



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA

CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE ENZIMAS PRODUCIDAS A
PARTIR DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

TESIS

Que como requisito parcial para
obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA

Presenta:

GABRIEL VEGA RAMÍREZ

Bajo la supervisión de: SALVADOR VALLE GUADARRAMA, DR.



Chapingo, Estado de México, diciembre de 2021



APROBADA

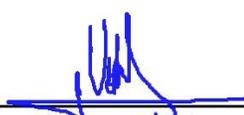


**CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE ENZIMAS PRODUCIDAS A
PARTIR DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO**

**Tesis realizada por GABRIEL VEGA RAMÍREZ bajo la supervisión
del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como
requisito parcial para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

DIRECTOR:



DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA

ASESORA:



**DRA. BLANCA ELIZABETH HERNÁNDEZ
RODRÍGUEZ**

ASESOR:



DR. ELEAZAR AGUIRRE MANDUJANO

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS	x
RESUMEN GENERAL	xi
GENERAL ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Objetivos.....	2
1.1.1. General	2
1.1.2. Específicos.....	2
1.2. Hipótesis.....	2
1.3. Organización de la tesis	3
1.4. Literatura citada	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Residuos agroindustriales.....	4
2.2. Residuos de naranja.....	4
2.3. Pectina	6
2.3.1. Clasificación de la pectina	8
2.4. Pectinasas	8
2.5. Pectinasas producidas por <i>Aspergillus</i> spp.	12

2.6. Aplicación de las pectinasas	12
2.6.1. Pectinasas ácidas	13
2.6.2. Pectinasas alcalinas	14
2.7. Métodos de producción de pectinasas.....	15
2.8. Fermentación en estado sólido (FES).....	16
2.8.1. Ventajas y desventajas de los procesos de fermentación sólido y líquido	16
2.8.2. Sustratos utilizados en la FES	17
2.8.3. Tipo de microorganismo empleados en FES.....	18
2.8.4. Factores que afectan la FES.....	19
2.9. Separación y purificación de enzimas	23
2.10. Literatura citada.....	25
3. CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS PRODUCIDAS A PARTIR DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	33
3.1. Resumen.....	33
3.2. Introducción	35
3.3. Materiales y métodos	36
3.3.1. Material vegetal	36
3.3.2. Cepa fúngica.....	36
3.3.3. Fermentación en estado sólido (FES) en reactores de columna	36
3.3.4. Caracterización fisicoquímica del sustrato fermentado	37
3.3.5. Extracción de enzimas mediante sistema ATPE	39
3.3.6. Determinación de contenido de proteína.....	39
3.3.7. Determinación de actividad pectinasa	40
3.3.8. Efecto del pH sobre la actividad pectinasa.....	40

3.3.9.	Efecto de la temperatura sobre la actividad pectinasa	41
3.3.10.	Estimación de la energía de activación (E_a).....	41
3.3.11.	Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad pectinasa	41
3.3.12.	Estimación de los parámetros cinéticos K_m y $v_{m\acute{a}x}$	41
3.3.13.	Diseño y análisis estadístico	42
3.4.	Resultados y discusión.....	42
3.4.1.	Caracterización fisicoquímica del sustrato fermentado	42
3.4.2.	Extracción de enzimas mediante sistema ATPE	46
3.4.3.	Contenido de proteína	47
3.4.4.	Actividad pectinasa.....	49
3.4.5.	Efecto del pH sobre la actividad pectinasa.....	50
3.4.6.	Efecto de la temperatura sobre la actividad pectinasa	51
3.4.7.	Energía de activación (E_a)	52
3.4.8.	Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad pectinasa	53
3.4.9.	Parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$	54
3.5.	Conclusiones	54
3.6.	Literatura citada.....	54
4.	CONCLUSIONES GENERALES.....	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química (% , BS) de algunos residuos agroindustriales.	5
Cuadro 2. Contenido de pectina de algunas frutas y vegetales.	5
Cuadro 3. Peso molecular de pectinas de distintas fuentes.	6
Cuadro 4. Clasificación de enzimas pécticas.	9
Cuadro 5. Enzimas pécticas producidas por <i>Aspergillus</i> sp.	12
Cuadro 6. Aplicación de enzimas para clarificación de jugos.	13
Cuadro 7. Microorganismos empleados en procesos de FES para la producción de enzimas.	20
Cuadro 8. Contenido de pectina y grado de esterificación.	46
Cuadro 9. pH del sistema ATPE.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la molécula de pectina.	7
Figura 2. Estructura secundaria de la pectina.	7
Figura 3. Acción de las poligalacturonasas	10
Figura 4. Acción de las pectinmetilesterasas	10
Figura 5. Acción de las pectinoliasas	11
Figura 6. Esquema general del sistema de FES en reactor de columna.	37
Figura 8. Variación de pH del sustrato durante la FES.	44
Figura 10. Contenido de proteína en el material de soporte.	48
Figura 11. Contenido de proteína en las fases del sistema ATPE.	49
Figura 12. Actividad pectinasa en las fases del sistema ATPE.....	50
Figura 13. Efecto del pH sobre la actividad pectinasa.	51
Figura 14. Efecto de la temperatura sobre la actividad pectinasa.....	52
Figura 15. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad pectinasa..	
.....	53

DEDICATORIA

*Para la mujer que me dio la vida, Carmen Ramírez Méndez,
mi inspiración y motor de vida en todo momento.*

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater la Universidad Autónoma Chapingo y al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y formar parte de esta gran familia.

A mi director de tesis, Dr. Salvador Valle Guadarrama, por su apoyo y confianza para la realización de la presente investigación.

A mis asesores, la Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez y al Dr. Eleazar Aguirre Mandujano, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias durante la realización y culminación de la presente investigación.

A mi familia, por brindarme la mano en los momentos más difíciles, compartir mis alegrías y darme siempre lo mejor a lo largo de mi vida.

A mis amigos y compañeros, por hacer más amena la estadía en el posgrado.

Al autor de este proyecto por su tiempo, paciencia, esfuerzo y dedicación en la realización y culminación de este trabajo.

GRACIAS

DATOS BIOGRÁFICOS

DATOS PERSONALES

Nombre	Gabriel Vega Ramírez
Fecha de nacimiento	26 de febrero de 1993
Lugar de nacimiento	Caxhuacan, Estado de Puebla
Profesión	Ingeniero Agroindustrial
Cédula profesional	11910238



DESARROLLO ACADÉMICO

Preparatoria	Ricardo Flores Magón
Licenciatura	Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN GENERAL

Caracterización cinética de enzimas producidas a partir de fermentación en estado sólido

La industria citrícola genera grandes cantidades de residuos con el desecho de cáscaras, membranas internas y semillas, las cuales, por su composición, pueden servir como sustratos en procesos de fermentación para la producción de bioproductos como proteínas y enzimas. Los objetivos del trabajo fueron producir enzimas pécticas mediante fermentación en estado sólido a partir de residuos de naranja y evaluar sus parámetros cinéticos, para favorecer el desarrollo de procesos de aprovechamiento de desperdicios agrícolas y agroindustriales. Se desarrolló un sistema de fermentación en estado sólido (FES) en columna, con aireación forzada y humedad controlada, usando el hongo filamentoso *Aspergillus niger* y residuos de naranja para la producción de enzimas pécticas, las cuales se separaron con extracción acuosa en dos fases (ATPE) con un sistema basado en polietilenglicol 6000 y sulfato de amonio. Se realizó la caracterización enzimática residual en diferentes rangos de pH, temperatura y concentración de sustrato. Con tiempos de fermentación de 48 h se tuvo contenido de proteína de 15.34 mg mL^{-1} en la fase superior de los sistemas ATPE y de 1.74 mg mL^{-1} en la fase inferior. No obstante, la actividad enzimática fue mayor en la fase inferior (39.72 U) que en la superior (35.38 U) y ello se mantuvo aún con 72 h de fermentación, donde los valores fueron 41.88 y 36.07 U, respectivamente, lo que indicó la presencia de otras enzimas, además de pectinasas. El pH, la temperatura y la concentración de sustrato óptimo de las enzimas fueron 6.0, $50.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.28 mM , respectivamente. Las enzimas pécticas producidas por *A. niger* presentaron una cinética del tipo Michaelis-Menten. La fermentación en estado sólido es un proceso con potencial para producir enzimas pécticas a partir de residuos de naranja.

Palabras clave: *Aspergillus niger*, caracterización cinética, extracción acuosa en dos fases, fermentación en estado sólido, residuos de naranja, pectinasas.

Tesis de Maestría en Ciencias, Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Gabriel Vega Ramírez.

Director de tesis: Dr. Salvador Valle Guadarrama.

GENERAL ABSTRACT

Characterization of enzymes produced through solid state fermentation

The citrus processing industries generate large amounts of waste with the disposal of peels, internal membranes and seeds, which, due to their composition, can serve as substrates in fermentation processes to produce bio-products such as proteins and enzymes. The work aimed evaluating the kinetic parameters of pectic enzymes produced by solid state fermentation from orange residues to favor the development of processes for the use of agricultural wastes. A solid-state fermentation (SSF) system was developed in columns with forced aeration and controlled humidity using the filamentous fungus *Aspergillus niger* and orange residues to produce pectic enzymes, which were separated with an aqueous two-phase extraction (ATPE) technique with a system based on polyethylene glycol 6000 and ammonium sulfate. The residual enzymatic characterization was carried out at different pH ranges, temperature and substrate concentration. There was a protein content of 15.34 mg mL⁻¹ in the upper phase of ATPE systems and 1.74 mg mL⁻¹ in the lower phase with fermentation times of 48 h. However, the enzymatic activity was higher in the lower phase (39.72 U) than in the upper phase (35.38 U) and this was maintained even with 72 h of fermentation, where values were 41.88 and 36.07 U, respectively, which indicated the presence of other enzymes in addition to pectinases. The pH, temperature, and optimal substrate concentration of the enzymes were 6.0, 50.0 °C and 0.28 mM, respectively. Pectic enzymes, produced by *A. niger* showed Michaelis-Menten-type kinetics. Solid state fermentation is a process with the potential to produce pectic enzymes from orange residues.

Key words: *Aspergillus niger*, kinetic characterization, orange wastes, pectinases, solid-state fermentation, aqueous two-phase extraction.

Thesis of Master Science, Program of Agro-Food Science and Technology, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Gabriel Vega Ramírez.

Thesis Director: Salvador Valle Guadarrama, Dr.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Diversos residuos agroindustriales considerados contaminantes, son ricos en compuestos bioactivos como antioxidantes, polifenoles, pigmentos, proteínas, entre otros (Kumar et al., 2018). Este hecho sugiere que tales materiales pueden ser la base de procesos enfocados a la recuperación de compuestos de alto valor agregado, o bien, emplearse como sustratos para la producción de otro tipo de sustancias, como biocombustibles, proteínas, enzimas, vitaminas, antioxidantes, antibióticos, etc., a través de su transformación por medio de procesos como la fermentación, ya sea en estado sumergido o sólido (Abu et al., 2017).

La fermentación en estado sólido (FES) se fundamenta en la inducción del desarrollo de hongos como *Aspergillus* spp. (Colla et al., 2015) o *Rhizopus oligosporus* (Dulińska et al., 2017) sobre un sustrato con bajo contenido de humedad. Este procedimiento biotecnológico se ha utilizado para la preparación de alimentos fermentados durante siglos (Bassi et al., 2015); ha cobrado relevancia sobre la fermentación en estado sumergido debido a su simplicidad, capacidad para la bioconversión de sustratos sólidos de bajo coste y por la mayor eficiencia productiva (Hölker et al., 2004). También, al haber ausencia de fase líquida en la FES, se reduce la emisión de aguas residuales y disminuye el riesgo de contaminación bacteriana.

Los residuos de naranja son materiales con alto contenido de pectina, por lo que pueden ser utilizados como sustrato en la FES para inducir la síntesis de pectinasas, las cuales son un grupo heterogéneo de enzimas que catalizan la despolimerización y desmetoxilación de sustratos que contienen pectina a través de la escisión enzimática de los enlaces α -1, 4-glicosídicos de los ácidos poligalacturónico y péctico. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidas por plantas, bacterias, levaduras y hongos (Jeilu y Abate, 2017). El potencial biotecnológico que tienen las pectinasas se debe a su

aplicación en procesos agroindustriales como la clarificación de jugo de frutas, y vino, fermentación de café y té, tratamiento de aguas residuales de la industria juguera, el desgomado en la industria del papel, entre otros (Khalil et al., 2020). Por otro lado, el uso de pectinasas puede constituir una estrategia para favorecer la extracción de compuestos bioactivos de diversas matrices vegetales. Al respecto, debido a la estructura de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y sustancias pécticas, principalmente) de frutos y vegetales, la simple maceración o trituración de estos no permiten una buena extracción de nutrientes, compuestos bioactivos o bioproductos. En este sentido, en el presente trabajo se pretende producir pectinasas a partir de residuos de naranja por fermentación en estado sólido e identificar, mediante la literatura, sus posibles aplicaciones.

1.1. Objetivos

1.1.1. General

Caracterizar la cinética de las pectinasas producidas por fermentación en estado sólido de residuos de naranja y con base en la revisión de literatura, sus posibles aplicaciones.

1.1.2. Específicos

- Aplicar un procedimiento de fermentación en estado sólido en un reactor de columna para la producción de pectinasas.
- Aplicar la técnica de extracción acuosa en dos fases para separar las pectinasas de los sólidos fermentados.
- Evaluar la actividad pectinasa a diferentes tiempos de fermentación en estado sólido y separadas mediante extracción acuosa.
- Evaluar la cinética enzimática en diferentes valores de pH, temperatura y concentración de sustrato.

1.2. Hipótesis

Los parámetros cinéticos (k_m y $v_{m\acute{a}x}$), así como los valores de pH y temperatura, óptimos, permiten determinar las características de las pectinasas producidas por *Aspergillus niger* en fermentación en estado sólido.

1.3. Organización de la tesis

El presente trabajo se organizó como a continuación se menciona: el acondicionamiento del material de fermentación, posteriormente la activación y desarrollo de la cepa fúngica, *Aspergillus niger*, enseguida el desarrollo del proceso de fermentación, la separación de las pectinasas por el método de ATPE y la determinación de las características fisicoquímicas y cinéticas de las enzimas pécticas.

1.4. Literatura citada

- Abu, N., Barrena, R., Komilis, D. & Sanchez, A. (2017). solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review. *Sustainability*, 9 (2), 224-233. <https://dx.doi.org/10.3390/su9020224>
- Bassi, D., Puglisi, E. & Cocconcelli, S. (2015). Comparing natural and selected starter cultures in meat and cheese fermentations. *Current Opinion in Food Science*, 2 (4), 118-122. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.002>
- Colla, L., Ficanha, A., Rizzardi, J., Bertolin, T., Reinehr, C. & Vieira, J. (2015). Production and characterization of lipases by two new isolates of *aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 22 (12), 327-337. <https://dx.doi.org/10.1155/2015/725959>
- Dulińska, R., Janiszewska, A., Byczyńska, Ł. & Błaszczuk, U. (2017). Myo-inositol phosphates profile of buckwheat and quinoa seeds: effects of hydrothermal processing and solid-state fermentation with *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Food Properties*, 20 (9), 2088-2095. <https://dx.doi.org/10.1080/10942912.2016.1230871>
- Jeilu, O. (2017). Pectinase: substrate, production and their biotechnological applications. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2 (3), 1007-1014. <https://dx.doi.org/10.22161/ijeab/2.3.1>
- Khalil, M., Khattak, S., Ali, Q., Anver, J. & Malik, A. (2020). Isolation and chracterization of pectinase producing *Aspergillus niger* from orange. *International Journal of Botany Studies*, 5 (2), 45-48. <https://dx.doi.org/10.1020/1394912.2016.12.871>
- Kumar, B., Amit, K., Alok, K. & Dharm, D. (2018). Wheat bran fermentation for the production of cellulase and xylanase by *Aspergillus niger* NFCCI 4113. *Research Journal of Biotechnology*, 13 (5), 11-18. <https://dx.doi.org/10.15.3709/ka5020824>

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Residuos agroindustriales

La demanda en la producción de alimentos ha promovido un aumento en la generación de desechos agroindustriales, los cuales, en su mayoría, poseen alto contenido de nutrientes (Cuadro 1) o sustancias que pueden ser aprovechados para la obtención de productos de alto valor agregado. Alrededor del mundo, se generan de 520 a 650 millones de toneladas anuales de residuos provenientes de frutas y hortalizas (Ravindran et al., 2018) y tan solo en México, González et al. (2015) afirman que se generan 76 millones de toneladas de residuos de frutas (limón, peras, manzanas, papaya, piña, plátano, naranja) y vegetales (maíz, caña de azúcar, frijol, col, zanahoria, tomate, lechuga, papa). Aunque en el pasado estos residuos se veían como un gran problema, en el escenario actual se les ve como parte de una estrategia clave para el desarrollo de otro tipo de procesos sostenibles que permita el aprovechamiento de estos. En este contexto, se han estudiado y aplicado varias tecnologías nuevas y respetuosas con el medio ambiente, incorporando tales materiales como sustrato para la producción de compuestos bioactivos como como proteínas, enzimas, biocombustibles, vitaminas, antibióticos, entre otros (Din y Ceccato, 2020; Cantão et al., 2021).

2.2. Residuos de naranja

Los cítricos constituyen un importante grupo de cultivos frutales que se producen en todo el mundo y que incluyen: naranja agria y dulce, lima, mandarina y limón. Durante el procesamiento de los jugos de estas frutas, las agroindustrias generan una gran cantidad de residuos sólidos, pues de acuerdo con Ladero et al. (2017), la producción o transformación de naranjas en jugo genera aproximadamente 30 millones de toneladas anuales de residuos. Estos residuos están conformados de la capa externa de la naranja (flavedo), que contiene una gran cantidad de aceites esenciales, limoneno, principalmente, y flavonoides; y una capa interna blanca y esponjosa (albedo), que es rica en pectina. Los residuos de naranja, en

general, contienen lignina y proteínas en cantidades bajas, cantidades considerables de celulosa y hemicelulosa, y cantidades aún mayores de pectina (Erukainure et al., 2016).

Cuadro 1. Composición química (% , BS) de algunos residuos agroindustriales.

Residuo agroindustrial	Proteína	Carbohidratos	Grasa	Fibra cruda	Ceniza	Pectina
Salvado de arroz	38.2	14.1	30.4	26.9	3.4 a 8.1	-
Salvado de trigo	13.2 a 18.4	56.8	3.5 a 3.9	33.4 a 63.0	3.9 a 8.1	-
Orujo de aceituna crudo	0.4	34.8	16.7	-	6.6	-
Cáscara de yuca	1.7	75.5	3.1	11.2	2.4	-
Cáscara de plátano	0.6	79.0	3.0	9.3	2.7	-
Cáscara de naranja	7.9	30.0	-	-	14.4	7.9

Fuente: Ravindran et al. (2018).

Cuadro 2. Contenido de pectina de algunas frutas y vegetales.

Fruta/Vegetal	Tejido	Pectina (%)
Manzana	Fresco	0.5-1.6
Plátano	Fresco	0.7-1.2
Melocotón	Fresco	0.1-0.9
Fresa	Fresco	0.6-0.7
Cereza	Fresco	0.2-0.5
Cáscara de naranja	Materia seca	12.4-24.0
Zanahoria	Materia seca	6.9-18.6
Jitomate	Materia seca	2.4-4.6

Fuente: Singh et al. (2005).

2.3. Pectina

Se trata de macromoléculas glicosídicas complejas (polisacáridos) de alto peso molecular, cargadas negativamente y ácidas (Figura 1), presentes en el reino vegetal. Es el componente principal de la lamela media entre las células y se encuentra en forma de pectato de calcio y pectato de magnesio (Ahmed et al., 2019). Las sustancias pécticas representan el 0.5-4.0 % del peso fresco del material vegetal (Cuadro 2). Al contrario de las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, las sustancias pécticas al ser polisacáridos, no tienen un peso molecular definido y las masas moleculares relativas oscilan entre 25 a 360 kDa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Peso molecular de pectinas de distintas fuentes.

Fuente	Peso molecular (kDa)
Manzana y limón	200-360
Pera y ciruela	25-35
Naranja	40-50
Pulpa de remolacha	40-50

Fuente: Singh et al. (2005).

El componente más abundante de la pectina es el ácido galacturónico, el cual forma el esqueleto principal de la molécula, que consiste en una cadena de residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces α (1→4) (Figura 1). Estos residuos pueden estar parcialmente metilados, esterificados en el C-6 con alcohol metílico, siendo el grado de metilación variable según el origen de la pectina. La pectina también contiene con frecuencia residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa. La ramnosa generalmente forma parte de la cadena principal, mientras que la arabinosa y la galactosa se encuentran en las cadenas laterales unidas a la cadena principal formando ramificaciones (Heredia, 1995).

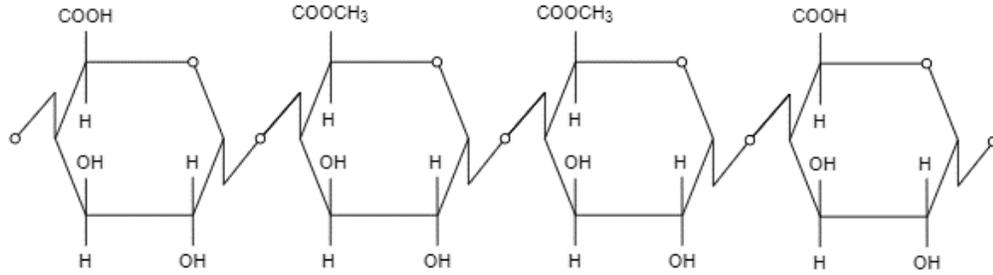


Figura 1. Estructura de la molécula de pectina. Cadena de ácido poligalacturónico parcialmente metilesterificado.

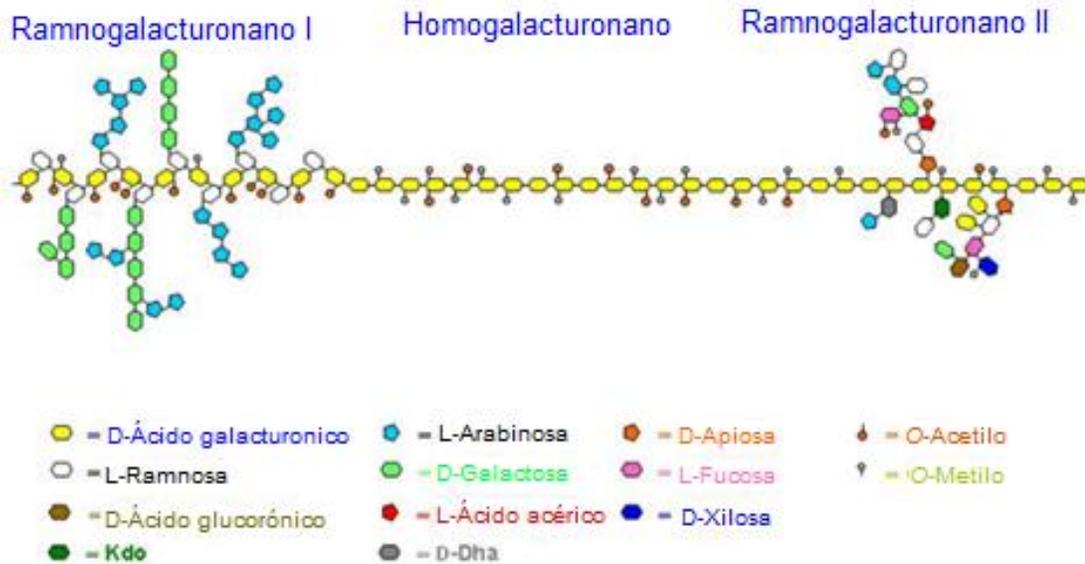


Figura 2. Estructura secundaria de la pectina.

Las pectinas son heteropolisacáridos complejos que contienen dos regiones definidas. La región lisa o bien, homogalacturonano consiste en un esqueleto de residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces α (1 \rightarrow 4), los cuales pueden estar acetilados en el C-2 o en el C-3, o metilados en el C-6. La región rugosa o ramnogalacturonano I es un heteropolímero en el que los residuos de ácido D-galacturónico del esqueleto están interrumpidos por residuos de L-ramnosa unidos por enlaces α (1 \rightarrow 2), a los cuales pueden unirse largas cadenas de arabinano y galactano mediante el C-4 (Figura 2). El ramnogalacturonano II

es un polisacárido de 30 unidades que contiene un esqueleto de ácido galacturónico, sustituido por cuatro cadenas laterales que contienen ramnosa, arabinosa y azúcares poco comunes como apiosa y metilfucosa (Soriano, 2004). Se desconoce si el ramnogalacturonano II está unido covalentemente a la cadena principal de pectina.

2.3.1. Clasificación de la pectina

a) Pectina de alto metoxilo: aquellas en las cuales más del 50 % de los grupos carboxilos del ácido galacturónico del polímero se encuentra esterificado con metanol. El grado de esterificación de las pectinas de alto metoxilo influye mucho sobre sus propiedades, en particular, a mayor grado de esterificación, mayor es la temperatura de gelificación. Estas pectinas son capaces de formar geles en condiciones de pH entre 2,8 y 3,5 y un contenido de sólidos solubles (azúcar) entre 60 % y 70 %.

Las pectinas de alto metoxilo pueden subdividirse en 2 grupos: las de gelificación rápida (Rapidset), o sea menor a 5 minutos y tiene un grado de esterificación con metanol entre el 68 y el 75 %. El otro grupo es de gelificación lenta (Slowset) es decir gelifican después de 5 minutos y tienen entre 60 y 68 % de esterificación con metanol (Linares, 2015).

b) Pectina de bajo metoxilo: aquellas en las cuales menos del 50 % de los grupos carboxilo están esterificados con metanol. Para la formación de gel requieren la presencia de cationes divalente, generalmente calcio. En este caso la formación del gel ocurre por la formación de enlaces de dichos cationes con moléculas de pectina, formando una red tridimensional con los grupos carboxilo de esta. Los geles se pueden obtener entre pH 1 a 7; el pH no afecta la textura del gel ni el intervalo de sólidos solubles y puede fluctuar entre 0 y 80 %, pero la presencia de calcio (40 a 100 mg) es el factor predominante en la formación del gel (Linares, 2015).

2.4. Pectinasas

Las pectinasas son un grupo heterogéneo de enzimas que catalizan la despolimerización y desmetoxilación de sustratos que contienen pectina a través

de la escisión enzimática de los enlaces α -1, 4-glicosídicos de los ácidos poligalacturónico y péctico. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidas por bacterias, levaduras, hongos y plantas (Jeilu y Abate, 2017).

Global Pectinase Market Research Report (207), indica que las pectinasas están mostrando un incremento acelerado en su mercado, pues han mantenido una tasa media de crecimiento anual del 2.86 %, pasando de 27.6 millones de dólares en 2013 a 30 millones de dólares en 2016, y estimó que se impulsaría hasta 35.5 millones de dólares en 2021.

Las enzimas pécticas se clasifican en tres principales tipos: enzimas desesterificantes (pectinoesterasas), enzimas despolimerizantes (hidrolasas y liasas) y protopectinasas. La IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) asignó los números EC (Enzyme Commission) descritos en el Cuadro 4 para estas enzimas.

Cuadro 4. Clasificación de enzimas pécticas.

Nombre y tipo	Número de EC	Sustrato	Sitio de corte
<i>Hidrolasas</i>			
Endo poligalacturonasa	3.2.1.15	Pectato	Al azar en el interior de la cadena
Exo poligalacturonasa	3.2.1.67	Pectato	Terminal
<i>Esterasas</i>			
Pectinoesterasa	3.1.1.11	Pectina	Desesterificación
<i>Liasas</i>			
Endo pectinoliasa	4.2.2.10	Pectato	Al azar en el interior de la cadena
Endo pectatoliasa	4.2.2.2	Pectato	Al azar en el interior de la cadena
Exo pectatoliasa	4.2.2.9	Pectato	Terminal

Fuente: Badui (2006); Jeilu y Abate (2017).

Badui (2006) describe algunas características de las enzimas pécticas como se muestra a continuación:

a) Poligalacturonasas (PG): rompen el enlace glicosídico α -(1-4) del ácido galacturónico de las pectinas (Figura 3) por una acción que se puede llevar

a cabo tanto en el interior del polímero (endo) como a partir de los extremos (exo); cuando lo hacen en el interior, la viscosidad se reduce rápidamente; y cuando actúan a partir de los extremos, producen moléculas libres de ácido galacturónico y la viscosidad no se afecta tan rápidamente; junto con la pectinmetilesterasa integran el sistema de pectinasas de las frutas.

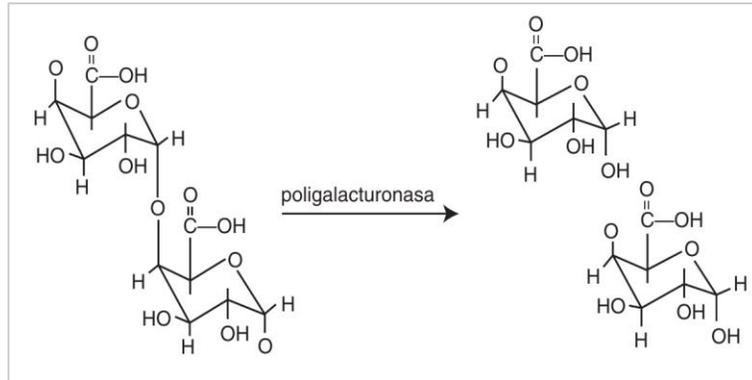


Figura 3. Acción de las poligalacturonas (Badui, 2006).

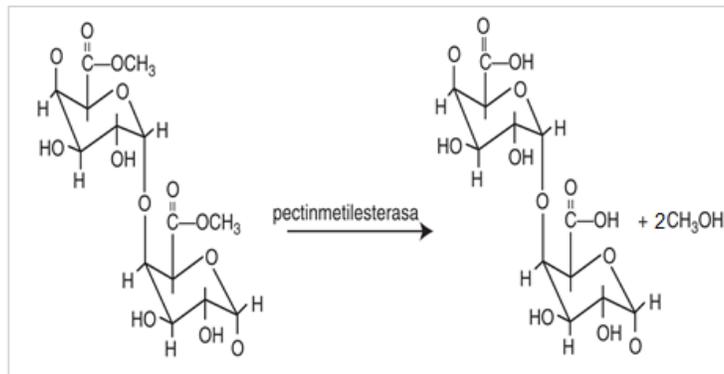


Figura 4. Acción de las pectinmetilesterasas (Badui, 2006).

b) Pectinometilesterasas o pectinoesterasas (PE): al hidrolizar los enlaces éster metílico, liberan metanol (que a veces se asocia erróneamente a la fermentación de frutas) y producen pectinas de bajo metoxilo e incluso ácido poligalacturónico (Figura 4). Son abundantes e importantes en las frutas, sobre todo en cítricos como la naranja. Son sintetizadas por hongos, bacterias, levaduras y plantas superiores. Las pectinesterasas de hongos

filamentosos y levaduras son activas a pH entre 3 y 5, las bacterianas entre 7 y 8 y se inactivan por calentamiento a 80 °C.

c) Pectinoliasas o pectinotranseliminadas (PL): son las liasas de mayor importancia en la tecnología de alimentos; su acción produce dobles ligaduras entre los carbonos 4 y 5 de la molécula de ácido D-galacturónico, lo que trae como consecuencia el rompimiento del enlace glicosídico por β -eliminación, principalmente en las pectinas de alto metoxilo (Figura 5). No se encuentran en las frutas; sólo las producen los microorganismos, por lo que las contaminaciones microbianas de las frutas (antes o después de la cosecha) traen consigo un deterioro muy grave en la calidad y vida de anaquel del producto.

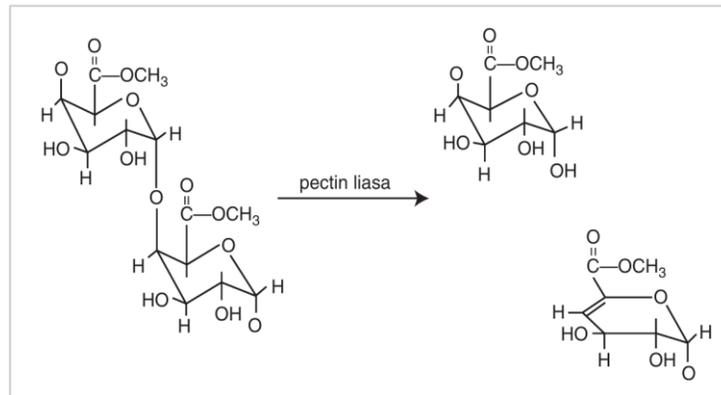


Figura 5. Acción de las pectinoliasas (Badui, 2006).

d) Pectatoliasas (PGL): actúan en las pectinas de bajo metoxilo, con una acción similar a la descrita para la pectinoliasa; sólo las producen las bacterias y no se encuentran en forma natural en los vegetales.

e) Protopectinasas: tienen la función de transformar la protopectina de las frutas inmaduras (pectina asociada con celulosa) en pectina de bajo metoxilo. Se clasifican en enzimas tipo A, que degradan el ácido poligalacturónico de la protopectina y tipo B que degrada las cadenas de polisacáridos que conectan el ácido poligalacturónico con otros constituyentes de la pared celular.

2.5. Pectinasas producidas por *Aspergillus* spp.

Diversas especies del género *Aspergillus* se utilizan para la producción de enzimas, en la fermentación de alimentos, la biotecnología y la producción de productos farmacéuticos. Por ejemplo, *Aspergillus oryzae* se utiliza ampliamente para las fermentaciones de alimentos tradicionales en el este de Asia (Ichishima, 2016). Adicionalmente *Aspergillus niger* se utiliza para la producción de enzimas (amilasas y pectinasas) y ácidos orgánicos (ácido cítrico).

Las pectinasas de *Aspergillus niger* han sido ampliamente producidas y utilizadas comercialmente a gran escala. Algunas de las pectinasas que *Aspergillus* spp. produce se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Enzimas pécticas producidas por *Aspergillus* sp.

Microorganismo	Enzima	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Endo-PG I	4.0	55
	Endo-PG II	4.1	50
	Endo-PG II	4.3	55
<i>Aspergillus giganteus</i>	Exo-PG	6.0	55
	PL	8.5	50
<i>Aspergillus kawakii</i>	Endo-PG I	4.5	50
<i>Aspergillus niger</i>	PG	4.6	40
	PGL (PeL I)	6.0	50
	PGL (PeL II)	4.6	50
	PGL (PeL III)	4.2	35
<i>Aspergillus japonicus</i>	PL	4.5-5.5	-

Fuente: Soo et al. (2017).

2.6. Aplicación de las pectinasas

Las pectinasas microbianas representan alrededor del 10 % de la producción total de enzimas en el mercado mundial (Jeilu y Abate, 2017). Las pectinasas ácidas se utilizan principalmente en la extracción y clarificación de jugos de frutas y vinos, pero las pectinasas alcalinas tienen diversas aplicaciones económicas y

respetuosas con el medio ambiente en los sectores industriales como la papelera y el tratamiento de aguas residuales de jugueras y la de alimentos para animales.

Cuadro 6. Aplicación de enzimas para clarificación de jugos.

Jugo	Microorganismo/Enzima	Resultados	Referencia
Manzana	<i>Aspergillus niger</i> / Pectinasas	Reducción de la viscosidad en 7.2 %	Mahmoodi et al. (2017)
Naranja	<i>Aspergillus awamori</i> / Pectinasa y xylanasa	95 % de clarificación	Diaz et al. (2013)
Plátano	<i>Penicillium oxalicum</i> CZ1028/ Endo-poligalacturonasa ácida	Clarificación del zumo de plátano a 45 °C durante 1 h	Cheng et al. (2017)
Papaya	<i>Penicillium oxalicum</i> CZ1028/ Endo-poligalacturonasa ácida	Reducción del 78.3 % en la viscosidad y un aumento del 43.3 % en la transmisión a 660 nm	Cheng et al. (2017)
Piña	<i>Aspergillus niger</i> / Pectin metilesterasa	Clarificación del jugo de piña	Patidar et al. (2016)
Uva	<i>Talaromyces leycettanus</i> / Poligalacturonas (exo y endo)	140 % de eficiencia en la degradación de la pectina con una mejora de la transmitancia de la luz del 14 al 82 %.	Li et al. (2017)

2.6.1. Pectinasas ácidas

Las enzimas pécticas ácidas son utilizadas en las industrias de jugos de frutas y la elaboración del vino. Proceden principalmente de fuentes fúngicas, especialmente de *Aspergillus niger* (Amin et al., 2018). Algunas aplicaciones de las pectinasas ácida son las siguientes:

a) Industria juguera

El jugo de fruta es naturalmente turbio debido principalmente a la presencia de polisacáridos de pectina (Sharma et al., 2017). Durante la maduración, la pectina es degradada por las enzimas naturales de las frutas, lo que resulta en el ablandamiento los tejidos de la pared celular y pectina más soluble (Cafall y

Mohnen, 2009). La alta concentración de esta conduce a la formación de coloides en el jugo, que conlleva a problemas en la obtención de jugos claros o visiblemente aceptable para los consumidores, como se ha estudiado previamente (Cuadro 6).

b) Maceración de tejidos

Otra aplicación importante de las pectinasas ácidas es sobre el tejido organizado que se transforma en una suspensión de células intactas debido a la hidrólisis de la protopectina por la acción de las protopectinasas, liberando de esta manera la pectina soluble, dando como resultado la separación de las células y es importante en la industria alimentaria, así como en el campo de la biotecnología. El proceso puede aplicarse para la licuefacción y sacarificación de la biomasa y el aislamiento de protoplastos (Garg et al., 2016).

c) Procesamiento del vino

La adición de pectinasas durante la trituración de la uva aumenta el rendimiento del jugo y también acelera la liberación de antocianinas. El tratamiento con pectinasa en la fase de pre-fermentación o fermentación elimina las partículas en suspensión. Después de la fermentación, se añade la enzima al vino para aumentar su claridad y la tasa de filtración (Garg et al., 2016).

2.6.2. Pectinasas alcalinas

Se utilizan principalmente en el desgomado y pretratamiento de aguas residuales de la industria de jugos de frutas. Estas enzimas proceden principalmente de fuentes bacterianas. En el sector industrial, las pectinasas alcalinas proceden principalmente de *Bacillus* spp. (Sudeep et al., 2020). Algunas de sus aplicaciones son las siguientes:

a) Retintado y desgomado de las fibras vegetales del líber

Las fibras de líber son las fibras blandas que se forman en grupos fuera del xilema, el floema o el periciclo, por ejemplo, el ramio y el cáñamo solar. Las fibras contienen goma, que debe ser eliminada antes de su uso para la fabricación de textiles. El tratamiento químico de desgomado es contaminante, tóxico y no

biodegradable. El desgomado biotecnológico utiliza pectinasas en combinación con xilanasas y representa una alternativa ecológica y económica al problema anterior (Rebello et al., 2017).

b) Tratamiento de las aguas residuales de los cítricos (naranja)

Las aguas residuales de la industria de procesamiento de cítricos contienen materiales pécticos que apenas son descompuestos por los microbios durante el tratamiento de lodos activados. El pretratamiento de estas aguas residuales con enzimas pectinolíticas facilita la eliminación de los materiales pécticos y los hace aptos para su descomposición mediante el tratamiento de lodos activados (Jeilu y Abate, 2017).

c) Industria del papel y la pasta de papel

Durante la fabricación de papel, las pectinasas pueden despolimerizar las pectinas y posteriormente reducir la demanda catiónica de las soluciones de pectina y el filtrado del blanqueo con peróxido (Jeilu y Abate, 2017).

d) Alimento para animales

Las pectinasas se utilizan en coctel enzimáticos, los cuales son empleado para la producción de alimentos para animales, reduciendo la viscosidad del pienso, lo cual aumenta la liberación y absorción de nutrientes, mediante la hidrólisis de fibras biodegradables o por liberación de nutrientes bloqueados por estas fibras y se reduce la cantidad de heces (Jeilu y Abate, 2017).

2.7. Métodos de producción de pectinasas

Kavuthodi y Sebastian (2018) mencionan que el 50 % de las enzimas accesibles en el mercado se obtienen de hongos y levaduras, 35 % de bacterias, mientras que el 15 % restante son de origen vegetal o animal.

Las pectinasas que existen en el mercado son principalmente extracelulares, estas se sintetizan de sustancias pécticas en condiciones de fermentación en cultivo sumergido (FCS) o fermentación en estado sólido (FES), ambos métodos

emplean microorganismos como bacterias, hongos, levaduras o una asociación de estos.

2.8. Fermentación en estado sólido (FES)

La fermentación en estado sólido (FES) se define como el proceso mediante el cual se induce el crecimiento y desarrollo de microorganismos, hongos y levaduras principalmente, en material insoluble, sin agua libre o con un contenido muy bajo. Tiene importancia histórica para la humanidad, pues desde hace miles de años se ha utilizado para la elaboración de alimentos. En los países occidentales se utilizaba para elaborar pan y queso; y en los orientales, el Koji (Abdul y Webb, 2017). En las últimas décadas tomó interés para la producción de importantes biomoléculas, como proteínas, y productos para muchas industrias, como la alimentaria, farmacéutica, textil, bioquímica y bioenergética, entre otras (Soccol et al., 2017; Lizardi y Hernández, 2017).

2.8.1. Ventajas y desventajas de los procesos de fermentación sólido y líquido

La fermentación en estado sólido (FES) presenta ventajas y desventajas en comparación con el proceso de fermentación en estado líquido (FEL), la primera no requiere de mucho control, es económica, al no ser necesario el enriquecimiento del material de soporte, ya que estos contienen normalmente el nutriente apropiado para que los microorganismos desarrollen el proceso, se requieren bajos gastos de energía, pues no hay formación de espuma, es fácil de implementar y se obtienen altos rendimientos en la producción. Algunas desventajas se presentan cuando los costos de proceso se elevan, ya que se requiere eliminar el calor metabólico generado por los microorganismos, la extracción del producto final y su purificación requiere la aplicación de técnicas caras para reducir los altos volúmenes a nivel industrial. La segunda dispone de una gran cantidad de agua libre, lo que hace que los nutrientes se encuentran en solución, también se pueden emplear una amplia variedad de microorganismos; sin embargo, es más costosa ya que su control es más sofisticado, la solubilidad de O₂ en el agua es poca, lo que hace necesario el uso de equipo para la

agitación y la aireación forzada, con mayor necesidad de energía, además ocupa más espacio para evitar la contaminación por hongos y levaduras mediante técnicas de esterilización de aire y de los desechos, debido a que muchos metabolitos tales como antibióticos, se producen por un crecimiento lento en medios ricos que pueden ser contaminados. Las concentraciones de reactivos y productos son bajas, los procesos de recuperación son caros al igual que en el cultivo sólido lo que representa un factor en la economía total de ambos procesos (Abu et al., 2017; Abdul y Webb, 2017; Amin y Bilal, 2018).

Se optó conducir un proceso de FES por los costos menores de operación que representa, bajos requerimientos de energía, edificación de plantas y equipos más simples y fácilmente escalables a nivel industrial, mayor producción de enzimas y menor generación de efluentes en comparación con la fermentación líquida y el uso de residuos agroindustriales como material de soporte, que contribuye a mitigar la contaminación ambiental.

2.8.2. Sustratos utilizados en la FES

Abu et al. (2017) indican que la selección de los sustratos adecuados desempeña un papel fundamental en la producción eficaz y económica del producto deseado. A la hora de seleccionar el sustrato adecuado para el proceso de FES, es importante considerar la disponibilidad, el costo, la composición y suministro de los nutrientes adecuados para el desarrollo de los microorganismos. En este sentido, los residuos orgánicos procedentes de la agricultura, el procesamiento industrial y los residuos alimentarios domésticos, cumplen con dichas características (Farinas, 2015). Además, al utilizar estos residuos orgánicos como sustratos se pueden minimizar problemas de contaminación ambiental. Por lo general, los sustratos sólidos utilizados en la FES pueden clasificarse en cinco grupos principales:

a) Sustratos amiláceos: Los sustratos amiláceos que se han utilizado en la FES incluyen el arroz (Kumar et al., 2017), la cebada (Nelofer et al., 2018), la avena (Bei et al., 2017), maíz (Chen et al., 2021) y cáscara de plátano (Almanaa et al., 2020). Al ser ricos en carbohidratos (importante fuente de

carbono en procesos de fermentación microbiana), son hidrolizados para producir azúcares simples que pueden ser consumidos fácilmente por los microorganismos.

- b) Sustratos proteicos:** Las tortas de aceite, como el de canola (Treichel et al., 2016), colza (Shi et al., 2017) y oliva (Ali et al., 2017), son una fuente ideal de nutrientes proteicos (fuente de nitrógeno en fermentaciones microbianas), que, apoyadas por otros nutrientes como carbohidratos y minerales, ofrecen una amplia gama de sustratos alternativos para la producción de diversas enzimas como proteasas y lipasas.
- c) Sustratos celulósicos o lignocelulósicos:** La mayoría de los residuos agrícolas contienen altos niveles de celulosa o lignocelulosa, que tienen el potencial de ser utilizados como sustratos sólidos en la FES. Estos incluyen el bagazo de caña de azúcar (Biz et al., 2016), el salvado de trigo (Tu et al., 2020), cáscara de arroz (Young et al., 2019), entre otros. En este caso, los hongos celulolíticos y ligninolíticos son capaces de degradar celulosa compleja y lignocelulosa para producir azúcares simples.
- d) Sustratos con azúcares solubles:** Los sustratos sólidos que contienen una cantidad significativa de azúcares solubles pueden obtenerse a partir del procesamiento de frutas como la remolacha (Martínez et al., 2018), el orujo de uva (Teles et al., 2019), el orujo de manzana (Phatania et al., 2018), entre otros.
- e) Medios definidos y soporte inerte:** Existen varios soportes inertes que pueden utilizarse para simular las condiciones de una FES típica. Entre ellos se encuentran la vermiculita (Osmolovskiy et al., 2021), la perlita (Martínez et al., 2018), los gránulos de arcilla y la espuma de poliuretano (Rodríguez et al., 2021), entre otros. El soporte inerte se rellena con medios líquidos químicamente definidos para los productos que se desean obtener.

2.8.3. Tipo de microorganismo empleados en FES

El criterio más importante en la FES es la selección de un microorganismo adecuado que tenga la capacidad de asimilar el sustrato sólido. Los procesos de FES se deben principalmente a la actividad fermentativa de hongos, bacterias, o

bien, consorcios de bacterias, hongos y levaduras o de hongos seguidos de una mezcla de bacterias y levaduras. La selección del microorganismo suele depender del tipo de sustrato sólido, los requisitos de crecimiento y el producto final deseado (Krishna, 2005). Estos criterios generales afectarán, tanto el diseño de la fermentación como el procesamiento posterior de extracción y purificación de los productos obtenidos. Los hongos filamentosos siguen dominando los procesos de FES debido a su modo de crecimiento micelial, amplia diversidad, tasas de crecimiento más rápidas, tiempos de fermentación cortos y su fácil manipulación genética (Mitchell et al., 2011).

Los hongos filamentosos tienen la capacidad de sintetizar cantidades considerables de enzimas y otros metabolitos (Farinas, 2015). Se consideran los microorganismos más apropiados para la FES, seguidos por las levaduras, que son capaces de crecer en un entorno de baja actividad de agua. También hay algunas especies de bacterias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* y *Lactobacillus* sp., que se han reportado para producir con éxito enzimas en condición de estado sólido (Qureshi et al., 2016; Ayyash et al., 2019), como puede observarse en el Cuadro 7.

2.8.4. Factores que afectan la FES

Para mejorar la eficiencia de la FES se deben seleccionar y optimizar algunas variables de proceso, como la humedad inicial, el tamaño de las partículas, pH, temperatura, actividad de agua, composición del medio de cultivo, esterilidad, tamaño del inóculo, tasa de aireación, velocidad de agitación, método de extracción del producto y su proceso de purificación posterior (Abdul y Webb, 2017).

El contenido de humedad desempeña un papel importante en la FES, ya que los microorganismos tienen diferentes requerimientos de humedad. Los hongos necesitan un contenido de humedad bajo, que fluctúa entre 40 y 60 %, mientras que las bacterias necesitan un contenido de humedad elevado (60 - 85 %) (Brock, 1990; Frobisher et al., 1974). El contenido óptimo de humedad en un sustrato

sólido está estrechamente relacionado con la correcta difusión de nutrientes y oxígeno/dióxido de carbono durante la fermentación. Un alto contenido de humedad disminuirá la porosidad, la pérdida de la estructura de las partículas e interferirá en la difusión del oxígeno. Por el contrario, un bajo contenido de humedad puede limitar la solubilidad de los nutrientes dificultando el desarrollo de los microorganismos (Abu et al., 2017).

Cuadro 7. Microorganismos empleados en procesos de FES para la producción de enzimas.

Microorganismos	Enzimas	Sustrato	Resultados	Referencia
<i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA DRM 01	Pectinasas	Pulpa de cítricos y bagazo de caña de azúcar	40 U/g	Biz et al. (2016)
Bacillus sp. BBXS-2	Proteasas y amilasas	Bagazo de caña de azúcar, paja de trigo, paja de arroz y cáscara de arroz	12.200 U/g; 6.900 U/g	Quereshi et al. (2016)
<i>Aspergillus tubingensis</i> FDHN1	Xilanasas	Paja de sorgo	5177.23 U/g	Adhyaru et al. (2016)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Lacasas	Salvado de trigo	32.450 U/g, 7 días	El-Batal et al. (2015)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Lipasas	Bagazo de caña de azúcar, semillas de girasol y aceite de oliva	72.3 U/g, 96 h	Liu et al. (2016)

Homogeneizar el tamaño de partícula es fundamental para el desarrollo de los microorganismos, pues partículas pequeñas de sustrato proporcionan una gran superficie para la fijación de los microorganismos, pero las partículas

extremadamente pequeñas dan lugar a una aglomeración del sustrato que afecta a la transferencia de oxígeno, retrasando así el desarrollo de los microorganismos. Sin embargo, aunque un tamaño de partícula grande del sustrato proporciona una mejor eficiencia de aireación, puede limitar la superficie de fijación de los microorganismos (Abu et al., 2017).

El pH es un parámetro difícil de medir y controlar en la FES. Esto se debe a la naturaleza del sustrato sólido, bajo contenido de agua, a la heterogeneidad de las condiciones de los sistemas y a la falta (o ausencia) de métodos adecuados de medición del pH en línea. No existe ningún electrodo fiable que pueda medir el pH en el medio sólido, por lo que se recomienda utilizar microorganismos que crezcan en un amplio rango de pH. Los distintos grupos de microorganismos reaccionan de forma diferente al valor de pH del medio de fermentación. Las bacterias generalmente prefieren valores de pH cercanos a la neutralidad, los hongos y las levaduras valores de pH ligeramente ácidos, y los actinomicetos por encima de la neutralidad (Prescott, 2002).

La temperatura de fermentación depende del microorganismo con el que se esté trabajando; sin embargo, Hendges et al. (2011), Demir y Tari (2014), Barman et al. (2014) y Wong et al. (2017) obtuvieron la máxima producción de poligalacturonasa por cepas de *Aspergillus* a 30, 37, 32.37 y 33 °C, respectivamente. Un aumento de la temperatura durante la fermentación indica crecimiento del microorganismo. En la fermentación aeróbica, el oxígeno se suministra e intercambia con el dióxido de carbono y los microorganismos generan calor, lo que provoca un aumento de la temperatura (Ortiz et al., 2016). En algunos casos, las altas temperaturas afectan negativamente al crecimiento de los microorganismos y a la formación de productos. Sin embargo, se reportan estudios en donde altas temperaturas mejoran el rendimiento de la enzima (Delgado y Castillo, 2019).

El valor óptimo de actividad de agua (a_w) para el crecimiento de los microorganismos se debe ajustar al inicio del proceso de fermentación con base en los requerimientos óptimos de este. Sin embargo, la disponibilidad de agua

puede cambiar durante el transcurso de la fermentación como resultado de las variaciones en el contenido de humedad y también debido a las modificaciones de las propiedades de sorción de agua del material en fermentación.

La obtención de productos está directamente relacionada con la composición del material de soporte o sustrato para llevar a cabo la fermentación, se reporta el uso de tortas de aceite de oliva y colza para la producción de proteasas y lipasas.

La esterilización del material de soporte es una etapa importante para la inhibición de microorganismo ajenos a los que conducirán la asimilación de este, pues se consideran contaminantes que pueden inhibir el desarrollo del microorganismo con el que se está trabajando.

El inóculo puede describirse como una preparación que contiene un elevado número de microorganismos viables y que pueden añadirse para provocar cambios deseables en el sustrato sólido (Visintin et al., 2017). La edad del inóculo, el medio utilizado para su cultivo y, por tanto, su estado fisiológico, son de suma importancia en muchos procesos de fermentación. Si el inóculo utilizado para la producción de metabolitos secundarios no está en el estado fisiológico correcto, no habrá producción o éste será mínimo.

Los microorganismos normalmente varían en sus necesidades de oxígeno. El oxígeno o el aire que se introduce en el medio desempeña dos funciones importantes en el sistema FES:

- a) Satisfacer la demanda de oxígeno en la fermentación aeróbica.
- b) Transporte de calor y masa en un sistema heterogéneo

La aireación proporciona y mantiene altos niveles de oxígeno y bajos niveles de dióxido de carbono en los sustratos sólidos entre las partículas. Los puntos a considerar en la aireación son: el caudal y la calidad del aire. El aire seco con un caudal elevado tendrá un efecto sobre la humedad del sustrato fermentado, aunque tenga una ventaja en términos de eliminación de calor. Se ha demostrado

que la tasa de aireación tiene un efecto positivo sobre el crecimiento microbiano y la formación de productos (Oriol et al., 1988). Alternativamente, el uso de aire saturado es una estrategia común para evitar la desecación del sustrato manteniendo los niveles de humedad. Además, la tasa de aireación mediante aire saturado controla la temperatura y los gradientes de humedad del medio sólido.

2.9. Separación y purificación de enzimas

Para el proceso de separación de enzimas, se emplean comúnmente la centrifugación, filtración con membranas, microfiltración, ultrafiltración precipitación, extracción líquido-líquido, entre otros. Estos métodos resultan ser altamente costosos y difíciles de escalar a nivel industria y una alternativa puede ser la extracción mediante ATPE, debido a su versatilidad, menor costo, capacidad de integración de procesos y fácil reproducción.

El sistema de extracción acuosa en dos fases (ATPE, por sus siglas en inglés) se compone de dos polímeros inmiscibles, o de un polímero con sal, los cuales son solubles en agua a una determinada concentración (Alberttson, 1986). Es bien conocida como una técnica útil para la separación y purificación de biomoléculas, como proteínas y anticuerpos (Soo et al., 2017).

El sistema ATPE se considera una técnica potente y versátil, que tiene bajo costo y una buena eficiencia. Tiene una alta selectividad y rendimiento de recuperación de biomoléculas (Oke e Ijardar, 2021). Ha sido utilizado en el campo de la biotecnología para la separación y purificación de diversos productos biológicos, como proteínas, aminoácidos, enzimas, células, anticuerpos y otros bioproductos (Abu et al., 2017). Los métodos convencionales de separación y purificación de biomoléculas suelen ser caros, requieren mucho tiempo y son difíciles de escalar.

La hidrofobicidad, la carga superficial, el tamaño y la solubilidad de las proteínas son las propiedades fisicoquímicas más importantes que influyen en la separación de proteínas. Las interacciones hidrofóbicas desempeñan probablemente el papel principal en la separación empleando sistemas ATPE.

En dichas interacciones intervienen dos efectos bien conocidos: el efecto de hidrofobicidad de la fase y el efecto de salinidad. El efecto de hidrofobicidad de la fase está directamente relacionado con la identidad química de los constituyentes del sistema, así como con su concentración. Aunque los constituyentes de un sistema ATPE son en principio hidrofílicos, su hidrofobicidad relativa variará, pues la fase superior (normalmente PEG) es más hidrofóbica, lo que favorece la partición de las proteínas hidrofóbicas hacia esa fase concreta. En los sistemas polímero-sal la hidrofobicidad de la fase puede manipularse variando el peso molecular del polímero y añadiendo una sal como el NaCl (concentración hasta 10 % (p/p)). En cuanto al peso molecular del polímero, a medida que este aumenta, la relación grupos hidrófilos/área hidrófoba disminuye, provocando un aumento de la hidrofobicidad. En la mayoría de los casos, la partición de las proteínas hidrofóbicas puede aumentar incluso varios órdenes de magnitud, mientras que la partición de los contaminantes en tales condiciones no se ve afectada o tiende a preferir la fase inferior (sal) (Ying et al., 2017).

Las interacciones electroquímicas tienen también, un papel importante en el comportamiento de partición de las proteínas. Como las cargas opuestas se atraen, la presencia de constituyentes cargados puede generar un fraccionamiento selectivo de los solutos y proteínas de carga opuesta hacia una fase específica. La influencia del pH en las interacciones electroquímicas es fundamental. Por lo tanto, el pH del sistema puede ser manipulado para promover la separación selectiva. El uso de valores de pH por encima del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas puede inducir una afinidad adicional hacia la fase rica en PEG, esto sugiere que la fase superior rica en PEG se vuelve más negativa a medida que aumenta la concentración de NaCl en los sistemas y, por tanto, atrae a las proteínas con carga positiva (Nee et al., 2018).

Dado que las proteínas que se van a fraccionar en el sistema tienen un tamaño definido (peso molecular y diámetro hidrodinámico), así como una geometría (conformación tridimensional), están sometidas a los efectos estéricos impuestos por los constituyentes del sistema. Estos efectos estéricos suelen estar

relacionados con el volumen disponible para que los solutos se fraccionen hacia una fase concreta y se conocen generalmente como efecto de volumen libre (Glyk et al., 2015). La concentración y solubilidad de las proteínas también tiene un efecto importante en la separación de estas en un sistema ATPE, por lo tanto, la partición a bajas concentraciones de proteína puede ser muy diferente a altas concentraciones.

2.10. Literatura citada

- Abdul, M. & Webb, C. (2017). design aspects of solid-state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 4 (1), 511-532. <https://dx.doi.org/10.15406/jabb.2017.04.00094>.
- Abu, N., Barrena, R., Komilis, D. & Sanchez, A. (2017). Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: a review. *Sustainability*, 9 (2), 224-235. <https://dx.doi.org/10.3390/su9020224>.
- Adhyaru, D. N., Bhatt, N. S., Modi, H. A., & Divecha, J. (2016). Insight on xylanase from *Aspergillus tubingensis* FDHN1: production, high yielding recovery optimization through statistical approach and application. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6 (3), 51-57. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.01.014>.
- Ahmed, I., Anjum, M., Azhar, M., Akram, Z., Tahir, M. & Nowrouzi, A. (2019). Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*, its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9 (2), 148-154 <https://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2015.11.003>.
- Alberttson, P. (1986). Partition of cell particles and macromolecules. Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. *The Quarterly Review of Biology*, 62 (1), 74-83. <https://doi.org/10.1086/415300>.
- Ali, A., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Stefanović, A., Jakovetić, S., Luković, N. & Knežević, Z. (2017). Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: the evaluation of substrate pretreatment methods. *Bioresource Technology*, 228 (35), 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.081>
- Almanaa, T., Vijayaraghavan, P., Alharbia, N., Kadaikunnana S., Khaleda, J. & Alyahyac, S. (2020). Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues. *Journal of King Saud University Science*, 32 (2), 1555-1561. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.12.011>.

- Amin, H. & Bilal, M. (2018). Recent advances in the production strategies of microbial pectinases: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122 (36), 1017-1026. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>.
- Ayyash, M., Johnson, S., Liu, S., Mesmaria, N. & Dahmania, S. (2019). *In vitro* investigation of bioactivities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat using *Lactobacillus* sp. *Food Chemistry*, 275 (68), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.031>.
- Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos*. 4 ed. Pearson Educación. México.
- Barman, S., Sit, N., Badwaik, L., Deka, S. (2014). Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. *Journal Food Science Technology*, 56 (2), 3579-89. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1413-8>.
- Bei, Q., Chen, G., Lu, F., Wu, S. & Wu, Z. (2017). Enzymatic action mechanism of phenolic mobilization in oats (*Avena sativa* L.) during solid-state fermentation with *Monascus anka*. *Food Chemistry*, 15 (245), 297-304. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.086>.
- Biz, A., Finkler, A. T. J., Pitol, L. O., Medina, B. S., Krieger, N., & Mitchell, D. A. (2016). Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 111 (87), 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.03.007>.
- Brock, T. (1990). *Principles of microbial Ecology*. 7 ed. Pearson Education. UK.
- Cafall, K. & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344 (14), 1879-1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>.
- Cantão, L., Rodrigues, J., Caldas da Costa, A., Wariss F., Rafael, B., Pinto, H. & Nunes J. (2021). From waste to sustainable industry: how can agro-industrial wastes help in the development of new products. *Resources, Conservation and Recycling*, 169 (132), 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105466>.
- Chen, G., Chen, B. & Song D. (2021). Co-microbiological regulation of phenolic release through solid-state fermentation of corn kernels (*Zea mays* L.) to improve their antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 142 (164), 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111003>.
- Cheng, Z., Chen, D., Wang, Q., Xian, L., Lu, B., Wei, Y., Tang, H., Lu, Z., Zhu, Q., Chen, Y., Huang, R. (2017). Identification of an acidic endopolygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028 and its broad use in major tropical and subtropical fruit juices production. *Journal Bioscience Bioengineering*, 123 (6), 665–672. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.01.013>.

- Delgado, S. & Castillo, D. (2016). Influence of temperature on the growth of a microbial consortium and its biooxidative capacity on the iron of calcopirita. *Ecología Aplicada*, 18 (1), 85-90. <https://dx.doi.org/10.21704/rea.v18i1.1310>.
- Demir, H. & Tari, C. (2014). Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. *Industrial Crops and Products*, 54 (24), 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.025>.
- Diaz, A., Alvarado, O., de Ory, I., Caro I., Blandino, A. (2013). Valorization of grape pomace and orange peels: improved production of hydrolytic enzymes for the clarification of orange juice. *Food and Bioprocess Technology*, 91 (4), 580-586. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.007>.
- Din, L. & Ceccato, S. (2020). Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. *Ciencia Rural*, 50 (4), 141-152. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190857>.
- El-Batal, A. I., ElKenawy, N. M., Yassin, A. S., & Amin, M. A. (2015). Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. *Biotechnology Reports*, 5 (14), 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.11.001>.
- Erukainure, O., Ebuehi, T., Choudhary, I., MESAİK, A., Shukralla, A., Muhammad, A., Zaruwa, Z. & Elemo, N. (2016). Orange peel extracts: Chemical characterization, antioxidant, antioxidative burst, and phytotoxic activities. *Journal of Dietary Supplements*, 13 (34), 585-594. <https://dx.doi.org/10.3109/19390211.2016.1150932>.
- Farinas, C. (2015). Developments in solid-state fermentation for the production of biomass degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52 (24), 179-188. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092>.
- Frobisher, M. (1974). *Fundamentals of Microbiology*. 9 ed. Saunders. Philadelphia.
- Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J. & Mahajan, R. (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *Biotechnology*, 6 (1), 47-55. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0371-4>.
- Global Pectinase Market Research Report. (2017). Disponible en: <https://www.marketresearchstore.com/report/global-pectinase-marketresearch-report2017-190713>. Consultado el 30 de octubre del 2021.
- Glyk, A., Scheper, T. & Beutel, S. (2015). PEG–salt aqueous two-phase systems: an attractive and versatile liquid–liquid extraction technology for the downstream processing of proteins and enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (16), 6599-6616. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6779-7>.

- Goja, A., Yang, H., Cui, M. & Li, C. (2013). Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 04 (01), 328-336. <https://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.1000140>.
- González, M., Pérez, S., Wong, A., Bello, R. & Yañez, G. (2015). Agroindustrial wastes methanization and bacterial composition in anaerobic digestion. *Revista Argentina de Microbiología*, 47 (3), 229-235. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.05.003>.
- Hendges, D., Montanari, Q., Malvessi, E., da Silveira, M. (2011). Production and characterization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* in solid-state fermentation in double-surface bioreactor. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54 (2), 253–258. <https://dx.doi.org/10.1590 / S1516-89132011000200005>.
- Heredia, A., Jiménez, A. & Guillén, R. (1995). Composición de paredes celulares vegetales. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 200 (38), 24–31. <https://doi.org/10.1007/BF01192903> .
- Ichishima, E. (2016). Development of enzyme technology for *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, and *A. luchuensis*, the national microorganisms of Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80 (9), 1681-92. <https://dx.doi.org/10.1080/09168451.2016.1177445>.
- Jeilu, O. & Abate, D. (2017). Characterization of pectinase from *Bacillus subtilis* strain Btk 27 and its potential application in removal of mucilage from coffee beans. *Enzyme Research*, 13 (06), 103-112. <https://doi.org/10.1155/2017/7686904>.
- Linares, J. (2015). Estudio de las propiedades físicas y texturales de geles de pectinas de alto y bajo metoxilo obtenidas de *Crataegus pubescens* (tejocote). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México.
- Kavuthodi, B. & Sebastian, D. (2018). Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 11(1), 18–30. <https://doi.org/10.21786/bbrc/11.1/4>.
- Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 5(1-2), 1-30. <https://dx.doi.org/10.1080/07388550590925383>.
- Kumar, P., Saharana, P., Duhan, S. & Singh, J. (2017). Bio-enrichment of phenolics and antioxidant activity of combination of *Oryza sativa* and *Lablab purpureus* fermented with GRAS filamentous fungi. *Resource-Efficient Technologies*, 3 (3), 347-352. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.02.008>.

- Ladero, M., Velasco, D., Senit J., & Torre, I., Santos, T., Yustos, P. & Santos V. (2017). optimization of the enzymatic saccharification process of milled orange wastes. *Fermentation*, 3 (3), 37-46. <https://doi.org/10.3390/fermentation3030037>.
- Li, Y., Wang, Y., Tu, T., Zhang, D., Ma, R., You, S., Wang, X., Yao, B., Luo, H., Xu, B. (2017). Two acidic, thermophilic GH28 polygalacturonases from *Talaromyces leycettanus* JCM 12802 with application potentials for grape juice clarification. *Food Chemistry*, 15 (237), 997-1003. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.037>.
- Liu, Y., Li, C., Meng, X., & Yan, Y. (2016). Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. *Fuel Processing Technology*, 106 (53), 303-309. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.08.013>.
- Lizardi, J. & Hernández, M. (2017). Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *Biotechnology*, 7 (144), 305-314. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0692-y>.
- Mahmoodi, M., Najafpou, G., Mohammadi, M. (2017). Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace. *Journal Food Science Technology*, 54 (6), 366-375. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2829-8>.
- Martínez, A., Tovar, L., Sergio, H., Saucedo, G. & Favela, E. (2018). Continuous ethyl oleate synthesis by lipases produced by solid-state fermentation by *Rhizopus microsporus*. *Bioresource Technology*, 265 (362), 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.080>.
- Martínez, O., Sánchez, A., Segura, X. & Barrena, R. (2018). Enhancing the bioproduction of value-added aroma compounds via solid-state fermentation of sugarcane bagasse and sugar beet molasses: operational strategies and scaling-up of the process. *Bioresource Technology*, 263 (511), 136-144 <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.106>.
- Mitchell D., De Lima L. & Krieger, N. (2011). Bioreactors for solid-state fermentation. *Journal Biotechnology*, 10 (269), 16-24. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.010>.
- Nee, W., Loke, P., Hui, Y. & Chuan, T. (2018). Recovery of biotechnological products using aqueous two-phase systems. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126 (3), 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.005>.
- Nelofer, R., Nadeem, M., Irfan, M. & Syed, Q. (2018). nutritional enhancement of barley in solid state fermentation by *Rhizopus oligosporus* ML-10. *Nutrition and Food Science International Journal*, 6 (25), 25-34. <https://dx.doi.org/10.19080/NFSIJ.2018.06.555700>.
- Oke, E. e Ijardar, S. (2021). Insights into the separation of metals, dyes and pesticides using ionic liquid based aqueous biphasic systems. *Journal of*

Molecular Liquids, 334 (45), 151-158.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116027>.

- Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S. & Viniegra-Gonzalez, G (1988). Water and water activity in the solid-state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 498-503. <https://dx.doi.org/10.1007/BF00451620>
- Ortiz, J., Rodríguez, J., Cajiao, A. & Maldonado, J. (2016). Estudio cinético de bacterias metanogénicas a diferentes temperaturas. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 14(1), 39-48. ISSN 0120-4211.
- Osmolovskiy, A., Popova, E., Kreyer, V., Baranova, N. & Egorov, N. (2021). Vermiculite as a new carrier for extracellular protease production by *Aspergillus* spp. under solid-state fermentation. *Biotechnology Reports*, 29 (35), 357-369. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00576>.
- Patidar, M., Nighojkar, S., Nighojkar, A., Kumar, A. (2017). Purification and characterization of polygalacturonase produced by *Aspergillus niger* AN07 in solid state fermentation. *Canadian Journal of Biotechnology*, 1(1), 11–18. <https://dx.doi.org/10.24870/cjb.2017-000102>
- Phatania, S., Sharma N. & Handa, S. (2018). Utilization of horticultural waste (Apple Pomace) for multiple carbohydrase production from *Rhizopus delemar* F₂ under solid state fermentation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16 (1), 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.013>
- Prescott, L. (2002). Microbiology. 5^a edición. McGraw-Hill. India.
- Qureshi, A., Khushk, I., Ali, C., Chisti, Y., Ahmad, A. & Majeed, H. (2016) Coproduction of protease and amylase by thermophilic *Bacillus* sp. BBXS-2 using open solid-state fermentation of lignocellulosic biomass. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8(5), 64-72. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.09.006>.
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2011). Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules. A review. *Science and Technology*, 1, 7-16. <https://dx.doi.org/10.5923/j.scit.20110101.02>
- Ravindran, R., Hassan, S., Williams, G. & Jaiswal, A. (2018). A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. *Bioengineering*, 5 (4), 93-102. <https://dx.doi.org/10.3390/bioengineering5040093>.
- Rebello, S., Anju, M., Mathachan, E., Sindhu, R., Binod, P. & Pandey, A. (2017). Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*, 16(5), 205-212. <https://dx.doi.org/10.1007/s11157-017-9437-y>.

- Rodríguez, A., Gea, T., Sánchez, A. (2021). Agro-wastes and inert materials as supports for the production of biosurfactants by solid-state fermentation. *Waste Biomass Valorization*, 12 (57), 1963-1976. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01148-5>
- Sandri, I. & Silveira, M. (2018). Production and application of pectinases from *Aspergillus niger* obtained in solid state cultivation. *Beverages*, 4 (48), 213-222. <https://dx.doi.org/10.3390/beverages4030048>.
- Sharma, H., Patel, H. (2017). Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1215-1227. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977434>.
- Shi, C., He, J., Yu, J., Yu, B., Huang, Z., Mao, X., Zheng, P. & Chen, D. (2017). Fermentación en estado sólido de torta de colza con *Aspergillus niger* para degradar los glucosinolatos y mejorar el valor nutricional. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6 (13), 72-81. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0015-2>.
- Singh, J., Shivalika, S. & Reena, G. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40 (9), 268-277. <https://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>.
- Soccol, C., Costa, F., Letti, J., Karp, G., Woiciechowski, L. y Vandenberghe, de S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 31-44. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>.
- Soo, P., Sang, J., Han, K., Hong, S., y Yu, J. (2017). diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 100 (39), 253-260. <https://dx.doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.03.001>.
- Soriano, M. (2004). Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. Tesis doctoral.
- Sudeep, C., Jitendra, U., Dev, J., Binod, L., Dhiraj, C. & Bhoj, P. (2020). production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. *Fermentation*, 6 (2), 59-68. <https://dx.doi.org/10.3390/fermentation6020059>.
- Teles, A., Chavez, D., Oliveira, R., Bon, E., Terzi, S. & Souza, E. (2019). Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds. *Food Research International*, 20(18), 441-448. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.083>.
- Treichel, H., Sbardelotto, M., Venturin, B., Dall, A., Mulinari, J., Golunski, S., Bortoluzzi, D. & Borges, C. (2016). lipase production from a newly isolated

- aspergillus niger by solid state fermentation using canola cake as substrate. *Current Biotechnology*, 05 (23), 268-275. <https://dx.doi.org/10.2174/2211550105666151124193225>.
- Tu, J., Zhao, J., Liu, G., Tang, C., Han, Y., Cao, X., Jia, J. & Ji, G. (2020). Solid state fermentation by *Fomitopsis pinicola* improves physicochemical and functional properties of wheat bran and the bran-containing products. *Food Chemistry*, 328 (137), 127-136. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127046>.
- Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P. & Schwan, F. (2017) Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal Food Microbiology*, 257 (36), 31-40. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.004>.
- Wong, L., Saad, W., Mohamad, R., Tahir, P. (2017). Optimization of cultural conditions for polygalacturonase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* R6 capable of retting kenaf. *Industrial Crops and Products*, 305 (97), 175–183. <https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.019>.
- Ying, S., Khoiroh, I., Wei, C., Chuan, T. & Loke, P. (2017). Recent advances in protein extraction using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Reviews*, 46(4), 106-115. <https://dx.doi.org/10.1080/15422119.2017.1279628>
- Young, H., Min, S., Hun, J. & Taik, S. (2019). Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts *Food Chemistry*, 272 (158,) 235-241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.174>.
- Yucekan, I., Onal S. (2011) Partitioning of invertase from tomato in poly (ethylene glycol)/sodium sulfate aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, 46 (1), 226-232. <https://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.015>.

3. CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS PRODUCIDAS A PARTIR DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

3.1. Resumen

La fermentación en estado sólido (FES) es un proceso basado en el crecimiento microbiano sobre un soporte de baja humedad que tiene potencial para aprovechar residuos agrícolas y agroindustriales y producir bioproductos como proteínas y enzimas. El objetivo del trabajo fue evaluar las propiedades cinéticas de enzimas producidas con fermentación en estado sólido basada en el crecimiento del hongo *Aspergillus niger*. Se desarrolló FES durante 24, 48 y 72 h con *A. niger* desarrollado sobre residuos de naranja. El proceso se condujo en columna con flujo de aire a 50 mL min^{-1} y humedad relativa de 75%. Se aplicó el método de extracción acuosa en dos fases (ATPE) basado en polietilenglicol 6000 y sulfato de amonio en concentraciones de 24.5 y 15.8%, respectivamente y agua destilada/amortiguador de fosfatos pH 6.9 como disolvente, de donde se obtuvieron sistemas cuyas fases se evaluaron en términos de contenido de proteína. En cada fase se evaluó actividad enzimática usando pectina de alto metoxilo como sustrato. El tiempo de fermentación no afectó la producción de proteína, que tuvo, en promedio, concentración de 15.34 mg mL^{-1} en la fase superior de los sistemas ATPE y de 1.74 mg mL^{-1} en la fase inferior. Sin embargo, la actividad enzimática fue mayor en la fase inferior (39.72 U) que en la superior (35.38 U), sin efecto del tiempo de proceso. El pH, la temperatura y la concentración de sustrato óptimo de las enzimas fueron 6.0, $50.0 \text{ }^\circ\text{C}$ y 0.28 mM , respectivamente. Las enzimas pécticas producidas por *A. niger* presentaron una cinética del tipo Michaelis-Menten (M-M) con valor en la constante de M-M de $9 \times 10^{-5} \text{ mM}$ y máxima velocidad de reacción de $0.0461 \text{ mM min}^{-1}$. La fermentación en estado sólido es un proceso con potencial para producir enzimas pécticas a partir de residuos de naranja.

Palabras clave: *Aspergillus niger*, caracterización cinética, extracción acuosa en dos fases, fermentación en estado sólido, pectinasas, residuos de naranja.

CHARACTERIZATION OF ENZYMES PRODUCED THROUGH SOLID STATE FERMENTATION

Abstract

Solid-state fermentation (SSF) is a process based on microbial growth on a low-moisture substrate that has the potential to take advantage of agricultural and agro-industrial residues and produce bio-products such as proteins and enzymes. The objective of the work was to evaluate the kinetic properties of enzymes produced with solid-state fermentation based on the growth of the *Aspergillus niger* fungus. SSF was developed for 24, 48, and 72 h with *A. niger* grown on orange wastes. The process was conducted in a column with air flow at 50 mL min⁻¹ and relative humidity of 75 %. The aqueous two-phase extraction (ATPE) method was applied based on polyethylene glycol 6000 and ammonium sulfate in concentrations of 24.5 and 15.8 %, respectively, and distilled water/phosphate buffer pH 6.9 as solvent, from which biphasic systems were obtained whose phases were evaluated in terms of protein content. Enzymatic activity was evaluated in each phase using high-methoxy pectin as substrate. The fermentation time did not affect protein production, which had, on average, a concentration of 15.34 mg mL⁻¹ in the upper phase of ATPE systems and 1.74 mg mL⁻¹ in the lower phase of them. However, the enzymatic activity was higher in the lower phase (39.72 U) than in the upper (35.38 U), without effect of the process time. The pH, temperature, and optimal substrate concentration of the enzymes were 6.0, 50.0 °C, and 0.28 mM, respectively. The pectic enzymes produced by *A. niger* presented a Michaelis-Menten type (M-M) kinetics, with M-M constant of 0.203 mM and maximum rate of 0.00024 mM min⁻¹. Solid state fermentation is a process with potential to produce pectic enzymes from orange waste.

Key words: *Aspergillus niger*, solid-state fermentation, orange waste, pectinases, two-phase aqueous extraction, kinetic characterization.

Thesis of Master Science, Program of Agro-Food Science and Technology, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Gabriel Vega Ramírez.

Thesis Director: Salvador Valle Guadarrama, Dr.

3.2. Introducción

La fermentación en estado sólido (FES) se define como el crecimiento de microorganismos como hongos y levaduras, principalmente, sobre un sustrato de baja humedad. En este proceso se simula el hábitat natural de estos microorganismos, bajo condiciones controladas. La FES se ha practicado desde hace siglos en Oriente y Asia para el procesamiento y producción de alimentos como el tempeh, el miso (soya fermentada) el koji y el sake (arroz fermentado), los cuales son componentes importantes en la dieta de estos países, pues son ricos en proteínas y vitaminas (Abdul y Webb, 2017).

Para la FES se pueden utilizar como sustratos los residuos generados por las agroindustrias, los cuales, en su mayoría, contienen nutrientes que pueden ser aprovechados para la producción de biocombustibles, enzimas, vitaminas, antioxidantes, antibióticos y otros productos (Abu et al., 2017), lo cual además contribuye a mitigar la contaminación ambiental.

El presente trabajo tuvo como objetivo la caracterización de enzimas producidas pécnicas producidas por fermentación en estado sólido a partir de residuos de naranja, los cuales poseen un alto contenido de pectina, que podría inducir la síntesis de pectinasas durante el desarrollo de un hongo filamentoso como *Aspergillus niger*. Las pectinasas son enzimas que hidrolizan la pectina presente en las frutas y se emplean principalmente para la clarificación de jugos y vino, tratamiento de aguas residuales de la industria juguera y desgomado en la industria del papel. Sin embargo, para determinar las posibles aplicaciones, es necesario caracterizarlas, dado que en la industria alimentaria se emplean condiciones diversas de pH para la elaboración y conservaciones conservación de alimentos.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Material vegetal

Los residuos de naranja se emplearon como soporte sólido no inerte, los cuales presentaron grados de madurez variable e incluyeron la cáscara y las membranas internas. El material se secó al sol durante 3 d y alcanzó humedad de 14.34 %, se molió en una licuadora (BLSTBPST013, Oster, México) y se tamizó en malla 10 y 18 (MON200A010, MON200A018, Mont inox, México), con lo que el tamaño de partícula se homogeneizó a 1.9 mm.

3.3.2. Cepa fúngica

La cepa utilizada fue *Aspergillus niger*, la cual se identificó por el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal (LANISAF) de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.3.2.1. Conservación y activación de la cepa fúngica

El micelio esporulado estuvo almacenado a 4 °C en salvado de trigo. Para su activación, se inoculó en placas de agar papa dextrosa (PDA) y se incubó a 28 °C durante 4 d. La esporulación se llevó a cabo en salvado de trigo y se cosecharon con una mezcla de Tween 80 y agua destilada (1 %, v/v) y se determinó la concentración de esporas con una cámara de Neubauer.

3.3.3. Fermentación en estado sólido (FES) en reactores de columna

El material molido (80 g) fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 2 min en vasos de precipitado. Posteriormente se acidificó con ácido tartárico (pH 4.5) y se inoculó con una suspensión de esporas de *A. niger* a una concentración de 4×10^7 esporas g^{-1} de sustrato seco. La FES se realizó en columnas de vidrio con diámetro interno de 4.4 cm y altura de 26 cm. Cada columna se empacó con sustrato (70 g) acidificado e inoculado y se colocó en una incubadora a 28 °C. Se inyectó una corriente continua de aire a una corriente de aire de $50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ en la cámara de humidificación, que contenía una disolución saturada cloruro de sodio (Figura 6). Se retiró una columna a los tiempos de fermentación 0, 24, 48 y 72 h. Posteriormente, el contenido de cada columna fue congelado y liofilizado

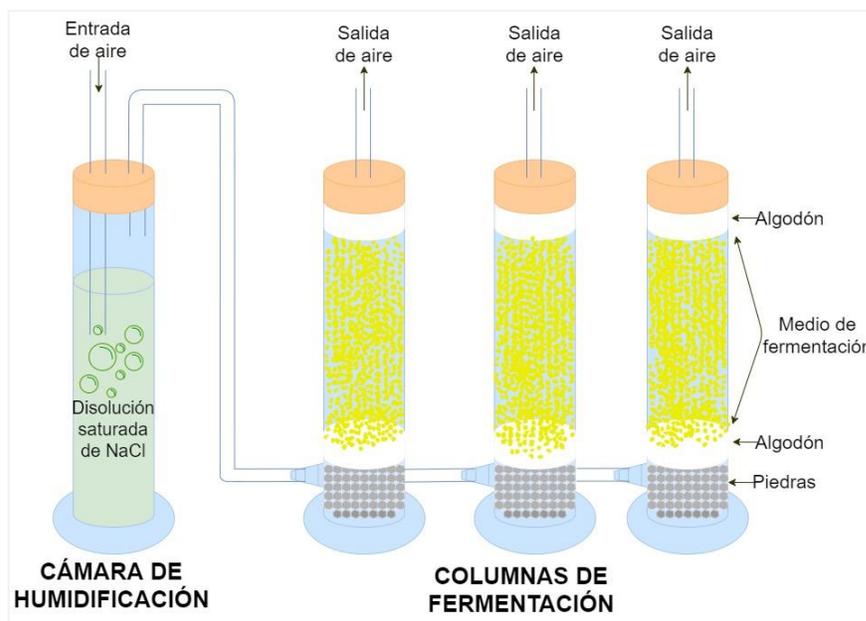


Figura 6. Esquema general del sistema de FES en reactor de columna.

3.3.4. Caracterización fisicoquímica del sustrato fermentado

3.3.4.1. Contenido de humedad

Se empleó un analizador de humedad (MA37, Sartorius, Estados Unidos), colocando 5 g de sustrato en el analizador de humedad y se tomó la lectura, durante 10 min a temperatura ambiente (Tirado et al., 2015).

3.3.4.2. pH

Se determinó después de la acidificación del sustrato a las 0, 24, 48 y 72 h de fermentación. Se mezclaron 3 g de sustrato con 30 mL de agua destilada y se procedió a medir el pH (AOAC, 2004) usando un potenciómetro (CONDUCTRONIC, pH120, México).

3.3.4.3. Contenido de azúcares totales

Se determinó siguiendo el método fenol-sulfúrico de DuBois et al. (1956), con algunas modificaciones. En un tubo de ensaye se vertió 1 mL de muestra, se adicionaron 0.5 mL de fenol al 5 % (m/v). Posteriormente se vertieron 2.5 mL de

ácido sulfúrico concentrado y se agitó la mezcla durante 15 s de forma manual y se leyó la absorbancia a 485 nm en un espectrofotómetro (DR 500 UV-vis HACH, USA). Para calcular la concentración de azúcares totales, se preparó una curva estándar de glucosa (Merck, México) en un rango de concentración de 0.00014 a 0.10 mg mL⁻¹. Y los resultados se reportaron como mg mL⁻¹ de glucosa.

3.3.4.4. Contenido de pectina

La pectina del material fermentado fue extraída siguiendo el método de Lozano et al. (2016), se mezcló con HCl 0.1 N (1:10, m/v); se calentó a 85 °C por 45 min y se filtró a través de tela de muselina. El filtrado se mezcló (1:1) con etanol (96 %, v/v), se dejó reposar a 4 °C por 24 h y se decantó el sobrenadante. El precipitado se lavó con una mezcla de etanol:agua (70:30, v/v). Después se centrifugó (Eppendorf, Centrifuge 5810 R, Alemania) y la pectina se purificó en agua destilada con membrana de diálisis (Spectra/Por 6 Dialysis Membrane, 12 kDa; Spectrum Laboratories Inc., CA, USA). Finalmente, el polisacárido se secó en un horno (Lumistell, HTP-42, México) durante 24 h a 30 °C. El rendimiento de pectina fue calculado en base seca (Y_p , %) mediante la Ecuación (1), donde m_p y m_f son masas (g) de la pectina obtenida y la cantidad original de sustrato usado, respectivamente:

$$Y_p = \frac{m_p}{m_f} \times 100 \quad (1)$$

3.3.4.5. Grado de esterificación

Se evaluó siguiendo el método de Singthong et al. (2004). Una muestra de 500 mg de pectina seca se mezcló con 2 mL de etanol y 100 mL de agua destilada. Después, 10 mL de NaOH 0.5 N fueron agregados con agitación y reposo por 15 min. La mezcla fue incorporada con 10 mL de HCl 0.5 N y se tituló de nuevo con NaOH 0.5 N (V_B , mL). El valor de ED (%) se calculó con la Ecuación (2):

$$GE = \left(\frac{V_B}{V_A + V_B} \right) \times 100 \quad (2)$$

3.3.5. Extracción de enzimas mediante sistema ATPE

El sistema de extracción acuoso bifásico que se utilizó se fundamenta en el diagrama de fases construido por Briones (2017). Se utilizó polietilenglicol (PEG) 6000 (Sigma-Aldrich, Co., Germany), sulfato de amonio (Meyer, México) y como disolvente, agua destilada y amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 6.9 con NaCl 6.7 mM, respectivamente. La mezcla se formó con PEG 6000 en concentración de 24.5 % (m/v), sulfato de amonio en concentración de 15.8 % (m/v) y diluyente (agua destilada y amortiguador). Se pesaron y mezclaron 4.9 g de PEG 6000, 3.1 g de sulfato de amonio, 11.9 g del disolvente y 0.5 g de sustrato fermentado y pulverizado. Se agitó el sistema de forma manual por 1 min y se dejó reposar por 30 min para la formación de las fases. Se midió el pH con un potenciómetro (CONDUCTRONIC, pH120, México). Se introdujo el electrodo directamente al sistema y se registró la lectura. Posteriormente el sistema se sometió a centrifugación (Eppendorf, Centrifuge 5810 R, Alemania) por 15 min a 450 rpm y finalmente las fases se separaron en viales para su posterior congelación y liofilización.

3.3.6. Determinación de contenido de proteína

Se determinó el contenido de proteína cruda y parcialmente purificada del sustrato fermentado y de las fases del sistema de extracción ATPE, respectivamente, siguiendo el método de Lowry et al. (1951), con algunas modificaciones. En un tubo de ensaye se agregó 1 mL de muestra, se adicionó posteriormente 1 mL de solución de CTC, se agitó y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Se agregaron 0.5 mL de Folin Ciocalteu (Sigma, Co., Germany) diluido a 0.3 N y se desarrolló la reacción durante 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a la medición de la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro. Los valores obtenidos se extrapolaron en una curva estándar de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich, Co., Germany) con concentraciones de 0.01-0.1 mg mL⁻¹

Para la preparación de la solución de CTC, se mezclaron volúmenes iguales de sulfato de cobre pentahidratado al 0.1 % (p/v) y tartrato de sodio y potasio

tetrahidratado 0.2 % (p/v) con carbonato de sodio 10 % (p/v) en un mismo volumen. La solución anterior fue mezclada con solución de NaOH 0.8 N y solución dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 % (p/v).

3.3.7. Determinación de actividad pectinasa

La actividad pectinasa se determinó siguiendo la metodología de Miller (1959), con algunas modificaciones. Se preparó el reactivo DNS disolviendo NaOH en 200 mL de agua destilada y se añadió en agitación constante el tartrato de sodio y potasio lentamente. Se completó con agua destilada hasta 400 mL y se comenzó a añadir lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico. Se dejó en agitación por 12 h, se aforó a 500 mL y se filtró. Para el desarrollo de la reacción, se vertieron en tubos eppendorf, 200 μ L de amortiguador de fosfatos 20 mM (pH 6.9), 200 μ L de muestra y se incubaron a 37 °C durante 15 min. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de pectina (Laitz, México) al 1 % (p/v), se incubó a 37 °C durante 10 min, al cabo de este tiempo se adicionaron 500 μ L del reactivo DNS, se colocó en ebullición durante 5 min y se enfrió en agua con hielo. De cada tubo, se tomaron 200 μ L de muestra (por cuadruplicado) que se transfirieron a los pozos de una microplaca y finalmente se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (Synergy 2 Microplate reader, Biotek International, Software Gen5). Se preparó una curva estándar de ácido D-galacturónico (Sigma-Aldrich, Co., Germany) en un rango de concentración de 0.1 a 1 mg mL⁻¹, para la extrapolación de los resultados, los cuales fueron expresados en unidad (U) de actividad pectinasa, que corresponde a la liberación de 1 mol de ácido D-galacturónico por minuto.

3.3.8. Efecto del pH sobre la actividad pectinasa

La actividad enzimática se determinó en la fase superior del sistema ATPE correspondiente a las 48 h de fermentación. Los ensayos de actividad enzimática se probaron en un rango de pH de 3 a 9, utilizando amortiguadores. La reacción se llevó a cabo como se describe en el apartado 5.3.7.

3.3.9. Efecto de la temperatura sobre la actividad pectinasa

La actividad enzimática se determinó en la fase superior del sistema ATPE correspondiente a las 48 h de fermentación. Los ensayos se probaron en un rango de temperatura de 30 a 55 °C y pH 6, por ser el valor intermedio encontrado en la determinación de la actividad residual en diferentes condiciones de pH. La reacción se llevó a cabo como se describe en el apartado 5.3.7.

3.3.10. Estimación de la energía de activación (Ea)

Con los datos obtenidos en el apartado 5.3.9, se estimó el valor de a Ea (J K⁻¹ mol⁻¹) a partir de la pendiente de la representación lineal de la Ecuación (3) de Arrhenius (Mutlu et al., 1996) en su forma logarítmica:

$$\ln v = \ln k - \frac{E_a}{RT} \quad (3)$$

Donde:

v: velocidad de reacción enzimática

k= factor pre exponencial de frecuencia (mol min⁻¹)

R: Constante de los gases (8.3145 J K⁻¹ mol⁻¹)

T: Temperatura absoluta (K)

Ea: Energía de activación (J K⁻¹ mol⁻¹)

3.3.11. Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad pectinasa

La actividad enzimática se determinó en la fase superior del sistema ATPE correspondiente a las 48 h de fermentación. Los ensayos se probaron en un rango de concentración de pectina (1.4, 1.9, 2.4, 3.6 y 4.8 mM), suspendida en amortiguador pH 6. La reacción se llevó a cabo como se describe en el apartado 5.3.7.

3.3.12. Estimación de los parámetros cinéticos K_m y v_{máx}

Se determinó la velocidad inicial de la reacción utilizando diferentes concentraciones de pectina (1.43, 1.90, 3.57, 4.76 y 7.14 mM). La reacción se llevó a cabo como se describe en el apartado 5.3.7. Posteriormente se estimaron los parámetros cinéticos aparentes, K_m y V_{máx}, mediante el modelo de Eadie-

Hofstee (Hofstee, 1959), donde la velocidad (v) se representó frente a la relación entre la velocidad y la concentración de sustrato ($v/[S]$). En esta transformación (Ecuación 4), la pendiente y la intersección describen la K_m y la $V_{m\acute{a}x}$, respectivamente.

$$v = -K_m \frac{v}{[S]} + V_{m\acute{a}x} \quad (4)$$

3.3.13. Dise\~no y an\~alisis estad\~istico

Se utiliz\~o un dise\~no estad\~istico completamente al azar con tres tratamientos y un control, con ensayos por triplicado. Los tratamientos fueron los tres tiempos de fermentaci\~on: 24, 48 y 72 h. Las variables independientes fueron: contenido de az\~ucares totales, humedad, contenido de pectina, pH y temperatura. Los datos se analizaron mediante un an\~alisis de varianza y se aplic\~o la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para realizar una comparaci\~on de medias de tratamientos. Todos los an\~alisis estad\~isticos realizados se obtuvieron mediante el programa computacional SAS\textsuperscript{\textcircled{R}} (Statistical Analysis System), versi\~on 2002.

3.4. Resultados y discusi\~on

3.4.1. Caracterizaci\~on fisicoqu\~mica del sustrato fermentado

3.4.1.1. Humedad

El contenido de humedad del medio de cultivo fue disminuyendo en el transcurso del tiempo (Figura 7). La evaporaci\~on del agua durante la FES se atribuye principalmente a dos factores, uno correspondiente al calor metab\~olico del hongo y el otro al consumo de agua para la hidr\~olisis de polisac\~aridos (D\~iaz et al., 2020; Dorta et al., 1994). En la FES con aireaci\~on forzada, la p\~erdida de agua por evaporaci\~on puede evitarse si el aire circulante est\~a saturado de humedad y si su temperatura se controla. En estas condiciones, cualquier variaci\~on en el contenido total de agua durante el crecimiento del hongo puede atribuirse a las actividades metab\~olicas (Rosero y Dustet, 2017; Oriol et al., 1988).

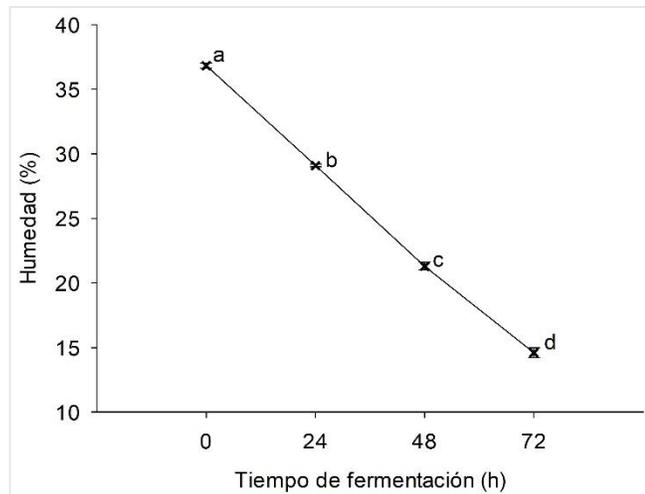


Figura 7. Variación de la humedad del sustrato durante la FES. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

3.4.1.2. pH

La Figura 8 muestra que el pH del sistema de fermentación se redujo de 5.8 a 4.1 en un periodo de 72 h. EL pH es un parámetro difícil de controlar debido a la germinación de las esporas y el inicio del crecimiento micelial de los hongos, así como por la secreción de ácidos orgánicos, como el ácido cítrico y a la desesterificación de la pectina por las enzimas extracelulares, lo que provoca un cambio en el pH del medio de cultivo (Smith, 1994). Estos cambios pueden afectar notablemente a los procesos metabólicos, modificando los límites de actividad de agua a los que se produce la germinación y el crecimiento fúngico; sin embargo, dentro del tiempo total de fermentación, el pH se mantuvo dentro del rango de crecimiento de (4-6) de hongos filamentosos (Prescott, 2002).

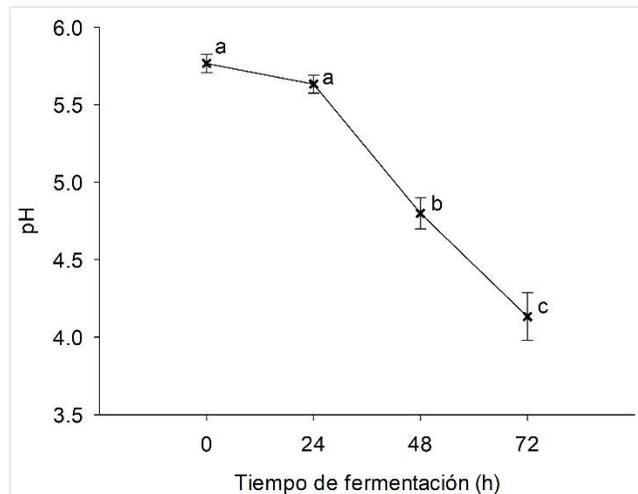


Figura 7. Variación de pH del sustrato durante la FES. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

3.4.1.3. Azúcares totales

Los azúcares totales son moléculas compuestas por carbono, hidrogeno y oxígeno, se pueden presentar en forma de monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos (Beltran y Gil, 2018). Estos azúcares, al ser hidrolizados, son fuente importante de energía para el desarrollo de los microorganismos. Sánchez y Vázquez (2017) indican, que hay una relación entre el contenido de azúcares simples como sacarosa y pectina, pues los hongos filamentosos asimilan la sacarosa para la obtención de energía y posteriormente a la pectina para la síntesis de enzimas pécticas, sin embargo, debido a las características fisicoquímicas del material de soporte, así como el bajo contenido de azúcares totales, se puede inferir que *A. niger* asimiló primeramente la pectina, pues no se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el contenido de azúcares totales, entre los tiempos de fermentación monitoreados (Figura 9).

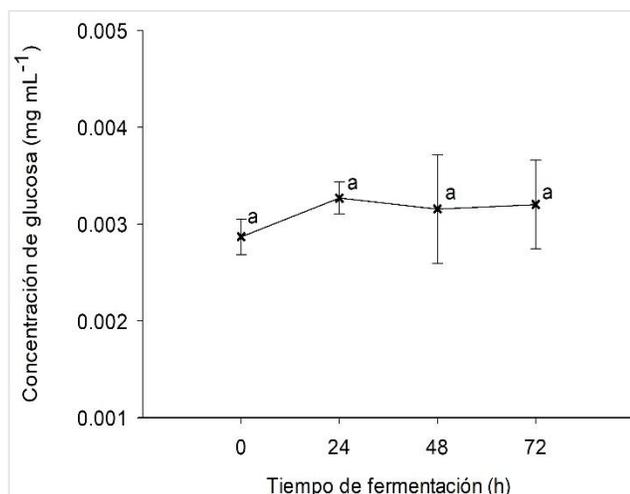


Figura 9. Contenido de azúcares totales del sustrato fermentado. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

3.4.1.4. Contenido de pectina y grado de esterificación (GE)

El contenido de pectina disminuyó significativamente en el periodo de 72 h (Cuadro 8). Esta disminución puede deberse a diversos factores como la metodología empleada para la extracción (Picot et al., 2020; Vasco y Zapata, 2017; Chen et al., 2016), si es purificada o no, del grado de madurez del fruto o vegetal empleado (Paredes et al., 2015) y de la fuente de la que es extraída (Guandalini et al., 2019; Raji et al., 2017). La pectina se degrada naturalmente durante el proceso de maduración de los frutos por pectinasas producidas por la propia planta, pero también se degrada por enzimas de parásitos como hongos y bacterias (Taragano, 2000). El proceso de fermentación fue realizado por *A. niger*, el cual asimiló la pectina presente en el material de fermentación para la síntesis de pectinasas, tal como lo reportan otros autores, al emplear *A. niger* (Sudeep et al., 2020; Oliyad, 2017). El grado de esterificación (GE) se evaluó dividiendo las unidades de grupos metoxilo entre las unidades de ácido galacturónico, determinadas mediante titulaciones de pectina extraída anteriormente. El GE de los residuos de naranja utilizados en esta investigación fue de 62.3 % (Cuadro 8), lo que corresponde a una pectina de alto metoxilo, pues según la FAO (2019), el GE varía entre 60 y 75 % en las pectinas

comerciales de alto metoxilo. Este valor encontrado es bajo, pues se reportan valores superiores a 80 % en residuos de naranja (Tovar, 2017), sin embargo, existen impurezas como los galactanos, xilanos, hemicelulosa, entre otros, que son susceptibles a la precipitación alcohólica, influyendo en la cuantificación de del GE (Zegada, 2015).

Cuadro 8. Contenido de pectina y grado de esterificación.

Parámetro	Tiempo de fermentación (h)			
	0	24	48	72
Contenido de pectina (%)	14.28 a	13.42 b	12.72 c	12.30 c
Grado de esterificación (GE) (%)	62.34			

Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

3.4.2. Extracción de enzimas mediante sistema ATPE

3.4.2.1. pH

Goja et al. (2013) indican que valores de pH superiores a 7 son adecuados para separación de proteínas en sistemas formados por PEG y fosfatos y para sistemas de PEG y sulfato son compatibles con pH inferior a 6.5. Como se puede observar en el Cuadro 9, el pH del sistema ATPE compuesto por PEG 6000, sulfato de amonio y amortiguador de fosfatos (20 mM, pH 6.9), tuvo un pH de 6.30, lo que indica que el uso de amortiguador de fosfatos, como diluyente, es el más adecuado para la extracción de las enzimas.

Cuadro 9. pH del sistema ATPE.

Sistema	pH
PEG 6000; sulfato de amonio; agua destilada	4.55 ± 0.16
PEG 6000; sulfato de amonio; amortiguador de fosfatos	6.30 ± 0.31

3.4.3. Contenido de proteína

Debido a su alta capacidad de expresión y secreción de proteínas, *Aspergillus niger* es uno de los hongos filamentosos que mayormente se emplea para producirlas, pues de acuerdo con lo reportado por Ward (2012), cepas industriales de *Aspergillus niger*, pueden llegar a producir de 25 a 30 g/L de glucoamilasa. Además, Meini et al. (2021) indican que es como una cepa GRAS (generalmente reconocida como segura). Pacheco et al. (2018), evaluaron la composición fisicoquímica de residuos frescos y secos de naranja, encontrando un contenido de proteína en residuos secos de 63.10 mg mL⁻¹, valor similar a lo encontrado en este trabajo, 64.08 mg mL⁻¹, como se muestra en el Figura 10.

La Figura 10 muestra que durante el proceso de fermentación hubo un incremento del contenido de proteína en el medio de cultivo, lo que estaría relacionado con la producción de enzimas extracelulares. No se encontró diferencia significativa entre el tiempo cero y a las 24 h, sin embargo, a las 48 y 72 h, se tuvo la máxima producción de proteínas, al no haber diferencia estadística significativa entre estos dos tiempos de fermentación. El rendimiento de la producción de biomoléculas empleando hongos filamentosos depende directamente de las condiciones que se le proporcionen para su desarrollo, como temperatura, pH, humedad, aireación, tamaño de partícula y tamaño de inóculo. Heerd et al. (2012), reportan incremento de proteína soluble (5.5 mg g⁻¹) después del cuarto día de fermentación (en estado sólido), utilizando una mezcla de salvado de trigo y cáscara de naranja como sustrato; sin embargo, las condiciones de fermentación que emplearon fueron temperatura ambiente (26 °C) y tamaño de inóculo de 2x10⁷ esporas g⁻¹ de soporte seco.

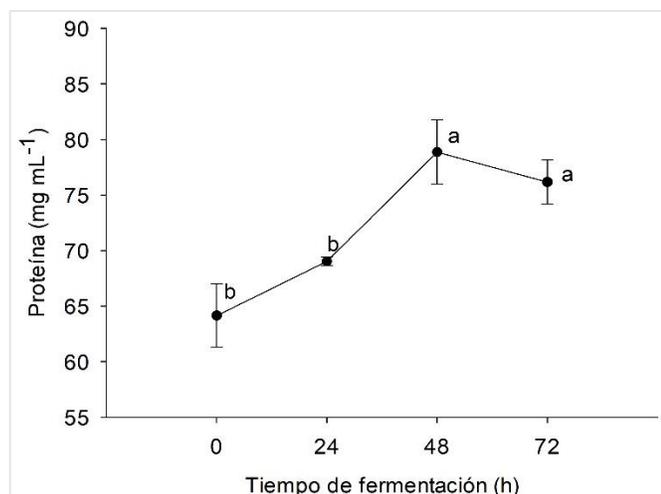


Figura 8. Contenido de proteína en el material de soporte. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

3.4.3.1. Fases del sistema ATPE

Se determinó el contenido de proteína de las fases del sistema ATPE y no se encontró diferencia significativa entre los tiempos de fermentación, para ambas fases (Figura 11). Sin embargo, en la fase superior del sistema, se encontró la mayor concentración de proteínas, lo que confirma las conclusiones de Hachem et al. (1996), reportando que la hidrofobicidad entre el polímero y las proteínas son responsables de la partición de estas biomoléculas, en los sistemas formados por un polímero y una sal.

El uso o adición de sales como el NaCl y el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al sistema de extracción ATPE, contribuyen en la estabilidad estructural de las proteínas y la precipitación de las mismas (Nelson y Cox, 2019; Silva et al., 2018), así mismo, la solvatación del agua con iones sal, permite la remoción de agua de los alrededores de las proteínas, exponiendo así las regiones hidrofóbicas de estas. Dichas regiones pueden interactuar mutuamente o con las de otras moléculas, como el PEG, resultando en la aglomeración y separación de las proteínas.

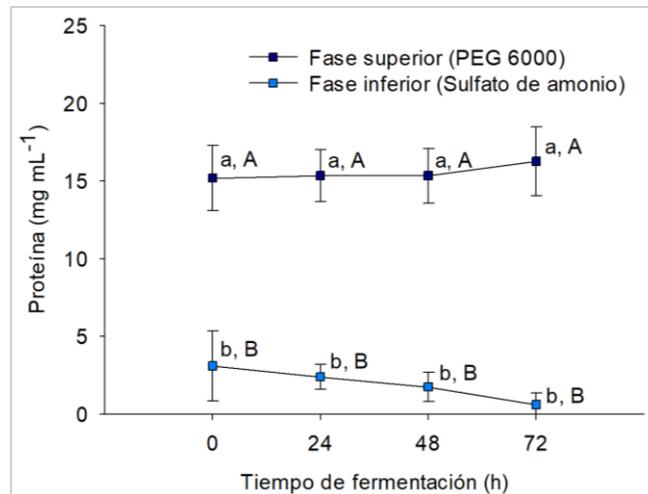


Figura 9. Contenido de proteína en las fases del sistema ATPE. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). ^YEntre tiempos de fermentación. ^ZEntre fases.

3.4.4. Actividad pectinasa

3.4.4.1. Fases del sistema ATPE

La determinación de la actividad enzimática en las fases del sistema de extracción mostró un comportamiento contrario a lo observado en la cuantificación de proteína. Se encontró diferencia estadística significativa entre las fases del sistema ATPE, con mayor actividad enzimática en la fase inferior (Figura 12). Con base en la afirmación de Nelson y Cox, (2019), al decir que todas las enzimas son proteínas, con algunas excepciones, se esperaba que la actividad enzimática fuera mayor en la fase superior, como lo fue con el contenido de proteína. Sin embargo, la prueba para determinar la actividad enzimática fue específica para enzimas pécticas o pectinasas, lo que limitó a la cuantificación de otras enzimas, ya que el sustrato utilizado para la FES contiene, además de la pectina, celulosa, hemicelulosa y lignina (Dias et al., 2020), que el hongo filamentoso pudo utilizar para producir otro tipo de enzimas.

Se puede establecer que el tiempo de 48 h fue el adecuado para la producción de pectinasas, pues no hay diferencia significativa a las 72 h (Figura 12).

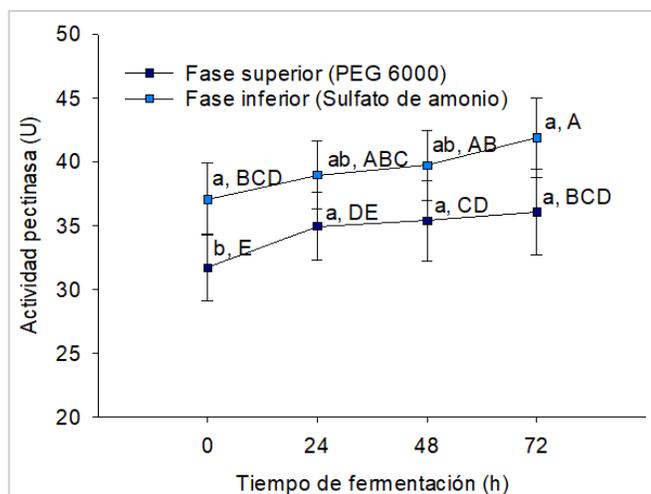


Figura 10. Actividad pectinasa en las fases del sistema ATPE. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). ^yEntre tiempos de fermentación. ^zEntre fases. Una unidad (U) de actividad pectinasa corresponde a la liberación de 1 mol de ácido D-galacturónico por minuto.

3.4.5. Efecto del pH sobre la actividad pectinasa

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad enzimática, se realizaron ensayos en un rango de pH de 3 a 9, no encontrando diferencia significativa a pH 5, 6 y 7, como se muestra en la Figura 13. La concentración de iones hidrógeno afecta la eficiencia de las enzimas para la catálisis de reacciones, pues, valores de pH extremadamente altos o bajos, pueden cambiar la estructura de las proteínas, lo que resulta en la desnaturalización parcial o total y con ello la pérdida de la actividad para la mayoría de las enzimas (Dalagnol et al., 2017).

La hidrólisis de la pectina en ácido galacturónico y la desesterificación de éste, permite la exposición y posible disociación de sus grupos carboxilo en función del pH del medio. De igual manera, las cadenas laterales de los aminoácidos como la lisina, ácido aspártico y arginina (Pickersgill y Jenkins, 2003), presentes en el sitio activo de las diferentes isoformas de las pectinasas, como la poligalacturonasa (PG) (PGI, PGII, PGA, PGB, PGC, PGD y PGE), serán susceptibles a disociarse y cambiar su estado de ionización. Lo anterior tendrá un efecto sobre la interacción del sustrato con el sitio activo de la enzima, lo cual

resulta en un pH óptimo para la actividad de cada una de las isoformas (Ninga et al., 2017).

Las enzimas generalmente son más activas en un rango de pH de 5-9 (Fromm, 1975), lo cual coincide con los resultados obtenidos (Figura 13). Estudios previos reportan un pH óptimo de 5 para pectinasas producidas por *Aspergillus ibericus* (Mahesh et al., 2016) y *Aspergillus niger* (Dalagnol et al., 2017), respectivamente. Adicionalmente, Da Carvalho et al. (2018) indicaron un rango de pH óptimo de 4 y 7 para enzimas producidas por *Aspergillus aculeatus* URM4953.

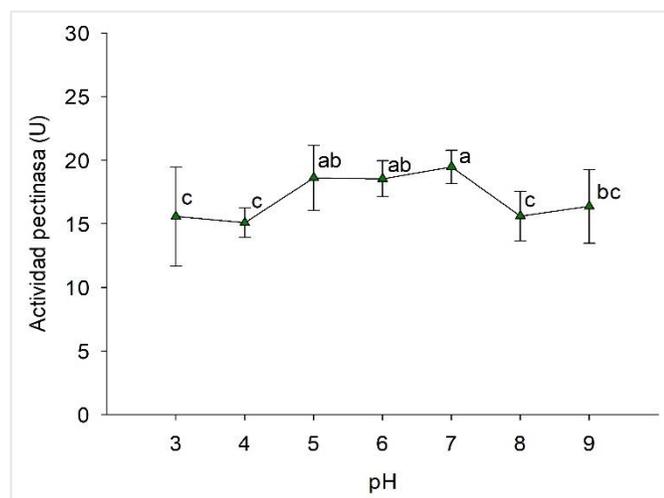


Figura 11. Efecto del pH sobre la actividad pectinasa. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Una unidad (U) de actividad pectinasa corresponde a la liberación de 1 mol de ácido D-galacturónico por minuto.

3.4.6. Efecto de la temperatura sobre la actividad pectinasa

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se evaluó en un rango de 30 a 55 °C (Figura 14). Los ensayos se realizaron a pH 6, en el cual la enzima presentó alta actividad. La Figura 14 muestra un incremento exponencial de la actividad enzimática respecto a la temperatura, ya que, al incrementar la temperatura, hay una mayor entrega de energía para superar la energía de activación mínima requerida en la reacción, lo que resulta en colisiones de partículas más exitosas, mejorando así la velocidad de reacción inicial (Dalagnol

et al., 2017). Sin embargo, se llega a una temperatura lo suficientemente alta para inactivar la enzima y disminuir la actividad. Estadísticamente, la temperatura en la que la enzima producida por *A. niger* presentó mayor actividad fue a 50 °C (Figura 14), lo cual ha sido observado anteriormente por otros autores, como Ma et al. (2017), que reportaron temperatura óptima de 50 °C para pectinasa de *Aspergillus niger*, libre e inmovilizada, utilizando alginato de sodio como soporte y glutaraldehído como agente de reticulación y Anand et al. (2017) con resultados similares para exo-polygalacturonasa. La temperatura óptima puede variar dependiendo de la especie que se esté utilizando para producir las enzimas, ya que Alagöz et al. (2016) reportaron temperatura óptima de 35 °C para pectinasas producidas por *Aspergillus aculeatus*.

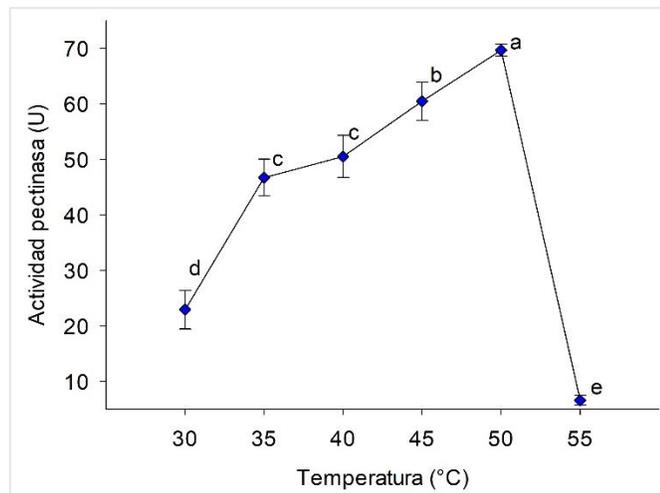


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre la actividad pectinasa. Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Una unidad (U) de actividad pectinasa corresponde a la liberación de 1 mol de ácido D-galacturónico por minuto.

3.4.7. Energía de activación (E_a)

El valor de E_a estimado fue de 40.61 J mol^{-1} , lo que indica que se requiere relativamente poca energía para la hidrólisis de la pectina, destacando así una capacidad hidrolítica especialmente eficaz de las pectinasas producidas por *A. niger*, pues Zeni et al. (2015) reportan valor de E_a de 9130 J mol^{-1} para poligalacturonasas de *A. niger*. Lira et al. (2018), reportan valores de E_a de

pectinasas de *A. aculeatus*, libres e inmovilizadas de 11040 J mol^{-1} e 26410 J mol^{-1} , respectivamente.

3.4.8. Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad pectinasa

Se realizaron ensayos utilizando diferentes concentraciones de sustrato (Figura 15), a pH 6 y 35°C . La actividad enzimática incrementó con la concentración del sustrato y se encontró diferencia estadística significativa entre las diferentes concentraciones de sustrato probadas. En la concentración 3.6 mM de sustrato se presentó mayor actividad enzimática (Figura 15). Otros autores reportan el uso de concentraciones bajas de pectina ($< 1\%$) para una mayor actividad enzimática (Sandri et al., 2018), ya que altas concentraciones de sustrato reducen la cantidad de agua libre en el sistema, resultando en la desolvatación del sustrato, reemplazando así todos o la mayoría de los puentes de hidrógeno entre el sustrato y el agua, lo que afecta la reacción enzimática (Sudeep et al., 2020).

Los resultados presentan una notable disminución de la actividad enzimática a una concentración de 4.8 mM de pectina, que puede deberse, a una posible inhibición de la enzima.

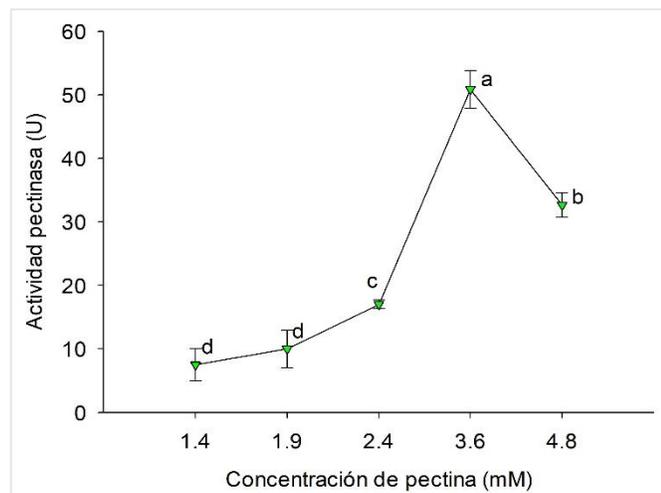


Figura 13. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad pectinasa.

Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Una unidad (U) de actividad pectinasa corresponde a la liberación de 1 mol de ácido D-galacturónico por minuto.

3.4.9. Parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$

Los parámetros cinéticos aparentes, definidos por la constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima de reacción ($v_{m\acute{a}x}$) se determinaron a través del modelo de Eadie-Hofstee, obteniendo valores de 9×10^{-5} mM y 0.0461 mM min^{-1} , respectivamente. La mayoría de las enzimas pécticas, producidas por hongos filamentosos, presentan una cinética del tipo Michaelis-Menten y tienen alta afinidad por la pectina, como lo reportan Dushyantha et al. (2014), de poligalacturonasa de *A. niger* (0.155 mM), contrario a las pectinasas producidas por bacterias, como *Bacillus subtilis* (1.891 mg mL^{-1}), cuyo valor fue reportado por Jeilu y Abate (2017).

3.5. Conclusiones

No se encontró diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) de la actividad enzimática para los tiempos de fermentación de 48 h (35.38 U) y 72 h (36.07 U) en la fase superior de sistema de extracción acuoso.

Las características fisicoquímicas que presentaron las pectinasas producidas por *A. niger* bajo las condiciones de FES establecidas en el presente proyecto, fueron: rangos de pH 5-7, temperatura de 50 °C y 0.28 mM corresponde a la concentración de sustrato en la que se presentan las condiciones de saturación de la enzima. Los valores de k_m y velocidad máxima determinados a través de las ecuaciones de Michaelis-Menten y Eadie-Hofstee, fueron 9×10^{-5} mM y 0.0461 mM min^{-1} , respectivamente.

3.6. Literatura citada

Alagöz, D., Tükel, S. & Yildirim, D. (2016). Immobilization of pectinase on silica-based supports: Impacts of particle size and spacer arm on the activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87 (35), 67-77. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.007>.

Anand, G., Yadav, S. & Yadav, D. (2017). Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus*

niger MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. *Biotechnology*, 7 (2), 122-135. <https://dx.doi.org/10.1007/s13205-017-0760-3>.

AOAC. (2004). Official Methods of Analysis. 18th. Edition.

Beltran, M. & Gil, A. (2018). Estudio del contenido de azúcares totales en cáscaras de naranja para su uso en la producción de bioetanol. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Pública de Navarra. España.

Briones, J. (2017). Separación y purificación de la enzima polifenol oxidasa a partir de pulpa de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) mediante extracción acuosa en dos fases. Tesis de licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. México.

Chen, Q., Hu, Z., Yao, F. & Liang, H. (2016). Study of two-stage microwave extraction of essential oil and pectin from pomelo peels. *Food Science and Technology*, 66 (35), 538–545. <https://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.019>.

Da Carvalho, J., Lopes, P., Converti, A. & Souza, T. (2018). Kinetic and thermodynamic characterization of a novel *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonase. Comparison of free and calcium alginate immobilized enzyme. *Process Biochemistry*, 74 (25), 435-444. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.010>.

Dalagnol, L., Silveira V., da Silva, H., Manfroi, V. & Rodrigues, R. (2017). Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. *Process Biochemistry*, 61 (17), 173-780. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.029>.

Dias, P., Sajiwanie, J. & Rathnayaka, R. (2020). Chemical composition, physicochemical and technological properties of selected fruit peels as a potential food source. *International Journal of Fruit Science*, 20 (6), 1-12. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1717402>.

Díaz, R., Aguilar, P., Buenrostro, J., Prado, A., Ascacio, J. & Aguilar, C. (2020). Influence of forced aeration and packing density on the ellagitannase production by solid-state fermentation. Universidad Autónoma de Coahuila.

Dorta, B., Bosch, A., Arcas, J., & Ertola, J. (1994). Water balance in solid-state fermentation without forced aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, 16 (7), 562-565. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90119-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90119-8).

DuBois, M.; Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3), 350-356. <https://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>.

Dushyantha, D., Jagadeesh, K., Krishnaraj, P. & Patil, C. (2014). Purification and kinetic studies of polygalacturonase from *Aspergillus niger* RBF96. *Journal of*

- Pure and Applied Microbiology*, 8 (3), 2389-2394.
<https://dx.doi.org/10.1044/h.lwe.2014.11.719>.
- FAO. (2019). PECTINS. Disponible en: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph7/additive-306-m7.pdf. Consultado el 29 de abril de 2021.
- Fromm, H. (1975). The effect of temperature and pH on enzyme activity. *Initial Rate Enzyme Kinetics*, 22 (57), 201-235. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80966-8_8.
- Goja, A., Yang, H., Cui, M. & Li, C. (2013). aqueous two-phase extraction advances for bioseparation. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 04 (01), 107-116. <https://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.1000140>.
- Guandalini, B., Rodrigues, N. & Marczak, L. (2019). Sequential extraction of phenolics and pectin from mango peel assisted by ultrasound. *Food Research International*, 119 (27), 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.011>.
- Hachem F, Andrews B, Asenjo J. (1996). Hydrophobic partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. *Enzyme Microbial Technology*, 19 (7), 507-517. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)80002-D](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)80002-D).
- Heerd, D., Yegin, S., Tari, C. & Fernandez, M. (2012). Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state fermentation: a comparative study. *Food and Bioproducts Processing*, 90 (2), 102-110. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.08.003>.
- Hofstee, B. (1959). Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics. *Nature*, 184 (83), 1296–1298. <https://doi.org/10.1038/1841296b0>.
- Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Pend, D., Sattar, A., Abu, M., Iftikhar, H., Ahmed, S. & Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, 18 (18), 113-122. <https://dx.doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>.
- Jeilu, O. & Abate, D. (2017). Characterization of pectinase from *Bacillus subtilis* strain Btk 27 and its potential application in removal of mucilage from coffee beans. *Enzyme Research*, 23 (10), 132-140. <https://doi.org/10.1155/2017/7686904>.
- Lira, R., Soares, O., Converti, A. & Souza, T. (2018). Thermodynamic and kinetic studies on pectinase extracted from *Aspergillus aculeatus*: free and immobilized enzyme entrapped in alginate beads. *Macromolecules*, 115 (25), 1088-1093. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.154>.

- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, J. (1951). Protein measurement with the Folin 16 phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193 (1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- Ma, X., Wang, D., Yin, M., Lucente, J., Wang, W., Ding, T., Ye, X. & Liu, D. (2016). Characteristics of pectinase treated with ultrasound both during and after the immobilization process. *Ultrasonic Sonochemistry*, 36 (3), 1-10. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.10.026>.
- Mahesh, M., Arivizhivendhan, P., Maharaja, R., Boopathy, V. & Hamsavathani, G. (2016). Production, purification and immobilization of pectinase from *Aspergillus ibericus* onto functionalized nanoporous activated carbon (FNAC) and its application on treatment of pectin containing wastewater. *Journal of Molecular Catalysis*, 333 (26), 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.07.012>.
- Meini, M., Cabezudo, I., Galetto, C. & Romanini, D. (2021). Production of grape pomace extracts with enhanced antioxidant and prebiotic activities through solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Food Bioscience*, 42 (6), 168-179. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101168>.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Mutlu, S., Alp, B., Ozmelles, R. & Mutlu, M. (1997). Amperometric determination of enzymatic activity by multienzyme biosensors. *Journal Food Engineering*, 33 (5), 81-86. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(97\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(97)00038-1).
- Nelson, D. & Cox, M. (2019). *Lehninger: principios de bioquímica*. 7a ed. Omega. Barcelona.
- Ninga, K., Sengupta, S., Jain, A., Desobgo, Z., Nso, E. & De, S. (2017). Kinetics of enzymatic hydrolysis of pectinaceous matter in guava juice. *Journal of Food Engineering*, 221 (82), 158-166. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.10.022>.
- Oliyad, O. (2017). Pectinase: substrate, production and their biotechnological applications. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2 (3), 1007-1014. <https://dx.doi.org/10.22161/ijeab/2.3.1>.
- Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S. & Viniestra-González, G. (1988). Water and water activity in the solid-state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27 (6), 498–503. <https://doi.org/10.1007/BF00451620>.
- Pacheco, M., Moreno, F. & Villamiel, M. (2018). Chemical and physicochemical characterization of orange by-products derived from industry. *Journal of the*

Science of Food and Agriculture, 99 (2), 868-876.
<https://dx.doi.org/10.1002/jsfa.9257>.

- Paredes, J., Hernández, R. & Cañizares, A. (2015). Effect of degree of maturity on the physical and chemical properties of helmets pectins from guava (*Psidium guajava* L.). *Idesia*, 33 (3), 35-41. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292015000300006>.
- Pickersgill, R. & Jenkins, J. (2003). The structures and active sites of pectinases. *Advances in Pectin and Pectinase Research*, 7 (3), 267-275. https://dx.doi.org/10.1007/978-94-017-0331-4_20.
- Picot, A., Ramasawmy, B. & Naushad, M. (2020). Extraction, characterization and application of pectin from tropical and sub-tropical fruits: a review. *Food Reviews International*, 24 (3), 206-214. <https://dx.doi.org/10.1080/87559129.2020.1733008>.
- Prescott, L. (2002). *Microbiology*. 5a ed. McGraw-Hill. USA.
- Raji, Z., Khodaiyan, F., Rezaei, K., Kiani, H. & Hosseini, S. (2017). Extraction optimization and physicochemical properties of pectin from melon peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98 (21), 709-716. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.146>.
- Rosero, E. & Dustet, J. (2017). Cinética de la fermentación en estado sólido de cascarilla de arroz y bagazo de caña con *Auricularia aurícula*. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Cuba*, 51 (6), 28-38. <https://dx.doi.org/10.1156/d12375-016-0048-6>.
- Sandri, G., Fontana, C., da Silveira, M. (2015). Influence of pH and temperature on the production of polygalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. *Food Science Technology*, 61 (2), 430-436. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.004>.
- Sánchez, R. & Vázquez, J. (2017). Hidrólisis de residuos de naranja para la obtención de carbohidratos fermentables. *Revista de Investigación y Desarrollo*, 2 (4), 63-70. <https://dx.doi.org/10.652/r24444987>.
- Silva, L., Kuhn, K., Moraes, C., Burkert, C. & Kalil, S. (2018). Diseño experimental como herramienta para la optimización de la purificación de C-ficocianina por precipitación de *Spirulina platensis*. Disponible en: <https://www.binmeibioes.com/info/experimental-design-as-a-tool-for-optimization-23375909.html>. Consultado el 18 de julio de 2021.
- Singthong, J., Steve, W., Ningsanond, S. & Douglas, G. (2004). Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. *Carbohydrates and Polymers*, 58 (7), 391-400. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.07.018>.

- Smith, J. (1994). *Biotechnology Handbook: Aspergillus*. 1a edición. Springer. Canadá.
- Sudeep, C., Jitendra, U., Dev, J., Binod, L., Dhiraj, C. & Bhoj, P. (2020). Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. *Fermentation*, 6 (2), 59-68. <https://dx.doi.org/10.3390/fermentation6020059>.
- Sun, X. & Su, X. (2019). Harnessing the knowledge of protein secretion for enhanced protein production in filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35 (6), 54-65. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2630-0>
- Taragano, V. (2000). Pectinasas fúngicas: estudios comparativos de producción por fermentación sumergida y en sustrato sólido y estabilidad en sistemas deshidratados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Disponible en: https://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3253_Taragano.pdf. Consultado el 21 de junio del 2021.
- Tirado, D., Piedad, M. & Diofanor, A. (2015). Comparative study of methods for moisture determination of several food matrices. *Dialnet*, 62 (2), 3-10. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642015000200002>.
- Tovar, A. (2017). Valorización integral de cáscaras de naranja mediante extracción de pectina y elaboración de carbón activado. Centro de investigación y desarrollo tecnológico en electroquímica. Tesis de maestría. Universidad de Madrid. España
- Vasco, J. & Zapata, A. (2017). Enzymatic extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora Edulis* F. Flavicarpa) at laboratory and bench scale. *Journal Food Science*, 80 (8), 280–285. <https://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.024>.
- Ward, O. (2012) Producción de proteínas recombinantes por hongos filamentosos. *Biotechnoly Advances*, 30 (5), 1119-1139. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.012>.
- Zegada, V. (2015). Pectin extraction from orange peels waste by microwave assisted acid hydrolysis (MWAH). *Applied Science*, 11 (14), 6596-6605. <https://doi.org/10.3390/app11146596>.
- Zeni, J., Pili, Cence, J., Toniazzo, K., Treichel H. & Valduga. E. (2015). Characterization of novel thermostable polygalacturonases from *Penicillium brasilianum* and *Aspergillus niger*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (9), 2497–2502. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1468-6>.

4. CONCLUSIONES GENERALES

Las condiciones de FES en columna establecidas para el desarrollo del hongo filamentoso *A. niger* y la producción de pectinasas fueron temperatura 28 °C, flujo de aireación 50 cm³ min⁻¹, humedad 75 %, pH 4.5 y tamaño de inóculo 4x10⁷ esporas g⁻¹ de sustrato seco. El pH, la temperatura y la concentración de sustrato óptimo de las enzimas fueron 6.0, 50.0 °C y 0.28 mM, respectivamente.

Las proteínas extraídas mostraron mayor afinidad a la fase polimérica (PEG 6000, 24.5 % (m/v)) del sistema de extracción ATPE; sin embargo, se observó mayor actividad pectinasa en la fase salina (sulfato de amonio, 15.8 % (m/v)), lo que podría indicar la presencia de otro tipo de enzimas que no fueron cuantificados por la especificidad de la prueba para detectar actividad pectinasa. Este método de separación permite la purificación parcial de enzimas, lo que representa el ahorro de tiempo y dinero para procesos a nivel industrial.

Las pectinasas producidas corresponden a enzimas pécticas ligeramente ácidas y termófilas, pues se encontró actividad óptima en un rango de pH de 5-7 y temperatura de 50 °C. Estas características permiten su aplicación para la clarificación de jugos de fruta y vino y la maceración de tejidos vegetales.

La fermentación en estado sólido es un proceso con potencial para producir enzimas pécticas a partir de residuos de naranja y otro tipo de residuos.