH = 4,0)	10,14 ± 0,22
F3 (pH = 4,0)	7,21 ± 0,32
R3 (pH = 5,0)	15,70 ± 0,34
F3 (pH = 5,0)	10,67 ± 0,32
R3 (pH = 6,0)	23,87 ± 0,40
F3 (pH = 6,0)	15,53 ± 0,23
R3 (pH = 7,0)	25,19 ± 0,47
F3 (pH = 7,0)	16,04 ± 0,23
R3 (pH = 8,0)	22,92 ± 0,45
F3 (pH = 8,0)	14,12 ± 0,23
R3 (pH = 9,0)	20,96 ± 0,37
F3 (pH = 9,0)	12,70 ± 0,22
R3 (pH = 10,0)	10,90 ± 0,31
F3 (pH = 10,0)	6,90 ± 0,21
R3 (pH = 11,0)	3,76 ± 0,19
F3 (pH = 11,0)	1,52 ± 0,31

**Tabla 33. Caracterización celulasa respecto a la temperatura.**

<b>Muestras (1:50)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg proteína)</b>
R3 (45°C)	13,40 ± 0,24
F3 (45°C)	8,03 ± 0,42
R3 (50°C)	21,05 ± 0,44
F3 (50°C)	12,62 ± 0,25
R3 (55°C)	18,79 ± 0,36
F3 (55°C)	11,41 ± 0,25
R3 (60°C)	23,22 ± 0,39
F3 (60°C)	14,25 ± 0,21
R3 (65°C)	11,89 ± 0,23
F3 (65°C)	7,43 ± 0,22
R3 (70°C)	8,11 ± 0,21
F3 (70°C)	4,47 ± 0,21
R3 (75°C)	5,56 ± 0,30
F3 (75°C)	2,64 ± 0,31



### 9.2.3 Caracterización xilanasa.

**Tabla 34. Caracterización xilanasa respecto al pH.**

<b>Muestras (1:50)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg proteína)</b>
R3 (pH = 3,0)	6,17 ± 0,26
F3 (pH = 3,0)	2,59 ± 0,26
R3 (pH = 3,5)	9,72 ± 0,27
F3 (pH = 3,5)	5,45 ± 0,26
R3 (pH = 4,0)	14,51 ± 0,29
F3 (pH = 4,0)	10,38 ± 0,28
R3 (pH = 4,5)	20,95 ± 0,43
F3 (pH = 4,5)	15,96 ± 0,30
R3 (pH = 5,0)	30,53 ± 0,49
F3 (pH = 5,0)	21,80 ± 0,34
R3 (pH = 5,4)	35,08 ± 0,43
F3 (pH = 5,4)	24,27 ± 0,36
R3 (pH = 6,0)	27,50 ± 0,37
F3 (pH = 6,0)	17,79 ± 0,31
R3 (pH = 6,5)	18,30 ± 0,42
F3 (pH = 6,5)	10,64 ± 0,28
R3 (pH = 7,0)	10,47 ± 0,27
F3 (pH = 7,0)	6,88 ± 0,26

**Tabla 35. Caracterización xilanasa respecto a la temperatura.**

<b>Muestras (1:50)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg proteína)</b>
R3 (30°C)	19,84 ± 0,28
F3 (30°C)	10,30 ± 0,27
R3 (35°C)	22,69 ± 0,30
F3 (35°C)	11,58 ± 0,18
R3 (40°C)	26,28 ± 0,31
F3 (40°C)	13,78 ± 0,29
R3 (45°C)	38,30 ± 0,37
F3 (45°C)	24,86 ± 0,36
R3 (50°C)	34,84 ± 0,36
F3 (50°C)	23,95 ± 0,35
R3 (55°C)	27,90 ± 0,32
F3 (55°C)	19,95 ± 0,33
R3 (60°C)	17,98 ± 0,19
F3 (60°C)	9,78 ± 0,27

### 9.3 Preparación reactivos usados en los ensayos para la determinación de actividad fitasa, celulasa, xilanasa y proteasa.

**Cuadro 6. Preparación reactivos ensayo actividad fitasa.**

**Buffer acetato 0,2 M pH = 5,15 (para 1 L):** Se pesan 11,772 g de acetato de sodio anhidro, luego se disuelve con un poco de H<sub>2</sub>O destilada y luego se le agregan 3,23 mL de ácido acético glacial y se afora finalmente a 1 L con H<sub>2</sub>O destilada.

**Disolución stock N° 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M (para 50 mL):** Se pesan 0,6805 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, finalmente se disuelve y se afora a 50 mL con buffer acetato 0,2 M pH = 5,15.

**Disolución stock N° 2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 μmol/mL (para 200 mL):** Se toman 4 mL de la disolución stock N° 1 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M y se afora finalmente a 200 mL con buffer acetato 0,2 M pH = 5,15.

**Disolución MgSO<sub>4</sub> 0,1 M (para 100 mL):** Se pesan 2,465 g de MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, finalmente se disuelve y se afora a 100 mL con buffer acetato 0,2 M pH = 5,15.

**Disolución ácido fítico 6,82 mM (para 100 mL):** Se pesan 0,63 g de ácido fítico, finalmente se disuelve y se afora a 100 mL con buffer acetato 0,2 M pH = 5,15 (debe prepararse el mismo día en que se realiza el análisis).

**Disolución ácido tricloroacético (TCA) al 10 % p/v (para 100 mL):** Se pesan 10 g de TCA, finalmente se disuelve y se afora a 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

**Reactivo Taussky - Shorr (para 200 mL):** Se agregan 20 mL de una disolución stock de molibdato de amonio al 10 % en ácido sulfúrico 10 N, luego se agregan 150 mL de H<sub>2</sub>O destilada, posteriormente se agregan 10 g de FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, finalmente se disuelve y se afora a 200 mL con H<sub>2</sub>O destilada (debe prepararse el mismo día en que se realiza el análisis).

### Cuadro 7. Preparación reactivos ensayo actividad celulasa.

**Buffer glicina - NaOH 0,05 M pH = 9,0 (para 1 L):** Se pesan 3 g de glicina y luego se disuelve con un poco de H<sub>2</sub>O destilada, luego se adicionan 0,4 g de NaOH, finalmente se disuelve y se afora a 1 L con H<sub>2</sub>O destilada.

**Disolución carboximetilcelulosa al 1% p/v en buffer glicina - NaOH (para 100 mL):** Se pesan 1 g de carboximetilcelulosa (CMC) y se agregan 50 mL de buffer glicina - NaOH 0,05 M pH = 9,0 con calentamiento y agitación constante para disolver el CMC, finalmente se afora a 100 mL con el mismo buffer.

**Disolución ácido tricloroacético (TCA) 0,3 M (para 200 mL):** Se pesan 9,8 g de TCA, finalmente se disuelve y se afora a 200 mL con H<sub>2</sub>O destilada.

**Reactivo DNS (para 500 mL):** Se agregan 100 mL de NaOH 2 N, luego se agregan 50 mL de una disolución de DNS al 1% en H<sub>2</sub>O destilada tibia (0,5 g en 50 mL), posteriormente se agregan 200 mL de H<sub>2</sub>O destilada para aumentar el volumen y después se agregan 150 g de tartrato de potasio y sodio tetrahidratado, finalmente se disuelve y se afora hasta 500 mL con H<sub>2</sub>O destilada.

### Cuadro 8. Preparación reactivos ensayo actividad xilanasas.

**Buffer citrato 0,05 M pH = 5,4 (para 1 L):** Se pesan 1,96 g de ácido cítrico monohidratado y luego se disuelve con un poco de H<sub>2</sub>O destilada, luego se adicionan 11,96 g de citrato de sodio dihidratado, finalmente se disuelve y se afora a 1 L con H<sub>2</sub>O destilada.

**Disolución Birchwood xilano al 0,5 % p/v en buffer citrato (para 100 mL):** Se pesan 0,5 g de Birchwood xilano y se agregan 50 mL de buffer citrato 0,05 M pH = 5,4 con calentamiento y agitación constante para disolver el soluto, finalmente se afora a 100 mL con el mismo buffer.

**Disolución ácido tricloroacético (TCA) 0,3 M (para 200 mL):** Se prepara de igual forma que para el ensayo celulasa.

**Reactivo DNS (para 500 mL):** Se prepara de igual forma que para el ensayo celulasa.

**Cuadro 9. Preparación reactivos ensayo actividad proteasa.**

**Buffer acetato 0,1 M pH = 4,0 (para 1 L):** Se pesan 1,26 g de acetato de sodio anhidro, luego se disuelve con un poco de H<sub>2</sub>O destilada y luego se le agregan 4,87 mL de ácido acético glacial y se afora finalmente a 1 L con H<sub>2</sub>O destilada.

**Disolución BSA al 1 % p/v en buffer acetato (para 10 mL):** Se toman 2 ml de una disolución comercial de BSA al 5 % y se afora hasta 10 mL con buffer acetato 0,1 M pH = 4,0.

**Disolución ácido tricloroacético (TCA) al 10 % p/v (para 100 mL):** Se pesan 10 g de TCA, finalmente se disuelve y se afora a 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

**Cuadro 10. Preparación reactivos determinación proteínas totales.**

**Disolución A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> x 10 H<sub>2</sub>O al 2 % p/v en NaOH 0,1 N) (para 500 mL):** Se pesan 10 g de carbonato de sodio decahidratado, finalmente se disuelve y se afora a 500 mL con NaOH 0,1 N.

**Disolución B1 (CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O al 1% p/v) (para 100 mL):** Se pesa 1 g de sulfato cúprico pentahidratado, finalmente se disuelve y se afora a 100 mL con H<sub>2</sub>O destilada.

**Disolución B2 (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>KNa x 4 H<sub>2</sub>O al 2 % p/v) (para 100 mL):** Se pesa 1 g de tartrato de potasio y sodio tetrahidratado, finalmente se disuelve y se afora a 100 mL con H<sub>2</sub>O destilada.

**Disolución C:** Se prepara en el momento en que realiza el análisis mezclando las disoluciones A, B1 y B2 en proporción 50: 0,5: 0,5 (en volumen).

**Reactivo Folin - Ciocalteu:** A partir de una disolución comercial 2 N se diluye hasta 1 N de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**9.4 Preparación dilución muestras extractos enzimáticos.** Todas las diluciones realizadas a las muestras de extractos enzimáticos en los diferentes estudios de la presente tesis se realizaron usando la siguiente fórmula:

Ejemplo: Cálculo de diluciones para un volumen de 5 mL

$$\frac{1 \times 5}{\text{N}^\circ \text{ veces diluida}} = \text{mL de muestra original de extracto}$$

**9.5 Fotografías de cultivos de *Aspergillus ficuum*.**



**Fotografía 1. Esporas brotadas de la cepa *Aspergillus ficuum* DSM 932.**



**Fotografía 2. Crecimiento *Aspergillus ficuum* cepa DSM 932 mediante SSF en torta de canola.**