

***Universidad Nacional de La Plata***



***Facultad de Ciencias Exactas***

***Departamento de Química***

**TESIS DOCTORAL**

***Crecimiento de *Geotrichum klebahnii*  
y expresión de Protopectinasa-SE***

**Sebastián Fernando Cavalitto**

Dirección

**Dr. Carlos Fernando Mignone**

*La Plata, Argentina  
Noviembre de 2003*

***A Cari, Guille y ...***

***con todo mi amor***

*Por ser lo mejor que me ha pasado  
en la vida.*

**Quiero agradecer a todos los que, de alguna forma, estuvieron a mi lado durante estos años de trabajo en el CINDEFI:**

- A Carlos Mignone, que siempre estuvo (a veces más que yo), por su amistad y por haberme permitido aprender a su lado durante todos estos años.
- A Roque Hours, por haberme invitado, hace ya una eternidad, a trabajar en el Centro y por haberme dado otras muchas oportunidades de avanzar en la profesión.
- Al Dr. Rodolfo Ertola, por haber colaborado con su sapiencia en la dilucidación del efecto de los microelementos.
- A los compañeros de RPS, a pesar del fracaso, por el año de ayuda incondicional.
- A Diego Baruque, Víctor de Vargas y Oscar Ferreira, por su ayuda diaria con los cultivos.
- A todos mis compañeros y amigos del CINDEFI, que ayudaron a que esta etapa de mi vida fuera inolvidable. Especialmente quiero agradecer por su amistad a Cecilia, Rubén, Flavia, Carolina, José y Juan Carlos (a la distancia pero siempre presente).
- A Cari, por tantos años de compañía.
- Y especialmente a mis viejos que se aseguraron que, dentro de las posibilidades, nada me faltara jamás.

“Vivir es más que un derecho...  
es el deber de no claudicar”

Luis. E. Aute.

## INDICE

### **INDICE TEMÁTICO**

<b>CAPITULO 1</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>1. SUSTANCIA PÉCTICAS Y ENZIMAS PECTOLÍTICAS</b>	<b>1</b>
1.1. POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR	1
1.2 SUSTANCIAS PÉCTICAS.	1
1.2.1. NOMENCLATURA Y COMPOSICIÓN	1
1.2.2 RELACIÓN CON OTROS POLISACÁRIDOS DENTRO DE LA PARED CELULAR.	5
1.3. ENZIMAS PECTOLÍTICAS.	7
1.3.1 ENZIMAS QUE ATACAN AL HOMOGALACTURONANO.	7
1.3.1.1 Esterasas	7
1.3.1.2 Hidrolasas	8
1.3.1.3 Liasas:	8
1.3.1.4 Protopectinasas (PPasa):	9
1.3.2 ENZIMAS QUE ATACAN AL RAMNOGALACTURONANO.	10
1.4 USO INDUSTRIAL DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS	10
1.5 <i>GEOTRICHUM KLEBAHNII</i> .	12
1.5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.	12
1.5.2 <i>GEOTRICHUM</i> COMO PRODUCTOR DE ENZIMAS.	13
1.6 OBJETIVOS	15
1.7 PLAN DE TRABAJO	16
1.8 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	17
<b>CAPITULO 2</b>	<b>25</b>
<b>TÉCNICA DE MEDIDA DE ACTIVIDAD PROTOPECTINASA (PPASA)</b>	<b>25</b>
2.1 INTRODUCCIÓN	25
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.2.1 PREPARACIÓN DEL SUSTRATO.	25
2.2.2 REACTIVOS QUÍMICOS :	26
2.2.3 BUFFER ACB:	26
2.2.4 FUENTE DE ENZIMA:	26
2.2.5 ENSAYO ENZIMÁTICO :	26
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
2.4 REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	34
<b>CAPITULO 3</b>	<b>35</b>

## INDICE

### **TÉCNICA DE MEDIDA DE ACTIVIDAD POLIGALACTURONASA (PGASA) 35**

<b>3.1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>35</b>
<b>3.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
3.2.1 REACTIVOS QUÍMICOS :	36
3.2.2 TÉCNICA ENZIMÁTICA	37
<b>3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
3.3.1 DETERMINACIÓN DE CONDICIONES DE MEDIDA	37
3.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	40
3.3.3 DETERMINACIÓN DE CONSTANTES CINÉTICAS DE LA PGASA DE <i>G. KLEBAHNII</i> .	45
<b>3.4 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>48</b>

### **CAPITULO 4 51**

#### **ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE *G. KLEBAHNII*. 51**

<b>4.1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>51</b>
4.1.1 NOMENCLATURA UTILIZADA EN EL PRESENTE CAPÍTULO	51
4.1.2 MARCO TEÓRICO.	52
4.1.3 BALANCES DE MATERIA EN EL BIORREACTOR.	56
<b>4.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>60</b>
4.2.1 CEPA.	60
4.2.2 MANTENIMIENTO DE LA CEPA.	60
4.2.3 MEDIOS DE CULTIVO.	60
4.2.4 CULTIVOS EN BATCH	62
4.2.5 CULTIVOS CONTINUOS	63
<b>4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>65</b>
4.3.1 CULTIVOS BATCH	65
4.3.2 CULTIVOS CONTINUOS.	68
4.3.2.1 Efecto de otras limitaciones sobre el crecimiento de <i>G. klebahnii</i> .	72
4.3.3 RECONCILIACIÓN DE DATOS	73
4.3.4 MODELOS METABÓLICOS.	75
<b>4.4. ANEXO 1:</b>	<b>84</b>
ANÁLISIS DE CONSISTENCIA DE DATOS <sup>20</sup>	84
<b>4.5 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>92</b>

### **CAPITULO 5 94**

#### **ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PGASA POR *G. KLEBAHNII* EN CULTIVOS EN SISTEMA BATCH. 94**

<b>5.1 INTRODUCCIÓN.</b>	<b>94</b>
<b>5.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>94</b>
5.2.1 CEPA.	94

## INDICE

5.2.2 MANTENIMIENTO DE LA CEPA.	94
5.2.3 MEDIOS DE CULTIVO.	94
5.2.4 ESTUDIO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO Y ENERGÍA.	94
5.2.5 ESTUDIO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO.	95
5.2.6 EFECTO DE LOS MICROELEMENTOS.	95
5.2.7 CULTIVOS EN SISTEMA BATCH EN BIORREACTOR.	98
<b>5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>99</b>
5.3.1 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO Y ENERGÍA.	99
5.3.2 CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DEL PH.	102
5.3.3 EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO.	104
5.3.4 EFECTO DE LOS MICROELEMENTOS	107
<b>5.4 APÉNDICE I</b>	<b>120</b>
CÁLCULO DE LOS EFECTOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS EN UN DISEÑO FACTORIAL MEDIANTE EL ALGORITMO DE YATES.	120
<b>5.5 APÉNDICE II - TABLA GENERATRIZ DEPARA EL DISEÑO DE DOEHLERT</b>	<b>123</b>
<b>5.6 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>124</b>
<b>CAPITULO 6</b>	<b>126</b>
<hr/>	
<b>EXPRESIÓN DE PGASA EN CULTIVO CONTINUO.</b>	<b>126</b>
<hr/>	
<b>6.1 INTRODUCCIÓN.</b>	<b>126</b>
<b>6.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>127</b>
6.2.1 CEPA.	127
6.2.2 MANTENIMIENTO DE LA CEPA.	127
6.2.3 MEDIOS DE CULTIVO.	127
6.2.4 CULTIVOS:	127
6.2.5 MEDIDA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	128
6.2.6 CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA CELULAR.	128
<b>6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>130</b>
6.3.1 EFECTO DE LA VELOCIDAD DE DILUCIÓN.	130
6.3.2 EFECTO PH.	131
6.3.3 EFECTO DEL CAMBIO EN LA FUENTE DE CARBONO Y ENERGÍA.	132
6.3.4 EFECTO DEL ÁCIDO GALACTURÓNICO.	133
6.3.5 EFECTO DEL POOL DE VITAMINAS Y DE LA CONCENTRACIÓN DE $K_2HPO_4$ .	134
6.3.7 COMPORTAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE RETENCIÓN.	135
6.3.8 EFECTO DE LOS MICROELEMENTOS SOBRE LA EXPRESIÓN ENZIMÁTICA.	138
6.3.9 CAMBIOS MORFOLÓGICOS DURANTE EL ESTADO ESTACIONARIO	140
<b>6.4 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>145</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>146</b>
<hr/>	
<b>CAPÍTULO 2 - TÉCNICA DE PPASA</b>	<b>146</b>
<b>CAPÍTULO 3 - TÉCNICA DE PGASA.</b>	<b>146</b>

INDICE

<b>CAPÍTULO 4 - ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE G. KLEBAHNII</b>	<b>146</b>
<b>CAPÍTULO 5 - EXPRESIÓN DE PGASA EN CULTIVOS BATCH</b>	<b>147</b>
<b>CAPÍTULO 6 - EXPRESIÓN DE PGASA EN CULTIVO CONTINUO</b>	<b>147</b>

## INDICE

### INDICE DE TABLAS

<b>TABLA I.1:</b> PROPIEDADES METABOLICAS DE <i>G. KLEBAHNII</i> OBTENIDAS DE BIBLIOGRAFÍA.....	12
<b>TABLA I.2:</b> ACTIVIDAD PPASA DE DIFERENTES DILUCIONES DE UN SOBRENADANTE DE UN CULTIVO DE <i>G. KLEBAHNII</i> .....	32
<b>TABLA I.3:</b> PARÁMETROS TÍPICOS REPORTADOS PARA LA MEDIDA DE ACTIVIDAD POLIGALACTURONASA.....	35
<b>TABLA II.3:</b> PROPIEDADES DE ALGUNAS ENDO-POLIGALACTURONASAS DE ORIGEN VEGETAL Y MICROBIANO.....	36
<b>TABLA III.3:</b> ACTIVIDAD MEDIDA EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE <i>G. KLEBAHNII</i> A DIFERENTES DILUCIONES CON LA TÉCNICA OPTIMIZADA.....	47
<b>TABLA I.4:</b> FÓRMULA MOLECULAR, FÓRMULA MÍNIMA Y VALORES DE GRADO DE REDUCCIÓN PARA ALGUNOS COMPUESTOS CARBONADOS COMUNES.....	54
<b>TABLA II.4:</b> VALORES DEL COEFICIENTE DE MANTENIMIENTO PARA DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO.....	56
<b>TABLA III.4:</b> DATOS EXPERIMENTALES DEL CULTIVO DE <i>G. KLEBAHNII</i> EN MR.....	65
<b>TABLA IV.4:</b> ANÁLISIS ESTEQUIOMÉTRICO DE UNA CULTIVO BATCH DE <i>G. KLEBAHNII</i> .....	66
<b>TABLA V.4:</b> ANÁLISIS ESTEQUIOMÉTRICO DE UNA CULTIVO BATCH DE <i>G. KLEBAHNII</i> LIMITADO EN O <sub>2</sub> .....	68
<b>TABLA VI.4:</b> EFECTO DE DISTINTAS LIMITACIONES NUTRICIONALES SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>G. KLEBAHNII</i> .....	74
<b>TABLA VII.4:</b> EFECTO DE DISTINTAS LIMITACIONES NUTRICIONALES SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>G. KLEBAHNII</i> (DATOS RECONCILIADOS).....	74
<b>TABLA VIII.4:</b> CONSUMO DE FCE Y O <sub>2</sub> Y FORMACIÓN DE BIOMASA CO <sub>2</sub> Y ETANOL EN CADA UNA DE LAS FASES DEL CULTIVO DE <i>G. KLEBAHNII</i> .....	80
<b>TABLA IX.4:</b> CONSUMO DE FCE Y O <sub>2</sub> Y FORMACIÓN DE BIOMASA CO <sub>2</sub> Y ETANOL EN CADA UNA DE LAS FASES DEL CULTIVO DE <i>G. KLEBAHNII</i> . VALORES NORMALIZADOS A UN CMOL DE BIOMASA.....	80
<b>TABLA X.4:</b> FLUJO A TRAVÉS DE LAS REACCIONES DEL ESQUEMA METABÓLICO DE LA FIGURA 11.4 SIN Y CON LIMITACIÓN POR O <sub>2</sub> .....	81
<b>TABLA XI.4:</b> ESTIMADOS DE LOS VALORES EXPERIMENTALES CALCULADOS A PARTIR DE LOS FLUJOS A TRAVÉS DE LAS DISTINTAS RUTAS METABÓLICAS DEL MODELO.....	81
<b>TABLA XII.4:</b> DISTRIBUCIÓN DE FLUJOS DE <i>G. KLEBAHNII</i> CRECIENDO EN CULTIVO CONTINUO BAJO DISTINTAS LIMITACIONES.....	82
<b>TABLA XIII.4:</b> VALORES DE LA DISTRIBUCIÓN $\chi^2$ PARA DIFERENTES GRADOS DE LIBERTAD.....	89
<b>TABLA I.5:</b> EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA EXPRESIÓN DE PGASA.....	100
<b>TABLA II.5:</b> EFECTO DEL AGREGADO PECTINA O ALGUNOS DE SUS DERIVADOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE PGASA POR <i>G. KLEBAHNII</i> .....	101
<b>TABLA III.5:</b> pH Y COMPOSICIÓN DE LA PAREJA BUFFER DEL MEDIO DE CULTIVO PARA VERIFICAR EL CRECIMIENTO DE <i>G. KLEBAHNII</i> EN FUNCIÓN DEL pH.....	102
<b>TABLA IV.5:</b> EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA Y MICROELEMENTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMA.....	105
<b>TABLA V.5:</b> INFLUENCIA DE LA DILUCIÓN DE LAS SOLUCIONES DE ELEMENTOS TRAZA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PGASA CON EL MR.....	107
<b>TABLA VI.5:</b> VALORES DE LAS 11 VARIABLES EN EL DISEÑO DE PLACKETT BURMAN.....	110
<b>TABLA VII.5:</b> DISEÑO ESTADÍSTICO DE PLACKETT BURMAN PARA EL ESTUDIO DE LOS MICROELEMENTOS.....	111

## INDICE

<b>TABLA VIII.5:</b> DISEÑO FACTORIAL COMPLETO DE CON LOS RESULTADOS DE CADA EXPERIENCIA. ....	111
<b>TABLA IX.5:</b> EFECTO DE LAS VARIABLES PRINCIPALES ASÍ COMO DE LAS INTERACCIONES DEL DISEÑO FACTORIAL COMPLETO (CALCULADAS SEGÚN EL ALGORITMO DE YATES). ....	112
<b>TABLA X.5:</b> DISEÑO DE DOEHLERT PARA TRES VARIABLES, PH, FE Y ZN. ....	113
<b>TABLA XI.5:</b> ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA EXPERIENCIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA SEGÚN DOEHLERT PARA TRES VARIABLES. ....	114
<b>TABLA XII.5:</b> CONDICIONES DE CULTIVO Y ACTIVIDAD PGASA RECUPERADA EN EL PRIMER ENSAYO DE DOS VARIABLES SEGÚN EL DISEÑO DE DOEHLERT. ....	116
<b>TABLA XIII.5:</b> CONDICIONES DE CULTIVO Y ACTIVIDAD PGASA RECUPERADA EN EL SEGUNDO ENSAYO A DOS VARIABLES SEGÚN EL DISEÑO DE DOEHLERT. ....	116
<b>TABLA XIV.5:</b> ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA SEGÚN EL DISEÑO DE DOEHLERT PARA DOS VARIABLES. ....	117
<b>TABLA XV.5:</b> MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO PARA LA OBTENCIÓN DE PGASA. ....	119
<b>TABLA XVI.5:</b> ORDENAMIENTO DE LOS DATOS EN UN DISEÑO FACTORIAL FRACCIONARIO EN ORDEN ESTÁNDAR. ....	121
<b>TABLA XVII.5:</b> TABLA DE CÁLCULO DE EFECTOS SEGÚN EL DISEÑO DE YATES PARA LAS VARIABLES INDEPENDIENTES Y SUS INTERACCIONES. ....	122
<b>TABLA I.6:</b> ACTIVIDAD RECUPERADA DE CULTIVOS CONTINUOS CON DIFERENTES LIMITACIONES. ....	134

## INDICE

### INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1:</b> ESTRUCTURA NORMAL DEL HOMOGALACTURONANO..	2
<b>FIGURA 2.1:</b> ESTRUCTURA ESQUEMÁTICA DEL ESQUELETO DE RAMNO-GALACTURONANO..	3
<b>FIGURA 3.1:</b> ESTRUCTURA BÁSICA DE LA CADENA DE XILOGALACTURONANO.	4
<b>FIGURA 4.1:</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA SUBUNIDAD DE TIPO II DE LA REGIÓN PILOSA DE LA PECTINA.	5
<b>FIGURA 5.1:</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA SUBUNIDAD DE TIPO III DE LA REGIÓN PILOSA DE LA PECTINA.	5
<b>FIGURA 6.1:</b> ENLACE DIFERÚLICO ENTRE CADENAS LATERALES DE MOLÉCULAS DE PECTINA Y LIGNINA.	6
<b>FIGURA 1.2:</b> GALA LIBERADO POR UNA MISMA CANTIDAD DE ENZIMA PERO CON DIFERENTES TAMAÑO DE PARTÍCULAS DESUSTRATO.	27
<b>FIGURA 2.2:</b> GALA LIBERADO POR UNA MISMA CANTIDAD DE ENZIMA CON DIFERENTES CANTIDADES DE PP.	28
<b>FIGURA 3.2:</b> GALA LIBERADO POR UNA MISMA CANTIDAD DE ENZIMA CON PP DE DIFERENTE TAMAÑO.	29
<b>FIGURA 4.2:</b> ACTIVIDAD REMANENTE EN EL SOBRENADANTE DE LA INCUBACIÓN A 0°C DE PPASA-SE CON PROTOPECTINA DE LIMÓN.	30
<b>FIGURA 5.2:</b> GALA LIBERADO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.	31
<b>FIGURA 6.2:</b> GALA LIBERADO POR CANTIDADES CRECIENTES DE ENZIMA.	32
<b>FIGURA 1.3:</b> RELACIÓN ENTRE LA LIBERACIÓN DE GALA, EL GRADO DE POLIMERIZACIÓN PROMEDIO Y EL TIEMPO DE INCUBACIÓN.	38
<b>FIGURA 2.3:</b> LIBERACIÓN DE GALA DE LA CANTIDAD DE ENZIMA.	39
<b>FIGURA 3.3:</b> ACTIVIDAD COMPARATIVA UTILIZANDO EL MÉTODO TRADICIONAL DE MEDIDA Y EL MÉTODO CON PREINCUBACIÓN EN HIELO.	40
<b>FIGURA 4.3:</b> ACTIVIDAD RECUPERADA EN RELACIÓN AL AGREGADO DE DIFERENTES CANTIDADES DE PRODUCTOS FINALES DE LA REACCIÓN.	41
<b>FIGURA 5.3:</b> EFECTO DE LA AGITACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	42
<b>FIGURA 6.3:</b> ACTIVIDAD PGASA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE PREINCUBACIÓN A TEMPERATURA CONSTANTE.	43
<b>FIGURA 7.3:</b> EFECTO DEL $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Y $CaCl_2$ .	44
<b>FIGURA 8.3:</b> ACTIVIDAD RELATIVA CON EL AGREGADO DE $CaCl_2$ Y DIFERENTES CANTIDADES DE $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .	45
<b>FIGURA 9.3:</b> ACTIVIDAD RELATIVA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CANTIDADES DE $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Y $MgCl_2$ Y CON $CaCl_2$ , EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Y $MgCl_2$ .	45
<b>FIGURA 10.3:</b> GRÁFICA DE MICHAELIS-MENTEN. VELOCIDAD INICIAL EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE SUSTRATO.	46
<b>FIGURA 11.3:</b> GRÁFICA DE HANES-HULTIN.	47
<b>FIGURA 1.4:</b> ESQUEMA DEL CRECIMIENTO CELULAR SEGÚN EL MODELO DE CAJA NEGRA.	52
<b>FIGURA 2.4:</b> DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UN CULTIVO EN BIORREACTOR.	56
<b>FIGURA 3.4:</b> FUENTE DE CARBONO, pH Y CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>GK EN MR</i> .	66
<b>FIGURA 4.4:</b> VELOCIDAD DE CONSUMO DE $O_2$ Y DE PRODUCCIÓN DE $CO_2$ EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.	66
<b>FIGURA 5.4:</b> CRECIMIENTO, CONSUMO DE GLUCOSA, GENERACIÓN DE ETANOL Y $O_2$ DISUELTO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN UN CULTIVO DE <i>GK</i> LIMITADO EN $O_2$ .	67

## INDICE

<b>FIGURA 6.4:</b> CRECIMIENTO, FCE REMANENTE Y BALANCE DE CARBONO EN CULTIVO CONTINUO A DIFERENTES VALORES DE D CON EL MR. ....	68
<b>FIGURA 7.4:</b> VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE FCE EN FUNCIÓN DE LA VELOCIDAD DE DILUCIÓN. CULTIVO CONTINUO EN MR. ....	69
<b>FIGURA 8.4:</b> VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE O <sub>2</sub> EN FUNCIÓN DE LA VELOCIDAD DE DILUCIÓN. ....	70
<b>FIGURA 9.4:</b> PERFIL DEL LAVADO DE UN CULTIVO CONTINUO DE <i>G. KLEBAHNII</i> A UNA VELOCIDAD DE DILUCIÓN DE 0.6 H <sup>-1</sup> . ....	71
<b>FIGURA 10.4:</b> VALORES DE S Y X CALCULADOS EN BASE A LOS COEFICIENTES CINÉTICOS Y ESTEQUIOMÉTRICOS DE <i>G. KLEBAHNII</i> .....	72
<b>FIGURA 11.4:</b> ESQUEMA METABÓLICO UTILIZADO PARA EL DISEÑO DEL MODELO DESCRIPTO EN LA SECCIÓN 3.4.3.....	77
<b>FIGURA 12.4:</b> VALORES DE LA RELACIÓN P/O EN CUATRO LIMITACIONES DIFERENTES EN FUNCIÓN DEL Y <sub>X/ATP</sub> .....	83
<b>FIGURA 1.5:</b> CRECIMIENTO COMPARATIVO DE <i>G. KLEBAHNII</i> CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.....	99
<b>FIGURA 2.5:</b> CRECIMIENTO DE <i>G. KLEBAHNII</i> Y PRODUCCIÓN DE PGASA EN MR. ....	102
<b>FIGURA 3.5:</b> DO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO A DIFERENTES pHS INICIALES. ....	103
<b>FIGURA 4.5:</b> ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FUNCIÓN DEL pH INICIAL DEL CULTIVO. ....	103
<b>FIGURA 5.5:</b> CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CULTIVOS CON DIFERENTE CANTIDAD DE NITRÓGENO .....	104
<b>FIGURA 6.5:</b> CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA UTILIZANDO DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO COMPLEJAS .....	105
<b>FIGURA 7.5:</b> EFECTO DE LOS MICROELEMENTOS SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR Y LA PRODUCCIÓN DE PGASA EN UN CULTIVO CON BACTOPEPTONA COMO FUENTE DE NITRÓGENO.....	106
<b>FIGURA 8.5:</b> CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>G. KLEBAHNII</i> EN EL MRD.....	108
<b>FIGURA 9.5:</b> ACTIVIDAD PGASA Y BIOMASA LUEGO DE RETIRAR LOS METALES DE A UNO EN EL MRD. ....	109
<b>FIGURA 10.5:</b> ACTIVIDAD PGASA EN RELACIÓN A LA COMPOSICIÓN DEL POOL MINERAL... ..	109
<b>FIGURA 11.5:</b> EFECTO DE LAS DIFERENTES VARIABLES E INTERACCIONES SOBRE LA ACTIVIDAD PGASA. ....	113
<b>FIGURA 12.5:</b> EFECTO DEL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE FE Y ZN SOBRE LA ACTIVIDAD PGASA CALCULADO EN BASE AL DISEÑO DE DOEHLERT. ....	115
<b>FIGURA 13.5:</b> EFECTO DEL pH Y DE LA CONCENTRACIÓN DE Fe <sup>+2</sup> SOBRE LA ACTIVIDAD PGASA .....	118
<b>FIGURA 14.5:</b> SDS -PAGE DE SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE <i>G. KLEBAHNII</i> CON DIFERENTE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	119
<b>FIGURA 1.6:</b> FORMA MICELIAR Y CELULAR DEL <i>G. KLEBAHNII</i> .....	127
<b>FIGURA 2.6:</b> ESQUEMA OPERATIVO DE LA SEPARACIÓN DE FORMAS CELULARES Y MICELIARES DE <i>G. KLEBAHNII</i> .....	129
<b>FIGURA 3.6:</b> ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FUNCIÓN DE LA VELOCIDAD DE DILUCIÓN EN UN CULTIVO CONTINUO EN ESTADO ESTACIONARIO. ....	130
<b>FIGURA 4.6:</b> VELOCIDAD ESPECÍFICA DE SÍNTESIS DE PGASA EN FUNCIÓN DE LA VELOCIDAD DE DILUCIÓN.....	131
<b>FIGURA 5.6:</b> EFECTO DEL pH SOBRE LA EXPRESIÓN DE PGASA SE.....	132
<b>FIGURA 6.6:</b> EFECTO DE LA NATURALEZA DE LA FCE SOBRE LA EXPRESIÓN DE PGASA.....	133

## INDICE

<b>FIGURA 7.6:</b> EFECTO DE UN PULSO DE GALA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. ....	134
<b>FIGURA 8.6:</b> ACTIVIDAD PGASA DE UN CULTIVO CONTINUO DE <i>G. KLEBAHNII</i> $D = 0.2 \text{ H}^{-1}$ . ....	135
<b>FIGURA 9.6:</b> ACTIVIDAD PGASA DE UN CULTIVO CONTINUO DE <i>G. KLEBAHNII</i> $D = 0.4 \text{ H}^{-1}$ . ....	136
<b>FIGURA 10.6:</b> ACTIVIDAD PGASA DE UN CULTIVO CONTINUO DE <i>G. KLEBAHNII</i> LIMITADO EN FUENTE DE NITRÓGENO A $D = 0.2 \text{ H}^{-1}$ .....	136
<b>FIGURA 11.6:</b> ACTIVIDAD PGASA DE UN CULTIVO CONTINUO DE <i>G. KLEBAHNII</i> LIMITADO EN FCE (GLICEROL) A $D = 0.2 \text{ H}^{-1}$ .....	137
<b>FIGURA 12.6:</b> ACTIVIDAD PGASA DE UN CULTIVO CONTINUO DE <i>G. KLEBAHNII</i> LIMITADO EN FCE (GALACTOSA) A $D = 0.2 \text{ H}^{-1}$ .....	137
<b>FIGURA 13.6:</b> ACTIVIDAD PGASA DE UN CULTIVO CONTINUO DE <i>G. KLEBAHNII</i> LIMITADO EN FOSFORO A $D = 0.2 \text{ H}^{-1}$ . ....	138
<b>FIGURA 14.6:</b> ACTIVIDAD PGASA DE UN CULTIVO CONTINUO DE <i>G. KLEBAHNII</i> LIMITADO EN FCE (GLUCOSA) A $D = 0.1 \text{ H}^{-1}$ . CULTIVO REALIZADO CON MRD. ....	139
<b>FIGURA 15.6:</b> PERFIL DE TAMAÑO CELULAR EN UN CULTIVO CONTINUO LIMITADO EN GLUCOSA .....	141
<b>FIGURA 16.6:</b> PERFIL DE TAMAÑO CELULAR EN UN CULTIVO CONTINUO LIMITADO EN NITRÓGENO. ....	141
<b>FIGURA 17.6:</b> PERFIL DE TAMAÑO CELULAR EN UN CULTIVO CONTINUO LIMITADO EN GLICEROL .....	142
<b>FIGURA 18.6:</b> PERFIL DE TAMAÑO CELULAR EN UN CULTIVO CONTINUO LIMITADO EN GALACTOSA .....	142
<b>FIGURA 19.6:</b> PERFIL DE TAMAÑO CELULAR EN UN CULTIVO CONTINUO LIMITADO EN FOSFATO. ....	143
<b>FIGURA 20.6:</b> CURVAS DE CRECIMIENTO EN BATCH (MR) DE <i>G. KLEBAHNII</i> A PARTIR DE CÉLULAS SEPARADAS POR TAMAÑO. ....	144

## CAPITULO 1

### Introducción general

#### 1. Sustancia pécticas y enzimas pectolíticas

##### 1.1. Polisacáridos de la pared celular

La pectina es uno de los polisacáridos constituyentes de la pared celular de plantas superiores. Además de pectina, la pared posee celulosa, xiloglucanos, xilanos, arabinoxilanos, arabinanos, arabinogalactanos, galactanos, glucanos, glicoproteínas, (galacto)-glucomananos y lignina <sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>. Estos polisacáridos, en conjunto, son los compuestos orgánicos encontrados en mayor cantidad en la naturaleza.

Están comprendidos en tres grupos principales: celulosa, hemicelulosa y pectina.

La celulosa constituye la fracción mayor en la pared celular en conjunto y consta de cadenas lineales (no ramificadas) de glucosa en uniones  $\beta$  1-4. Las cadenas de celulosa están ordenadas en fibras y son las responsables de mantener la rigidez de la pared celular.

La hemicelulosa es un grupo más heterogéneo de polisacáridos y como tal, es el segundo en cantidad. Los componentes principales de la hemicelulosa varían dependiendo del tipo de vegetal al que pertenezcan. En cereales y madera duras el componente mayoritario es el xilano, el cual está compuesto de un esqueleto de xilosas unidas en enlace  $\beta$  1-4 que puede estar substituido con diferentes grupos laterales tales como L-arabinosa, D-galactosa, acetilos y residuos de ácido glucurónico <sup>6</sup>. En maderas más blandas y también en algunas duras se encuentra una segunda estructura de hemicelulosas compuestas por (galacto)-glucomananos los que están formados por un esqueleto de glucosas y manosas unidas por enlaces  $\beta$ -1-4 y contienen residuos laterales de galactosa <sup>7</sup>.

El tercer grupo de polisacáridos de la pared celular es la pectina la cual esta formada por un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (GALA) unidos en enlaces  $\alpha$ -1-4. La cadena de poligalacturónico (PGA) está interrumpida por residuos de ramnosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1-2. Estos residuos de ramnosa suelen tener unidas largas cadenas laterales de L-arabinosa y D-galactosa. En algunas pectinas (provenientes de remolacha y manzana) las cadenas laterales suelen terminar en ácido ferúlico unido al O-5 de la arabinosa o al O-2 de la galactosa.

##### 1.2 Sustancias pécticas.

###### 1.2.1. Nomenclatura y composición.

Históricamente, la nomenclatura de la pectina y sustancias pécticas ha sido muy confusa debido a la gran cantidad de nombres dados a las diferentes formas encontradas de las mismas dependiendo del modo por el cual hubieran sido producidas.

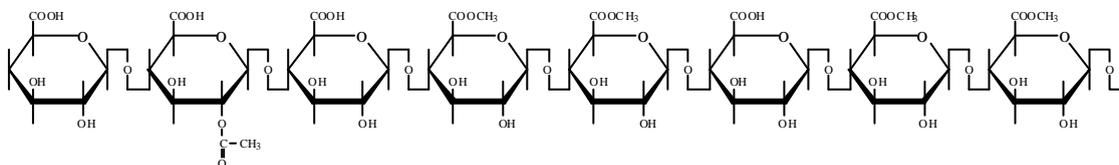
Se utiliza generalmente el término “**sustancias pécticas**” como una denominación de grupo para los polisacáridos complejos provenientes de tejidos vegetales y que contienen en su composición química una gran proporción de unidades de ácido galacturónico formando cadenas. Los grupos carboxilos pueden estar parcialmente esterificados con metanol y parcial o completamente neutralizados por una o más bases. El término abarca a los ésteres de metoxilos (la pectina), las cadenas no metoxiladas (los ácidos pécticos) y las sales (los pectatos) junto con ciertos polisacáridos neutros (arabinanos, arabinogalactanos y galactanos) que no poseen el esqueleto de poligalacturonano y que están normalmente asociados a la pectina.

**Protopectina:** (PP) se utiliza para denominar a la sustancia péctica insoluble en agua presente en tejidos vegetales que origina pectina o pectatos solubles por depolimerización parcial. No puede ser extraída del tejido vegetal por métodos no degradativos.

**Pectina HM** y **pectina LM** son términos utilizados para pectinas comerciales de alto y bajo contenido de metoxilos utilizadas como agentes gelificantes <sup>8</sup>.

Las **pectinas** son heteropolisacáridos complejos que contienen dos regiones definidas <sup>9</sup>.

**Regiones lisas:** están compuestas principalmente por los esqueletos de restos de ácido poligalacturónico esterificados o no con metanol en el C-6 y/o con acético en C-2. A esta estructura se le denomina homogalacturonano (HG). La figura 1.1 muestra una porción de la región del esqueleto carbonado de las regiones lisas.



**Figura 1.1:** Estructura normal del homogalacturonano encontrado en las regiones lisas de la pectina. El número de restos metilados y/o acetilados depende de la fuente de la cual se obtuvo la pectina.

La esterificación de los grupos carboxilo del GALA con metanol es una característica muy importante que le confiere a la pectina sus propiedades estructurales y funcionales.

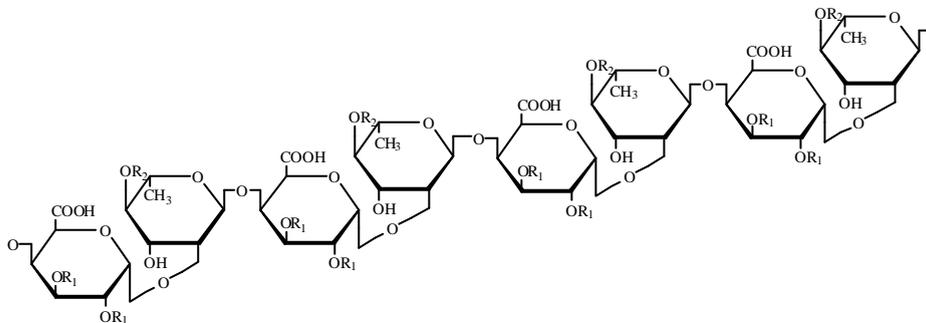
Como parámetro de la cantidad de grupos esterificados con metanol se usan alternativamente dos unidades distintas, el grado de esterificación y el contenido de metoxilos. El grado de esterificación se define como la cantidad de grupos carboxilos pertenecientes a los restos de GALA esterificados en relación a su número total. El contenido de metoxilos se calcula relacionando la masa total de grupos metoxilos en relación a la masa total de restos de GALA (esterificados o no). Un grado de esterificación de 100 % (todos los grupos carboxilos neutralizados con metanol) se corresponde con un contenido de metoxilo de 16.32 %.

El porcentaje de restos de GALA esterificados varía enormemente dependiendo de la fuente de la cual se haya extraído e incluso dentro del mismo tejido vegetal. Valores habitualmente encontrados son: 75 % para semillas de colza <sup>10</sup>, 32% en papa y cebolla <sup>11 12</sup>,

71 % en manzana <sup>13</sup>, 55 % en remolacha <sup>13</sup>, 13 % en pera <sup>13</sup>, 68 % en mango <sup>13</sup>, 64 % en cítricos <sup>13</sup>, 17 % en girasol <sup>13</sup> y en hojas de tabaco la pectina no está esterificada <sup>14</sup>.

Como puede verse, el grado de esterificación raramente supera el 70 %. Pectinas con alto contenido de grupos metoxilo sólo gelifican en presencia de concentraciones relativamente altas de azúcar y en medio ácido. Con pectinas de bajo contenido de metoxilos en cambio se produce la gelificación en ausencia de azúcar si existen cierta concentración de iones. En relación a este parámetro se diferencian dos categorías, a las pectinas con un contenido de metoxilos mayor del 8 % (grado de esterificación mayor de 50) se las denomina pectina HM (high methoxil) o simplemente pectinas y aquellas con un contenido de metoxilos menor que 8 %, pectinas LM (low methoxil). En el extremo inferior de la escala de grado de metilación se encuentran los **pectatos o ácidos pécticos**.

**Regiones pilosas:** poseen un esqueleto de ramnogalacturonano (RG) compuesto de dímeros (unidos entre si por enlaces  $\alpha$ -1-4) de ácido galacturónico en unión  $\alpha$ -1-2 con ramnosa <sup>1 2</sup>. La composición en azúcares varía ampliamente dependiendo de cual sea la fuente de la cual se obtuvo la pectina. El porcentaje total de ramnosa es de 1 - 4 %. A estos residuos de ramnosa se unen otros azúcares formando largas cadenas laterales. Los más comunes son D-galactosa, L-arabinosa aunque pueden encontrarse pero con una frecuencia mucho menor D-xilosa, D-glucosa, D-manosa, L-fucosa y ácido D-glucurónico e incluso algunos azúcares raros como 2-O-metilfucosa, 2-O-metilxilosa, así como la pentosa apiosa y algunas cadenas de azúcares ácidos ramificados como el 3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilosa y ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octuloso. Estos últimos, más extraños, suelen estar en cadenas cortas de no más de tres residuos <sup>2, 15, 3</sup>. La figura 2.1 muestra la estructura básica del ramnogalacturonano.



**Figura 2.1:** estructura esquemática del esqueleto de ramnogalacturonano. R<sub>1</sub> puede ser H o grupos acetilo (-CO-CH<sub>3</sub>). R<sub>2</sub> puede ser H o una serie de cadenas de composición y tamaño variable dependiendo de la fuente de la pectina.

Los azúcares más comunes encontrados en R<sub>2</sub>, galactosa y arabinosa, aparecen en cadenas estructuralmente complejas con estructuras del tipo arabinano y arabinogalactano, estas cadenas pueden tener un largo considerable y se unen al esqueleto de PGA por enlaces glicosídicos al O-4 u O-3 de la ramnosa o al O-2 u O-3 de algunos residuos de GALA.

También es variable el porcentaje de restos de ramnosa ramificada (dentro de las zonas pilosas): entre 25% y 100 % en pectina de manzana <sup>16</sup>, 30-50% en hojas de tabaco <sup>17</sup>, 10-50 % en zanahoria <sup>18,19</sup>, 20-40% en repollo <sup>18</sup>, menos de 30% en uvas <sup>20</sup> 60 % en remolacha <sup>21</sup>, 20-40% en tomate <sup>22</sup>, menos de 30% en kiwi <sup>23</sup> y 30 % en cáscara de guisante <sup>24</sup>.

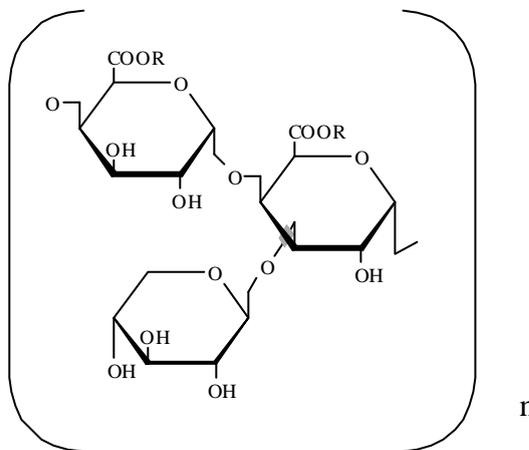
Los arabinanos son polisacáridos ramificados compuestos de un esqueleto de residuos de arabinosa unidos en enlace  $\alpha$ -(1-5), las ramificaciones se producen por uniones de arabinosa al O-2 y/o O-3 de algunos residuos de la cadena principal. Pectinas con arabinanos unidos se han aislado de manzana <sup>25,26,27</sup>, remolacha <sup>21,28,29,30,31</sup>, semillas de colza <sup>32</sup>, damasco <sup>33</sup>, zanahoria <sup>18,19</sup>, repollo <sup>34</sup>, cebollas <sup>12,35</sup>, peras <sup>36</sup> y cáscara de guisante <sup>24</sup>.

Los arabinogalactanos poseen dos formas estructurales posibles. Los de tipo I poseen una cadena lineal de D-galactosa (forma piranósica) unidas por enlaces  $\beta$ -(1-4) con ramificaciones de pequeñas cadenas de L-arabinosa (forma furanósica) unidas en enlaces  $\alpha$ -1-5. Las cadenas laterales están unidas en general al O-3 y representan un 20-40% de la cadena total <sup>2,4</sup>.

Pectinas con este tipo de arabinogalactanos se han aislado frecuentemente de cítricos <sup>37</sup>, papa <sup>38,39</sup>, soja <sup>40</sup>, tabaco <sup>41</sup>, cebolla <sup>12</sup>, manzana <sup>42,25,16,27,13</sup>, kiwi <sup>23</sup>, tomate <sup>22</sup> y repollo <sup>34</sup>.

Los de tipo II poseen una estructura altamente ramificada con cadenas de D-galactosa (forma piranósica) unidos en  $\beta$ -1-3 y  $\beta$ -1-6. Las cadenas laterales más externas poseen además restos de arabinosa (formas piranósicas y furanósicas) <sup>1,2,4,43,5</sup>.

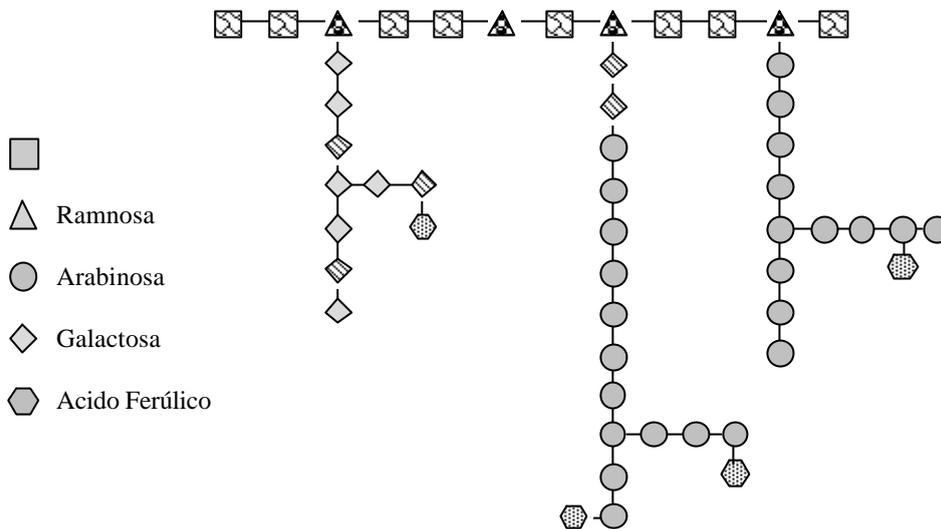
Pectinas con este tipo de arabinogalactanos unidas se encuentran en manzana <sup>44,25,27,13,5</sup>, colza <sup>32,45</sup>, limón <sup>46</sup>, remolacha <sup>21</sup> y uva <sup>20</sup>.



**Figura 3.1:** Estructura básica de la cadena de xilagalacturonano.  
R puede ser alternativamente H o restos de metilo (-CH<sub>3</sub>).

En general, la región pilosa puede dividirse en subunidades. La subunidad de tipo I posee restos de xilosa unidos al O-3 de los restos de GALA. Su esqueleto está compuesto de homogalacturonano y está ubicada en la región de unión entre las zonas lisas y pilosas. A esta cadena se la llama también cadena de xilagalacturonano. En la figura 3.1 se muestra la estructura básica de dicha subunidad.

Los restos de xilosa de esta sección de la pectina la hacen muy resistentes al ataque enzimático. Esta región fue descrita hace relativamente poco tiempo por los

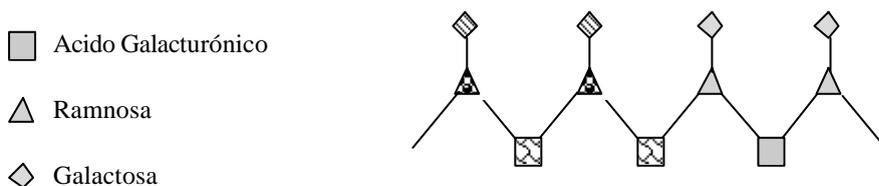


**Figura 4.1:** representación esquemática de la subunidad de tipo II de la región pilosa de la pectina.

grupos de Voragen<sup>47, 48</sup> y Mort<sup>49</sup> en pectinas extraídas de diversas frutas mientras que Kikuchi y col<sup>50</sup> reportan su presencia en pectina de zanahoria.

La subunidad de tipo II es la que posee las cadenas de ramnosa con las cadenas laterales de arabinanos, arabinogalactanos y galactanos. En la figura 4.1 se esquematiza la estructura de esta zona

Las subunidades de tipo III están formadas un esqueleto de ramnogalacturonano con galactosas unidas por enlaces  $\beta$  1-3 o 1-6 a la ramnosa. Esquemáticamente esta región puede representarse como se indica en la figura 5.1.



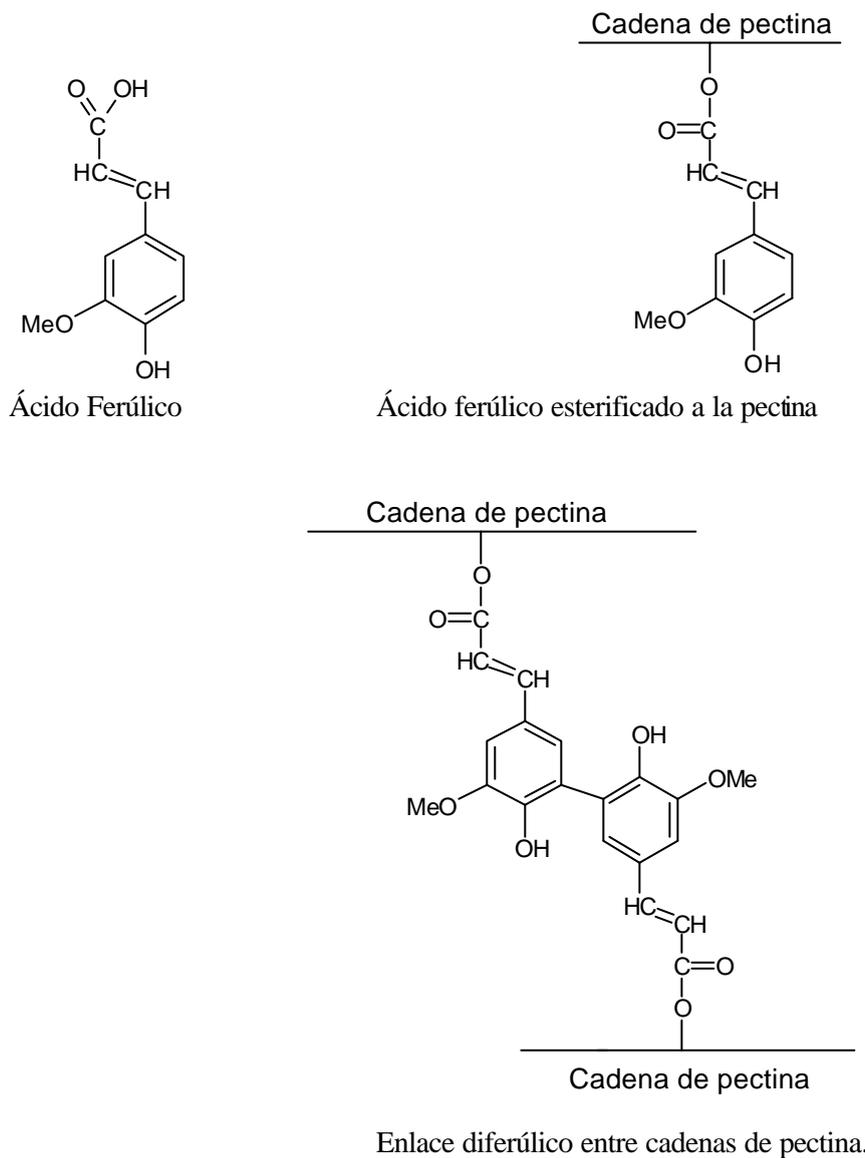
**Figura 5.1:** representación esquemática de la subunidad de tipo III de la región pilosa de la pectina.

### 1.2.2 Relación con otros polisacáridos dentro de la pared celular.

La pared celular se puede dividir en tres capas, lamina media, pared celular primaria y pared celular secundaria. La proporción de pectina en cada capa descende en ese orden<sup>51</sup>. En la pared celular secundaria la pectina prácticamente no existe. El conocimiento de la

estructura de la lamina media es aun parcial pero se sabe que consiste principalmente de sales de pectato de calcio <sup>5, 52, 53, 54</sup>.

La hemicelulosa y la pectina interactúan con las fibras de celulosa creando una estructura rígida que le da cohesión a la pared celular. Entre los diferentes tipos de polisacáridos se forman entrecruzamientos covalentes de dos tipos diferentes <sup>55</sup>. El que ha sido estudiado con más detalle es aquel formado por puentes entre ácido ferúlicos de las cadenas laterales. Estos puentes han sido hallados en varios tejidos vegetales. Se ha reportado su existencia en arabinoxilanos en brotes de bambú <sup>56</sup>, polímeros de pectina en remolacha <sup>57</sup> y entre lignina y xilanos en trigo <sup>58</sup>. La figura 6.1 muestra el enlace entre restos de ácido ferúlico de cadenas de pectina.



**Figura 6.1:** Enlace diferúlico entre cadenas laterales de moléculas de pectina y lignina.

El segundo tipo de unión covalente es de tipo éster entre lignina y residuos de ácido glucurónico pertenecientes a xilanos. Este tipo de uniones fue reportado en madera de haya<sup>59 60</sup>.

### 1.3. Enzimas pectolíticas.

Debido a la gran complejidad química de la pectina y a su abundancia en la naturaleza, los microorganismos poseen una gran variedad de enzimas capaces de degradarla de alguna forma a fin de utilizarla como fuente de carbono. En general, estas enzimas son de tipo inducible y su síntesis responde a la presencia extracelular del sustrato. La degradación enzimática total de la pectina resulta primordialmente en GALA y ramnosa junto a cantidades menores de galactosa, arabinosa, metanol, acetato y trazas de otros azúcares tales como xilosa, fucosa, apiosa, etc. los cuales son metabolizados durante el crecimiento celular.

No existe un único criterio para catalogar a las enzimas que actúan sobre la pectina. Una posibilidad es diferenciarlas según la acción que realizan sobre el sustrato. De esta forma pueden encontrarse dos grandes grupos, en el primero de ellos se encuentran las enzimas desesterificantes, la actividad dentro de este grupo puede ser dividida a su vez según la naturaleza del grupo éster que hidroliza (metil, acetil o ferul)

En el otro se encuentra una serie amplia de enzimas depolimerizantes. Las enzimas incluidas dentro de este grupo pueden atacar preferentemente a las zonas lisas (HG) o a las pilosas (RG) y pueden ser divididas según (al menos) tres criterios (enzymic comition, 1944):

- Según el sustrato que prefieran: pectina, ácidos pécticos, protopectina u oligo-D-galacturonatos
- Según actúen por hidrólisis o transeliminación
- Según el sitio de ataque a la cadena: aleatoriamente dentro de la cadena (endo) o desde el extremo de la misma (exo).

Por cuestiones de claridad se dividirán a las enzimas en dos grupos, según ataquen la región de HG o RG.

#### 1.3.1 Enzimas que atacan al homogalacturonano.

##### 1.3.1.1 Esterasas

**Pectin metil esterasa:** Corta los enlaces éster del C-6 liberando el metanol y convirtiendo la pectina de alto grado de esterificación en pectatos de bajo grado de esterificación. Estas enzimas son producidas por varias plantas superiores, tomate, cítricos, papas, manzana, banana, uvas, etc así como varios hongos y bacterias<sup>61</sup>. Las enzimas de origen vegetal tienen pHs óptimos cercanos a la neutralidad mientras que las de origen microbiano poseen pH óptimos ligeramente más ácido (entre 4.0 y 5.0).

**Pectin acetilsterasa:** Rompe el enlace éster entre el acético y C-3 o C-4 de los restos de GALA de la región de homogalacturonano<sup>8</sup>.

### 1.3.1.2 Hidrolasas

**Endopoligalacturonasas (endo-PG):** actúan sobre ácido poligalacturónico o ácidos pécticos liberando monómeros de GALA u oligómeros de dos o tres restos. Su acción puede dividirse en dos subclases según corten una cadena de HG en múltiples ocasiones (ataque múltiple a cadena simple) o se separen del sustrato luego del corte para unirse a un nuevo blanco (ataque simple a cadenas múltiples). En el primer caso se acumulan los productos finales de reacción desde el comienzo pero, dado que en general presentan mayor afinidad por moléculas de sustrato con mayor grado de polimerización, en el segundo caso los productos finales se acumulan recién al final del proceso de hidrólisis <sup>62</sup>. El primer patrón de actividad se encuentra por ejemplo en la endo-PG de *Colletotrichum lindemuthianum* <sup>63, 64</sup> mientras que el segundo se observa en la actividad de endo-PG de *Kluyveromyces fragilis* <sup>65</sup>.

Estas enzimas actúan específicamente sobre ácidos pécticos o pectatos. Su actividad (grado y velocidad de hidrólisis) disminuyen con el incremento del grado de esterificación. La actividad, tal como se mencionó previamente, también depende marcadamente del grado de polimerización del sustrato. A medida que la cadena de sustrato se acorta, disminuye la afinidad de la enzima por el mismo <sup>66</sup>.

Estas enzimas son producidas por una gran variedad de hongos, levaduras y bacterias <sup>62, 67, 68, 69</sup> así como por varias plantas superiores y algunos nematodos parásitos de plantas <sup>70</sup>.

**Exopoligalacturonasas (exo-PG):** Las exo-PG ocurren con una frecuencia menor que las endo-PG. Son producidas por hongos y algunas bacterias <sup>62, 69</sup>.

Dos tipos de exo-PG pueden ser identificados según su origen y su mecanismo de acción. Las enzimas fúngicas producen monogalacturónico a partir del extremo no reductor como producto principal de reacción. Poseen pHs óptimos comprendidos entre 4.0 y 6.0. Este grupo de enzimas se denomina galacturonan 1,4- $\alpha$ -galacturonidasa o exo-PG de tipo I, un ejemplo de este tipo de enzimas es la producida por *Coniothyrium diplodiella* <sup>62</sup>.

En contraposición, las enzimas de origen bacteriano como la generada por *Erwinia aroideae* o *Selenomonas ruminantium* <sup>71</sup> producen digalacturónico como producto principal. Estas enzimas se denominan exo-poli- $\alpha$ -galacturonidasa o exo-PG 2. Al igual que las de tipo 1, atacan al sustrato por su extremo no reductor.

**Polimetilgalacturonasa (PMG):** A pesar de se ha reportado en algunas ocasiones la existencia de esta enzima <sup>72, 73</sup>, su existencia no está confirmada. En teoría esta enzima degradaría el HG altamente esterificado.

Hay sospechas de que la presencia de dicha actividad enzimática en realidad se debería a la actividad de la endo-PG contaminada con pectin-metilesterasa <sup>74</sup>. Por otro lado a menos que el HM este esterificado en un 100 % la endo-PG puede actuar aunque en poca cuantía, pudiendo generar falsos resultados sobre la existencia de PMG.

**Oligogalacturonasa (OG):** Estas enzimas son muy poco comunes y hay muy pocos reportes sobre ellas <sup>75, 76</sup>. El sustrato consiste en oligómeros saturados, los que son atacados por el extremo no reductor liberando monómeros de GALA.

### 1.3.1.3 Liasas:

Estas enzimas, también llamadas transeliminadas catalizan la ruptura no hidrolítica de la cadena de pectina o pectato. Rompen el enlace glicosídico en el C 4 eliminando al mismo

tiempo un hidrógeno del C-5 <sup>77</sup>. Durante la ruptura se genera un doble enlace en el extremo no reductor de la cadena resultante.

**Pectin-liasas (PeL):** también llamadas polimetilgalacturonato liasas (PMGL), estas enzimas son las únicas enzimas sobre las que hay pruebas de que pueden depolimerizar pectina y el HG altamente metilado. A diferencia de las hidrolasas, no requieren calcio para su actividad. Han sido halladas en cultivos de varios tipos de hongos pero raramente en bacterias <sup>78</sup>.

Todas ellas poseen actividad endo, generando una rápida caída de la viscosidad de las soluciones de pectina. En general poseen pHs óptimos ligeramente superiores a las hidrolasas, estando comprendidos en el rango de 5 a 9. Los poligalacturonatos no son atacados por estas enzimas. Tal como ocurre con las hidrolasas, la actividad decrece con la disminución de la longitud de la cadena del sustrato.

**Pectato liasas:** también llamadas poligalacturonatoliasas, son producidas por varios hongos y bacterias <sup>62</sup>. A diferencia de las pectin liasas actúan sobre sustratos con bajo grado de esterificación y requieren  $\text{Ca}^{+2}$  para su actividad óptima <sup>79, 80</sup>.

Según su mecanismo de acción pueden ser divididas en dos grandes grupos:

**Endopoligalacturonatoliasas (endo-PGL):** a diferencia de las endo-PG, los pHs óptimos son marcadamente superiores, actuando mejor a pH comprendidos entre 8.0 y 10.0. Todas las endo PGLs son activadas por  $\text{Ca}^{+2}$  <sup>81</sup>. Los productos finales mayoritarios de estas enzimas son los dímeros de gala insaturado en su extremo no reductor aunque también pueden encontrarse trímeros de GALA insaturado y monómeros y dímeros de GALA saturados <sup>82</sup>. Como todas las demás enzimas depolimerizantes, su actividad decrece con la disminución de la longitud de la cadena del sustrato.

**Exopoligalacturonatoliasas (exo-PGL):** La característica distintiva de este grupo de enzimas es que libera oligogalacturonatos insaturados desde el extremo reductor de la molécula de sustrato <sup>83</sup>, siendo su sustrato de menor tamaño que pueden atacar el trímero. Al igual que las endo PGL, tienen pHs óptimos elevados.

**Oligogalacturonato liasas (OGL):** Son producidas por algunas bacterias fitopatogenas como *Erwinia carotovora* <sup>84</sup>. Tienen la particularidad de ser enzimas ligadas a membrana que degradan oligogalacturonatos (saturados o no) liberando monómeros insaturados desde el extremo reductor.

Las pectin y pectato liasas son muy comunes en hongos, habiendo sido halladas en la mayoría de las especies en las que fueron buscadas <sup>85, 86, 87, 88, 89, 90, 91</sup>. En bacterias son más comunes las pectato liasas, siendo el grupo más numeroso de enzimas pectolíticas bacterianas.

#### 1.3.1.4 Protopectinasas (PPasa):

También llamada enzimas solubilizadoras de pectina, estas enzimas se caracterizan por liberar pectina de alto peso molecular a partir de protopectina <sup>92</sup>. Son éstas un grupo heterogéneo de enzimas que poseen diferentes actividades catalíticas, liasas e hidrolasas con actividad endo y exo.

La existencia de este grupo de enzimas como tal, actualmente se pone en duda ya que se caracterizó la actividad enzimática de varias de ellas y se vió que su mecanismo de acción es prácticamente igual al de las enzimas descriptas anteriormente para sustratos solubles. En el caso particular de *G. klebahnii*, Iguchi y col <sup>93</sup> hallaron que el gen que

codifica para la PPasa objeto de esta tesis muestra una gran homología con poligalacturonasas clásicas.

Parece más lógico considerar a la actividad PPasa como una característica particular de algunas enzimas pectolíticas que tienen una afinidad particularmente alta por sustratos insolubles<sup>94</sup>.

### 1.3.2 Enzimas que atacan al ramnogalacturonano.

Las enzimas que actúan sobre esta parte de la pectina fueron aisladas y caracterizadas hace relativamente poco tiempo por lo que es menor el número que se conoce de ellas.

Poseen distintos tipos de actividad: La primera de ellas actúa sobre el enlace  $\alpha$ -D-galacturónico-(1,2)- $\alpha$ -L-ramnosa hidrolisándolo mientras que la segunda tienen actividad liasa sobre el enlace  $\alpha$ -L-ramnosa (1-4)  $\alpha$ -D-galacturónico. La primera de ellas se denomina actualmente Ramnogalacturonatohidrolasa (RG-hidrolasa) mientras que la segunda se denomina Ramnogalacturonatoliasa (RG-liasa).

También se han caracterizado dos enzimas que actúan sobre fragmentos de RG. Ambas poseen actividad exo hidrolasa. La primera de ellas libera ramnosa (Ramnogalacturonan ramnohidrolasa) y la otra GALA (Ramnogalacturonan galacturonohidrolasa) desde el extremo no reductor del esqueleto de RG<sup>95, 96</sup>.

Accesorias a estas, se ha identificado una acetil esterasa (ramnogalacturonan acetil esterasa) que hidroliza el enlace ester entre restos acetilos y el O-2 y O-3 de los residuos de GALA del esqueleto de RG. Este paso es indispensable en la degradación del RG ya que ni la RG hidrolasa ni la RG liasa atacan al RG cuando éste posee un alto grado de esterificación.

Todas estas enzimas fueron obtenidas a partir de cultivos de *Aspergillus aculeatus* pero también han sido detectadas en cultivos de *Aspergillus niger*, *Irpex lacteus*, *Trametes sanguinea* y *Botrytis cinerea*<sup>97</sup>.

Estas enzimas poseen una gran importancia tecnológica ya que ayudan a la solubilización y fragmentación de las regiones pilosas facilitando la extracción y filtrado de jugos.

Además de las enzimas descritas, existen otras que están involucradas en la degradación de las ramificaciones que se han denominado enzimas accesorias. La mayor parte de las enzimas auxiliares o accesorias se han estudiado en bacterias y hongos filamentosos, en particular los del género *Aspergillus*<sup>98</sup>. Entre las enzimas accesorias tenemos: **a-L-Arabinofuranosidasas** y **arabinoxilano arabinofurano hidrolasa**, **Endo-arabinasas**, **a- y b-Galactosidasas**, **Endo- y exo-galactanasas**, **Feruloil- y p-coumaril-esterasas**, etc. Estas enzimas son indispensables para permitir la completa degradación y utilización de la pectina por parte de los microorganismos.

## 1.4 Uso industrial de las enzimas pécticas

Las enzimas pécticas han sido utilizadas en diversas industrias desde hace al menos medio siglo. La industria que más se ha valido de ellas es la industria alimentaria, aunque también han sido utilizadas por la industria textil, la papelera, la maderera, etc<sup>99, 100</sup>.

Quizás la aplicación más clásica de las pectinasas sea el relacionado con la industria juguera. Luego de la obtención del jugo de frutas por prensado, el producto obtenido presenta cierta turbiedad debido a la presencia de restos de tejidos y de “nubes” de proteínas positivas rodeadas de moléculas de pectina cargadas negativamente <sup>101</sup>. Estos complejos proteína-pectina no precipitan debido a repulsiones de tipo electrostáticas y le confieren al jugo un aspecto poco atractivo. El agregado de enzimas pécticas, bien pectin liasa, bien una mezcla de pectín esterasa y pectato liasas, promueve la degradación de la capa externa de pectina permitiendo la exposición sobre la superficie de las partículas de las proteínas contenidas en su interior. Esto genera zonas de carga positivas y zonas de carga negativa sobre las partículas promoviendo su interacción y posterior precipitación.

Los jugos que habitualmente se someten a proceso de clarificación son aquellos cuyas características organolépticas y su aceptación por el público mejoran por el hecho de ser transparentes. Tal es el caso, por ejemplo, del jugo de manzana y el de uva.

Contrariamente, en los jugos cítricos, el proceso de clarificación ocurre espontáneamente ya que la pectina que se solubiliza durante la extracción del jugo, es deseterificada por las pectin metil esterases propias del fruto. Los grupos carboxilos liberados por la enzima reaccionan con iones divalentes y precipitan. Este proceso le da al jugo mal aspecto por lo que se le agregan pectato liasas o pectin liasas que rompen parcialmente las cadenas de pectina evitando que precipiten.

Dentro de la misma industria, el agregado de pectinasas a la pulpa de los frutos previo a su prensado, aumenta el rendimiento de jugo extraído y facilita enormemente su procesado (especialmente el filtrado). Un proceso semejante se está utilizando para incrementar la extracción de aceite en frutos tales como olivo, palma y coco.

También dentro de la industria alimentaria, el uso de las enzimas pécticas es muy común para la obtención de néctares, aditivos para alimentos y alimentos para infantes mediante el proceso denominado maceración. El agregado de pectinasas (pectin liasa y poligalacturonasa) a tejidos vegetales produce la descomposición de la lámina media con la consiguiente liberación de las células. Frutos y vegetales comúnmente utilizados en estos procesos son peras, duraznos, damascos, frutillas <sup>102,103</sup> para los néctares y zanahoria y morrón en los alimentos para niños.

La gran ventaja de este proceso es que el alimento conserva gran parte del contenido de pigmentos y vitaminas ya que no salen de las células y no son degradados por el ambiente.

Estas enzimas, particularmente aquellas que actúan más fuertemente sobre sustratos insolubles (protopectina) que sobre pectinas solubles generan también un gran interés en el diseño de métodos alternativos para la extracción de pectina. Sakai y Okushima <sup>104</sup> describen un método microbiológico para la “producción” de pectina en el que se utiliza la PPasa de *G. klebahnii*. En el proceso descrito se hace crecer aeróbicamente *G. klebahnii* en un cultivo batch y luego de 24 Hs, al cultivo se le adiciona una suspensión de cáscaras de mandarina (*Citrus unshiu*) y se agita a 30 °C por 15 a 20 Hs. Este tipo de procesos puede utilizarse como una alternativa a los métodos químicos tradicionales de extracción: extracción ácida (pH 2) en caliente (80-100°C).

Como en el resto de las industrias ligadas a la microbiología, la ingeniería genética a provocado una revolución debido a la posibilidad de clonar y expresar en forma heteróloga los genes de estas enzimas consiguiendo cantidades y purezas imposibles de alcanzar por métodos convencionales. Esto ha permitido armar mezclas de enzimas óptimas para cada uno de los procesos en los que se vea involucrado su uso.

## 1.5 *Geotrichum klebahnii*.

### 1.5.1 Características generales.

Algunos años atrás, Sakai y col. en la Universidad Prefectural de Osaka (Japón) iniciaron la búsqueda de microorganismos productores de protopectinasas con el fin de poder utilizar dichas enzimas en la extracción enzimática de pectina. La primera PPasa fue aislada a partir de una levadura (*Trichosporon penicillatum* SNO-3, ATCC 42397) en 1978<sup>105</sup>. La enzima fue llamada comercialmente Pectinase-SE. Químicamente es una glicoproteína con un peso molecular de 40000 D (medido por SDS Page) que el microorganismo secreta directamente al medio de cultivo. La enzima fue purificada, parcialmente caracterizada e identificada como una endopoligacturonasa (EC 3.2.1.15)<sup>106</sup>,<sup>107</sup>.

Ha habido dudas por largo tiempo acerca de la taxonomía del microorganismo. Hasta la década del '70 fue catalogado como perteneciente al género de levaduras *Trichosporon*. Este género se caracteriza por tener células gemante de forma muy variable, presentar micelio verdadero y por la formación de artrosporas<sup>108</sup>. En 1977 el *T. penicillatum* fue transferido al género *Geotrichum* y clasificado como un hongo.<sup>109</sup>. Actualmente se lo denomina *Geotrichum klebahnii*.

El género *Geotrichum* esta comprendido dentro del phylum ascomycota. Los miembros de este género son hongos levaduriformes caracterizados por hifas estrechas con ramificaciones escasas y cortas. No poseen blastoconidias, conidioforos ni pseudohifas pero si presentan artroconidias con un tamaño promedio de 6-12 x 3-6 µm, unicelulares, en cadena, hialinas que resultan de la fragmentación de hifas indiferenciadas por fisión mediante la formación de septos dobles. Pueden ser rectangulares o poseer los extremos redondeados asemejándose a pequeños barriles. La ausencia de células vacías que al fragmentarse produzcan la liberación de las artroconidias (células separadoras) es típica de este genero<sup>110, 111, 108, 112</sup>.

*Geotrichum* posee en medio sólido un crecimiento rápido con la formación de colonias blancas secas con aspecto de algodón. En medios ricos al final de la fase de crecimiento genera un fuerte aroma a fruta<sup>110, 111</sup>.

Nutriente	Crecimiento	Nutriente	Crecimiento
D-glucosa	+	Almidón	-
D-Galactosa	+	Glicerol	-
L-sorbosa	-	Nitrato	-
D-Ribosa	+	Urea	+
Ramnosa	-	Lactato	+
Sacarosa	-	D-Manitol	+
Maltosa	-	DL-lactato	+(pobre)
Lactosa	-	Succinato	+
		Etanol	+

**Tabla I.1:** propiedades metabólicas de *G. klebahnii* obtenidas de bibliografía<sup>108</sup>

Es poca la información que existe acerca del metabolismo de *G. klebahnii* aparte de aquella utilizada en para la taxonomía. Uso de azúcares para el crecimiento, crecimiento sin vitaminas, fuentes de nitrógeno posibles etc. En la tabla I.1 se resume parte de la información disponible.

### 1.5.2 *Geotrichum* como productor de enzimas.

*G. klebahnii* es un microorganismo que posee un pool pobre de enzimas hidrolíticas extracelulares. Sólo se ha reportado y caracterizado la presencia de PPasa-SE<sup>106</sup>. Glanser y Ban<sup>113</sup> reportan la capacidad de degradar lignina de maíz y Pou y col<sup>114</sup> reporta el crecimiento de *G. klebahnii* sobre lignina extraída de caña de azúcar sin embargo, en medio líquido, sólo se detecta la expresión de una proteína (PPasa-SE).

A pesar de generar una enzima liberadora de pectina, no puede crecer sobre pectina, pectatos u oligogalacturonatos. Esta característica es muy común en levaduras<sup>67, 115, 116, 117</sup> y puede justificarse de la siguiente forma.

Las levaduras secretan en general una o a lo sumo dos enzimas pectolíticas y éstas suelen ser endopoligalacturonasas<sup>118, 115, 117</sup>, las que no degradan, en general, a las pectinas y pectatos hasta un grado tal que sea asimilable por el microorganismo como FCE. Es de particular importancia la falta de pectinesterasa ya que las pectinas son en general sustratos muy pobres para las endopoligalacturonasas debido a su alto grado de esterificación<sup>67</sup>. En caso de que produzcan exopoligalacturonasa como el *Geotrichum lactis*<sup>119</sup> el microorganismo puede crecer sobre pectina o PGA y se obtienen niveles de biomasa final similares a los obtenidos con GALA. Esto se deba a que las exo PGAs durante la degradación de la cadena de PGA produce monómeros de GALA, los que pueden ser metabolizados por el microorganismo.

A diferencia de este comportamiento, los hongos suelen tener pools bastante ricos, los cuales incluyen endo y exopoligalacturonasas, pectín y pectato liasas y pectinesterasas<sup>120, 121, 122, 123, 124, 125, 126</sup>. Esta colección de enzimas les permite crecer sobre materiales pécticos más frecuentemente que a las levaduras<sup>127, 60, 122, 124, 126</sup>.

Este comportamiento indicaría que *G. klebahnii* no utiliza a la enzima para poder consumir pectinas de los frutos sino como una forma de invadir el tejido vegetal a fin de acceder a los azúcares solubles que posee.

Esta hipótesis está de acuerdo con Blanco y col<sup>128</sup> los cuales dicen que las levaduras pueden dividirse en dos grandes grupos teniendo en cuenta su capacidad de utilizar o no la pectina y sus derivados como fuente de carbono.

Las levaduras que pertenecen al primer grupo (el cual incluye a *G. klebahnii*) no pueden utilizar estos polímeros como fuente de carbono y además producen mayoritariamente endo-PGasa<sup>67, 115, 116</sup>. En este caso, se le atribuye a la enzima un rol ecológico más que trófico. Hasta donde se conoce, estas enzimas están involucradas en la colonización de frutas causando la ruptura tisular con la concomitante liberación de azúcares de la célula vegetal las que pueden ser aprovechadas para el crecimiento de la levadura.

El otro grupo comprende a las levaduras que, al igual que los hongos filamentosos, poseen la habilidad de crecer utilizando sustancias pécticas como única fuente de carbono.

Esta habilidad sugiere que estos microorganismos poseen un pool enzimático más complejo. A este grupo pertenecen, entre otras, *Candida albida*<sup>129</sup> y *Candida boidinii*<sup>130</sup>.

## 1.6 Objetivos

Se eligió para el presente trabajo de tesis al sistema enzima/microorganismo formado por PPasa/*G. klebahnii* debido a varias razones referidas tanto al microorganismo como a la enzima:

- a) A pesar de haber sido objeto de estudio por Sakai y *col* desde hace varios años, todas las experiencias fueron realizadas en medios complejos y no existe información alguna del comportamiento cinético y estequiométrico del crecimiento de *G. klebahnii*. El conocimiento sobre este tema cobra gran importancia si se pretende producir la enzima para su posible utilización práctica. Además, hasta el presente no existen estudios acerca de la expresión de PPasa en relación con cambios fisicoquímicos del medio de cultivo (pH, temperatura, naturaleza de la fuente de carbono y energía o de nitrógeno, etc) así como con variaciones en las condiciones de cultivo (cinética, tipo de cultivo, etc).
- b) PPasa posee características que la hacen una buena candidata para su uso en la extracción comercial de pectina. La más importante de ellas es que posee mayor actividad sobre sustratos insolubles que sobre pectinas solubles, lo que permite producir pectinas solubles de peso molecular elevado sin que sea atacada por la enzima.
- c) *G. klebahnii* posee un pool enzimático extracelular muy pobre. PPasa SE es la única enzima que puede verse en un SDS PAGE del sobrenadante de cultivo de *G. klebahnii* (capítulo 5) y no posee isoenzimas cuantitativamente significativas<sup>131</sup>. Estos hechos hacen que sea muy sencillo cuantificar la expresión de la enzima a través de la medida de actividad enzimática.
- d) La enzima es fácil de purificar mediante técnicas de adsorción sobre materiales celulósicos tales como membranas de filtración de acetato de celulosa de 0.45  $\mu$  de poro<sup>132</sup>.
- e) Finalmente es importante recalcar la importancia de la utilización de medios sintéticos para el estudio ya que permiten discernir cuales son las variables de un cultivo que producen cambios en la expresión fenotípica de un microorganismo, en este caso, la producción de PPasa SE. El estudio se realizó a través de dos enfoques:
  1. el efecto de las variaciones en los componentes del medio (mediante el uso de métodos tradicionales de cambios de variables así como de diseños estadísticos) y,
  2. el producido por cambios en el proceso en si mediante la realización de cultivo en batch y en continuo.

El objetivo de la presente tesis es estudiar el crecimiento de *G. klebahnii* así como la expresión de Protopectinasa SE a fin de obtener información acerca de las condiciones óptimas de producción de la enzima.

### 1.7 Plan de trabajo.

El plan de trabajo se dividió de la siguiente forma:

- 1) Puesta a punto de las técnicas utilizadas a fin de tener valores confiables de la actividad enzimática en los ensayos realizados sobre los cultivos de *G. klebahnii* (**capítulos 2 y 3**).
- 2) Estudio del crecimiento de *G. klebahnii* en cultivos batch y continuo. Este estudio se realizó a fin de poseer un conocimiento profundo del sistema biológico sobre el cual estudiar la expresión de la enzima (**capítulo 4**).
- 3) Expresión de PGasa de *G. klebahnii* en cultivos batch, tanto en medios complejos como definidos (**capítulo 5**).
- 4) Relación entre la expresión de la enzima y la composición del pool de microelementos (**capítulo 5**).
- 5) Expresión de PGasa de *G. klebahnii* en cultivo continuo (**capítulo 6**)
- 6) Estudio de la morfología de *G. klebahnii* en cultivos continuos bajo diferentes limitaciones y su relación con la expresión de PPasa (**capítulo 6**).

Parte de los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis fueron reportados en las siguientes publicaciones.

“Quantification of pectin-releasing activity of protopectinase-SE from *Geotrichum klebahnii*”. S.F. Cavalitto, R.A. Hours and C.F. Mignone. *Biotech. Techniques*. 11, 5, 331-334 (1997).

"Quantification of protopectinase-SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*". S.F. Cavalitto, R.A. Hours and CF Mignone. *Biotech. Tech.* 13, 6, 385-390 (1999).

“Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media”. Cavalitto, S.F.; Hours, R.A. and Mignone, C.F. *J. Indust. Microb. Biotechnol.* 25, 5, 260-266 (2000).

“Influence of trace elements on enzyme production: protopectinase expression by a *Geotrichum klebahnii* strain” Ferreyra, O., Cavalitto, S.F., Hours, R.A., Ertola, R.J. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 4, 498-504 (2002).

## 1.8 Referencia bibliográfica

1. Aspinall, G. O. 1980. Chemistry of cell wall polysaccharides, The Biochemistry of plants. Academic Press, New York.
2. McNeil, M., A. G. Darvill, S. C. Fry, and P. Albersheim. 1984. Structure and function of the primary cell wall of plants. *Ann. Rev. Biochem* 53:625.
3. Darvill, A. G., M. McNeil, P. Albersheim, and D. P. Delmer. 1980. The primary cell walls of flowering plants, the biochemistry of plants. Academic press, New York.
4. Dey, P. M. and K. Brinson. 1984. Plant cell wall. *Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.* 42:265.
5. Selvendran, R. R. 1985. Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. *J. Cell. Scy.* 2:1985.
6. Wilkie, K. and S. Woo. 1977. A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. *Carbohydrate Research* 57:145-162.
7. Timell, T. E. 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sc. Technol.* 1:45-70.
8. Voragen, A. G., Pilnik W., J. F. Thibault, M. A. Axelos, and C. Renard. 1995. Pectins, p. 287-339. In A. M. Stephen (ed.), *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, New York.
9. de Vries, J. A., F. M. Rombouts, A. G. Voragen, and Pilnik W. 1982. Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydrate Polymers* 2:25-33.
10. Siddiqui, I. R. and P. J. Wood. 1976. Structural investigations of oxalate soluble rapeseed (*Brassica campestris*) polysaccharides. Part IV: pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 50:97.
11. Ishii, S. 1981. Isolation and characterization of cell wall pectic substances from potato tuber. *Phytochem* 20:2329.
12. Ishii, S. 1982. Enzymatic extraction and linkage analysis of pectic polysaccharides from onion. *Phytochem* 21:778.
13. Voragen, A. G., H. A. Schols, and Pilnik W. 1986. Structural feature of the hemicellulose polymers of apple. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 183:105.
14. Eda, S. and K. Kato. 1980. Pectin isolated from the midrib of leaves of *Nicotiana tabacum*. *Agric. Biol. Chem.* 44:2793.
15. Darvill, A. G., M. McNeil, and P. Albersheim. 1978. Structure of plant cell walls VIII: a new pectic polysaccharide. *Plant Physiol.* 62:418.
16. Renard, C., A. G. Voragen, J. F. Thibault, and Pilnik W. 1991. Studies in apple protopectin. V: structural studies on enzymically extracted pectin. *Carbohydrate Polymers* 16:137.
17. Sun, H. H., J. B. Wooten, W. S. J. Ryan, G. H. Bokelman, and P. Aman. 1987. Structural characterization of a tobacco rhamnogalacturonan. *Carbohydrate Polymers* 7:143.
18. Stevens, B. J. H. and R. R. Selvendran. 1984. Structural features of cell wall polysaccharides of the carrot. *Carbohydrate Research* 128:321.

19. Massiot, P., X. Rouau, and J. F. Thibault. 1988. Structural studies of cell wall of carrot (*Daucus carota* L.) 2: characterization of extractable pectin and hemicelluloses. *Carbohydrate Research* 172:229.
20. Saulnier, L., J. M. Brillouet, and J. P. Joseleau. 1988. Structural studies of pectic substances from the pulp of grapes berries. *Carbohydrate Research* 182:63.
21. Guillon, F. and J. F. Thibault. 1989. Structural investigation of the neutral side-chains of sugar-beet pectins. Part 1- methylation analysis and mild acid acid of hairy fragments from sugar-beet pectins. *Carbohydrate Research* 170:85.
22. Seymour, G. B., I. J. Colquhoun, M. S. DuPont, K. R. Parsley, and R. R. Selvendran. 1990. Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. *Phytochem* 29:725.
23. Redgwell, R. J., L. D. Melton, and D. J. Brasch. 1988. Cell wall polysaccharides of kiwi fruit (*actinia deliciosa*) chemical structure in different zones of the fruit at harvest. *Carbohydrate Research* 182:241.
24. Ralet, M. C., G. Della Valle, and J. F. Thibault. 1993. Raw and extruded fibre from pea hulls. Part II: structural studies of the water soluble polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 20:25.
25. de Vries, J. A., C. H. den Uijl, A. G. Voragen, F. M. Rombouts, and Pilnik W. 1983. Structural features of the neutral side-chains of apple pectin substances. *Carbohydrate Polymers* 3:193.
26. Voragen, A. G., F. M. Rombouts, M. F. Searle-van Leeuwen, H. A. Schols, and Pilnik W. 1987. The degradation of arabinan by endo-arabinase arabinofuranosidases purified from *Aspergillus niger*. *Food Hydrocolloids* 1:423.
27. Schols, H. A., M. A. Posthumus, and A. G. Voragen. 1990. Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process. *Carbohydrate Research* 206:117.
28. Hirst, E. L. and J. K. Jones. 1948. Pectic substances, Part VIII: The araban components of sugar beet pectin. *J. Chem. Soc. C*:2311.
29. Rombouts, F. M. and J. F. Thibault. 1986. Sugar-beet pectins: chemical structure and gelation through oxidative coupling, p. 49. In M. L. Fishman and J. J. Jen (eds.), *Chemistry and function of pectins*. ACS Symposium Series 310. Washington DC.
30. Guillon, F., J. F. Thibault, F. M. Rombouts, A. G. Voragen, and Pilnik W. 1989. Structural investigation of the neutral side-chains of sugar-beet pectins. Part 2- Enzymic hydrolysis of the hairy fragments from sugar-beet pectins. *Carbohydrate Research* 190:97.
31. Jones, J. K. and Y. Tanaka. 1965. Araban. Isolation from sugar beet. *Methods Carbohydr. Chem.* 5:74.
32. Siddiqui, I. R. and P. J. Wood. 1977. Carbohydrate of rapeseed: a review. *J. Sci. Food Agric.* 28:530.
33. Siliha, H. A. I. Studies on cloud stability of apricot nectar. 1985. Agricultural University, Wageningen, The Netherland. Ref Type: Thesis/Dissertation
34. Stevens, B. J. H. and R. R. Selvendran. 1984. Pectic polysaccharides of cabbage (*Brassica oleracea*). *Phytochem* 23:107.
35. Redgwell, R. J. and R. R. Selvendran. 1986. Structural features of cell wall polysaccharides

- of onion (*Allium cepa*). *Carbohydrate Research* 157:183.
36. Bobsky, M. E. and U. Schobinger. 1986. An arabinan in pear juice concentrate. *Alimenta* 5:125.
  37. Labavich, J. M., L. E. Freeman, and P. Albersheim. 1976. Structure of plant cell walls: purification of a  $\beta$ -1,4-galactanase which degrades a structural component of the primary cell walls of dicots. *J. Biol. Chem.* 251:5904.
  38. Jarvis, M. C., M. Hall, D. R. Threlfall, and J. Friend. 1981. The polysaccharide structure of potato cell walls: chemical fractionation. *Planta* 152:93.
  39. Jarvis, M. C., D. R. Threlfall, and J. Friend. 1981. Potato cell walls polysaccharides: degradation with enzymes from *Phytophthora infestans*. *J. Exp. Bot.* 32:1309.
  40. Aspinall, G. O., K. Hunt, and I. M. Morrison. 1967. Polysaccharides of soy-beans. Part V: Acidic polysaccharides from the hulls. *J. Chem. Soc. C*:1080.
  41. Carré, B., J. M. Brillouet, and J. F. Thibault. 1985. Characterization of polysaccharides from white lupin (*Lupinus albus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 33:285.
  42. Voragen, A. G., H. A. Schols, H. A. I. Siliha, and Pilnik W. 1986. Enzymic lysis of pectic substances in cell walls: some implications for fruits juice technology In M. L. Fishman and J. J. Jen (eds.), *Chemistry and function of pectins*. ACS Symposium Series 310. Washington DC.
  43. Clarke, A. E., R. L. Anderson, and B. A. Stone. 1979. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochem* 18:522.
  44. Aspinall, G. O. and H. K. Fanous. 1984. Structural investigations on the non-starchy polysaccharides of apples. *Carbohydrate Polymers* 4:193.
  45. Larm, O., O. Theander, and P. Aman. 1976. Structural studies on water-soluble arabinogalactan isolated from rapeseed (*Brassica napus*). *Acta Chim. Scand.* 30:627.
  46. Aspinall, G. O. and I. W. Cottrell. 1970. Lemon peel pectin. II: Isolation of homogeneous pectins and examination of some associated polysaccharides. *Can. J. Chem.* 48:1238.
  47. Schols, H. A. and A. G. Voragen. 1994. Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradation by rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research* 256:83-95.
  48. Schols, H. A., E. J. Bakx, D. Schipper, and A. G. Voragen. 1995. A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research* 279:265-279.
  49. Yu, L. and A. J. Mort. 1996. Partial characterization of xylogalacturonans from cell walls of ripe watermelon fruit: inhibition of endopolygalacturonase activity by xylosylation, p. 79-88. In J. Visser and A. G. Voragen (eds.), *Pectin And Pectinases*. Elsevier Science, Amsterdam.
  50. Kikuchi, A., Y. Edashige, T. Ishii, and S. Satoh. 1996. A xylogalacturonan whose level is dependent on the size of the cell clusters is present in the pectin from cultured carrot cells. *Planta* 200:369-372.
  51. Northcote, D. H. 1986. Control of pectin synthesis and deposition during plant cell wall growth, p. 134. In M. L. Fishman and J. J. Jen (eds.), *Chemistry and function of pectins*. ACS Symposium Series 310. Washington DC.
  52. Selvendran, R. R. and M. A. O'Neal. 1987. Isolation and analysis of cell walls from plant

- materials. *Methods Biochem.* 32:153.
53. Ishii, S. 1976. Enzymatic maceration of plant tissues by endo-pectin lyase and endopolygalacturonase from *Aspergillus japonicum*. *Phytopathology* 66:281.
  54. Keijbets, M. J. H., Pilnik W., and J. F. A. Vaal. 1976. Model studies on behaviour of pectic substances in the potato cell during boiling. *Potato Res.* 19:289.
  55. Fry, S. C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:165-186.
  56. Ishii, T. 1991. Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls. *Carbohydrate Research* 219:15-22.
  57. Oosterveldt, A., J. H. Grabber, G. Beldman, J. Ralph, and A. G. Voragen. 1997. Formation of ferulic acid dehydrodimers through oxidative cross-linking of sugar beet pectin. *Carbohydrate Research* 300:179-189.
  58. Bach Tuyet Lam, T., K. Iiyama, and B. A. Stone. 1992. Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and phalaris internodes. *Phytochem.* 31:1179-1183.
  59. Imamura, T., M. Watanabe, M. Kuwahara, and T. Koshijima. 1994. Ester linkages between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes from *Fagus crenata*. *Phytochem* 37:1165-1173.
  60. Takahashi, n. and T. Koshijima. 1988. Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Sc. Technol.* 22:231-241.
  61. Pilnik W. and A. G. Voragen. 1991. The significance of endogenous and exogenous pectic enzymes in fruit and vegetable processing, p. 303-336. In P. F. Fox (ed.), *Food enzymology*. Elsevier Applied Science, New York.
  62. Fogarty, W. and C. T. Kelly. 1983. Pectic enzymes, p. 131-182. In W. Fogarty (ed.), *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science, New York.
  63. English, P. D., A. Maglotin, K. Keegstra, and P. Albersheim. 1972. A cell wall degrading endopolygalacturonase secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Physiol.* 49:293-297.
  64. Albersheim, P. 1976. The primary cell wall, p. 225-274. In J. Bonner and J. E. Varner (eds.), *Plant Biochemistry*. Academic Press.
  65. Phaff, H. J. 1966.  $\alpha$ -1,4-Polygalacturonide glycanohydrolase (endopolygalacturonase) from *Saccaromyces fragilis*. *Methods in enzymology* 8:636-641.
  66. Rexova-Benková, L. and O. Markovic. 1976. Pectic enzymes, p. 323-385. In R. S. Tipson and D. Horton (eds.), *Adv. Carbohyd. Chem. and Biochem.*
  67. Luh, B. S. and H. J. Phaff. 1951. Studies on polygalacturonases of certain yeasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 33:213-227.
  68. Ravelomanana, R., J. P. Guiraud, and P. Galzy. 1986. Isolation of a pectin utilizing yeast from cocoa beans. *Systematic and Applied Microbiology* 8:230-233.
  69. Parenicová, L. Pectinases of *Aspergillus niger*: a molecular and biochemical characterisation. 2000. Wageningen Agricultural University. The Netherlands. Ref Type: Thesis/Dissertation
  70. Riedel, R. M. and W. F. Mai. 1971. Pectinases in aqueous extracts of *Ditylenchus dipsaci*.

- Journal of Nematology 3:28-38.
71. Heinrichova, K. and M. Wojciechowicz. 1989. The pectinolytic enzyme of *Selenomonas rumiantum*. *J. Appl. Bacteriol.* 66:169-174.
  72. Perley, A. F. and O. T. Page. 1971. Differential induction of pectolytic enzymes of *Fusarium roseum* (Lk) emend Snyder and Hansen. *Can. J. Microbiol.* 17:415-420.
  73. Finkelman, M. J. and J. E. Zajic. 1978. Pectinase from *Aureobasidium pullulans*. *Developments in Industrial Microbiology* 19:459-464.
  74. Rombouts, F. M. and Pilnik W. 1980. Pectic enzymes In A. H. Rose (ed.), *Microbial enzymes and Bioconversions*, *Economis Microbiology*. Academic Press, London.
  75. Hasegawa, S. and C. W. Nagel. 1968. Isolation of an oligogalacturonate hydrolase from a *Bacillus* species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 124:513-520.
  76. Hatanaka, C. and J. Ozawa. 1969. Isolation of a new exopolygalacturonase producing digalacturonic acid from pectic acid. *Agric. Biol. Chem.* 33:116-118.
  77. Linhardt, R. J., P. M. Gallicher, and C. L. Cooney. 1986. Polysaccharides lyases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 12:135-175.
  78. Sone, H., J. Sugiura, Y. Itoh, K. Izaki, and H. Takahashi. 1988. Production and properties of pectin lyase in *Pseudomonas marginalis* induced by mitomycin C. *Agric. Biol. Chem.* 52:3205-3207.
  79. Pickersgill, R., J. Jenkins, G. Harris, W. Nasser, and J. Robert-Baudouy. 1994. The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. *Nature Structural Biology* 1:717-723.
  80. Mayans, O., M. Scott, I. Connerton, T. Gravesen, J. Benen, J. Visser, R. Pickersgill, and J. Jenkins. 1997. Two crystal structures of pectin lyase a from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in substrate binding cleft of pectin and pectate lyase. *Structure* 5:677-689.
  81. Lyon, G. D., K. J. Smith, and J. Heilbronn. 1986. The calcium requirement of polygalacturonic acid lyases produced by *Erwinia* spp. *Letters in Applied Microbiology*. 2:127-129.
  82. Moran, F., S. Nasuno, and M. P. Starr. 1968. Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans eliminases of *Erwinia carotovora*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 123:298-306.
  83. Shevchik, V. E. and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat. 1997. Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular microbiology* 24:1285-1301.
  84. Moran, F., S. Nasuno, and M. P. Starr. 1968. Oligogalacturonide trans eliminase of *Erwinia carotovora*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
  85. Dean, R. A. and W. E. Timberlake. 1989. Production of cell wall degrading enzymes by *Aspergillus nidulan*, a model system for fungal pathogenesis of plants. *Plant cell* 1:265-273.
  86. Gysler, C., J. A. Harmsen, H. Kester, J. Visser, and J. Heim. 1990. Isolation and structure of the pectin lyase D-encoding gene from *Aspergillus niger*. *Gene* 89:101-108.
  87. Polizeli, M. D. L., J. A. Jorge, and H. F. Terenzi. 1991. Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *Journal of General Microbiology* 137:1815-1823.

88. González-Candelas, L. and P. E. Kolattukudy. 1992. Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase gene from the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating population VI). *Journal of Bacteriology* 174:6343-6349.
89. Bowen, J. K., M. D. Templeton, K. R. Sharrock, and R. N. Crowhurst. 1995. Gene inactivation in the plant pathogen *Glomerella cingulata*: three strategies for the disruption of the pectin lyase gene *pnlA*. *Molecular and General Genetics* 246:196-205.
90. Ho, M. C., M. P. Whitehead, T. E. Cleveland, and R. A. Dean. 1995. Sequence analysis of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase *pelA* gene and evidence for binding of promoter regions to CREA, a regulator of carbon catabolite repression. *Curr. Genet.* 27:142-149.
91. Kopečný, J. and B. Hodrova. 1995. Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. *Letters in Applied Microbiology*.
92. Sakai, T., T. Sakamoto, J. Hallaert, and E. J. Vandamme. 1993. Pectin, pectinase, protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology* 39:213-294.
93. Iguchi, K., H. Hirano, M. Kishida, H. Kawasaki, and T. Sakai. 1997. Cloning of a Protopectinase gene of *Trichosporon penicillatum* and its expression in *Sacharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143:1657-1664.
94. Schols, H. A. Structural characterization of pectic hairy regions isolated from apple cell walls. 1-155. 1995. Wageningen Agricultural University. The Netherlands. Ref Type: Thesis/Dissertation
95. Voragen, A. G., G. Beldman, and H. A. Schols. 2001. Chemistry and enzymology of pectins, p. 379-398. In B. V. McCleary and L. Prosky (eds.), *Advanced Dietary Fibre Technology*. Blackwell Science.
96. Beldman, G., M. Mutter, M. F. Searle-van Leeuwen, L. A. M. van der Broek, H. A. Schols, and A. G. Voragen. 1996. New enzymes active towards pectic structures, p. 231-245. In J. Visser and A. G. Voragen (eds.), *Progress in Biotechnology 14: Pectins and Pectinases*. Elsevier, Amsterdam.
97. Mutter, M. New rhamnogalacturonan degrading enzymes from *Aspergillus aculeatus*. 1997. Wageningen University. The Netherlands. Ref Type: Thesis/Dissertation
98. de Vries, R. P. Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. 1999. Wageningen Agricultural University. The Netherlands. Ref Type: Thesis/Dissertation
99. Shivakumar, P. D., A. Nand, and P. Krishna. 1995. Anaerobic degradation of pectin by mixed consortia and optimization of fermentation parameters for higher pectinase activity. *Letters in Applied Microbiology*. 20:117-119.
100. Hoondal, G. S., R. P. Tiwari, R. Tewari, N. Dahiya, and Q. K. Beg. 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:409-418.
101. Pilnik W. and F. M. Rombouts. 1979. Utilization of pectic enzymes in food production, p. 269-277. In H. Chiba, M. Fujimaki, K. Iwai, H. Mitsuda, and Y. Morita (eds.), *Food Science and Technology*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
102. Pilnik W. and F. M. Rombouts. 1981. Pectic Enzymes, p. 105-128. In G. G. Birch, N. Blakebrough, and K. J. Parker (eds.), *Enzymes and Food Processing*. Applied Science Publishers LTD, London.

103. Nakamura, T., R. A. Hours, and T. Sakai. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science* 60:468-472.
104. Sakai, T. and M. Okushima. 1980. Microbial production of pectin from citrus peel. *Applied and Environmental Microbiology* 39:908-912.
105. Sakai, T. and M. Okushima. 1978. Protopectin solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.* 42:2427-2429.
106. Sakai, T. and M. Okushima. 1982. Purification and crystallization of protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agriculture, Biology and Chemistry* 46:667-676.
107. Sakai, T., M. Okushima, and M. Sawada. 1978. Some properties of endo-polygalacturonase from *Trichosporon penicillatum* SNO-3. *Agric. Biol. Chem.* 46:2223-2231.
108. de Hoog, G. S., M. T. Smith, and E. Guého. 1986. A revision of the genus *Geotrichum* and its teleomorphs. *Academy of Sciences and Letters, Baarn*.
109. Von Arx, J. A. 1977. Notes on *Dipodascus*, *Endomyces* and *Geotrichum* with the description of two new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 43:333-340.
110. Sutton, D. A., A. W. Fothergill, and M. Rinaldi. 1988. *Guide to Clinically Significant Fungi*. Baltimore.
111. Larone, D.H. 1995. *Medically Important Fungi - A guide to Identification*. Washington D.C.
112. King, D. S. and S. C. Jong. 1976. Induction of arthroconidia in *Trichosporon*. *Mycopathologia* 59:61-63.
113. Glanser, M. and S. N. Ban. 1983. Degradation of lignin of corn stover by means of yeast: *Trichosporon*. *Process Biotechnology* 19:105-110.
114. Pou, J., M. J. Fernandez, and J. Garrido. 1985. Obtención de proteínas de bagacillo de caña. II Estudio de la multiplicación de *Trichosporon penicillatum* en cultivo semi-sólido en bandejas. *Microbiol. Españ.* 38:89-95.
115. Schwam, R. F. and A. H. Rose. 1994. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *J. Appl. Bacteriol.* 76:62-67.
116. Blanco, P., C. Sierio, A. Días, and T. G. Villa. 1997. Differences between pectic enzymes produced by laboratory and wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13:711-712.
117. Donaghy, J. J. and A. M. McKay. 1994. Pectin extraction from citrus peel by polygalacturonase produced on whey. *Biorresource Technology* 47:25-28.
118. Blanco, P., C. Sierio, A. Diaz, and T. G. Villa. 1994. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* 40:974-977.
119. Pardo, C., M. A. Lapeña, and M. Gacto. 1991. Purification and characterization of an extracellular exopolygalacturonase from *Geotrichum lactis*. *Can. J. Microbiol.* 37:974-977.
120. Cavalitto, S. F., R. A. Hours, and J. A. Arcas. 1996. Pectinase production profile of *Aspergillus foetidus* in solid state cultures at different acidities. *Biotech. Lett.* 18:251-256.
121. Aguilar, G., B. A. Trejo, J. M. García, and C. Huitrón. 1991. Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Can. J. Microbiol.* 37:912-917.
122. Solis-Pereira, S., E. Favela-Torres, G. Viniestra-González, and M. Gutierrez-Rojas. 1993.

- Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:36-41.
123. Taragano, V. M. and A. Pilosof. 1999. Application of Doehlert designs for water activity pH and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 25:411-419.
  124. Mikhailova, R. V., L. I. Sapunova, and A. G. Lobanok. 1994. Biosynthesis of pectinlyases in *Penicillium adametzii*, *P. citrinum* and *P. janthinellum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 10:457-461.
  125. Urbanek, H. and J. Zalewska-Sobczar. 1974. Polygalacturonase of *Botrytis cinerea* e-200 pers. *Biochimica et Biophysica Acta* 377:402-409.
  126. Rexova-Benková, L. and V. Tibensky. 1972. Selective Purification os *Aspergillus niger* endopolygalacturonase by affinity chromatography on cross-linked pectic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* 268:187-193.
  127. Aguilar, G. and C. Huitrón. 1990. Constitutive exo - pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on diferent carbon source. *Biotech. Lett.* 12:655-660.
  128. Blanco, P., C. Sierio, and T. G. Villa. 1999. Production of pectic enzymes in yeast. *FEMS Microbiology Letters* 175:1-9.
  129. Federici, F. 1985. Production, purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var *albidus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 51:139-150.
  130. Stratilová, E., E. Breierová, R. Vadkertiová, E. Machová, A. Malavikova, and E. Slaviková. 1998. The adaptability of the methylotrophic yeast *Candida boidinii* on media containing pectic substances. *Can. J. Microbiol.* 44:116-120.
  131. Iguchi, K., M. Kishida, and T. Sakai. 1996. Purification and characterization of three extracellular protopectinases whth polygalacturonase activities from *Trichosporon penicillatum*. *Biosc. Biotech. Biochem* 60:603-607.
  132. Contreras Esquivel, J. C. Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. 127-151. 2003. Tesis doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermantraciones Industriales, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

## CAPITULO 2

### Técnica de medida de actividad protopectinasa (PPasa)

En este capítulo se describe el trabajo realizado a fin de obtener información acerca de la acción de la enzima sobre la protopectina de limón, su sustrato natural.

#### 2.1 Introducción

La hidrólisis enzimática de protopectina pertenece al grupo de las reacciones heterogéneas y como tal presenta una serie de particularidades que no tienen las reacciones homogéneas (enzima soluble sobre un sustrato soluble) <sup>1</sup>. En particular tiene mucha importancia el efecto de la adsorción de la enzima sobre el sustrato. El mismo efecto es de crucial importancia en la degradación de celulosa por celulasas bacteriana y fúngicas <sup>2, 3, 4</sup>.

La técnica reportada para la medida de actividad PPasa <sup>5</sup>, no especifica ningún tipo de preparación para el sustrato. Simplemente se indica que se utilizan 10 mg de protopectina de limón, 2 mL de buffer y la enzima diluida convenientemente. Los datos obtenidos siguiendo este protocolo poseen un grado de dispersión tal que la convierte en completamente inútil a los fines prácticos. Por esa razón se decidió antes de usar la técnica como herramienta de medida, realizar un estudio a fin de averiguar que condiciones, tanto del sustrato como de la técnica, debían mejorarse para que resultara útil para medir la actividad enzimática de los cultivos.

#### 2.2 Materiales y métodos

##### 2.2.1 Preparación del sustrato.

El sustrato se preparó de la siguiente manera. Se peló una serie de limones, cuidando de separar el tejido glandular del albedo. Este último fue picado con una procesadora de alimentos de tipo doméstica, se le adicionó etanol al 96 % (p/p) a razón de un ml de etanol por gramo de albedo húmedo y se puso en heladera por 24 Hs para provocar la inhibición de la pectín-esterasa endógena del tejido vegetal.

El albedo fue luego tamizado en suspensión por tamices de mesh 10, 16 y 20. Las partículas que pasaron mesh 20, se descartaron porque, luego de secado, se convierten en una especie de harina (mesh mayor de 120). Las partículas retenidas por mesh 10 y 16, se volvieron a procesar a fin de disminuir su tamaño y se tamizaron nuevamente. Este procedimiento se repitió varias veces con el objeto de aumentar el rendimiento de partículas que pasaron mesh 16 y quedaron retenidas en el 20.

Las partículas así obtenidas, se lavaron cuidadosamente con abundante agua a temperatura ambiente hasta obtener reacción negativa al meta-hidroxidifenilo en las aguas de lavado lo que indica una cantidad insignificante de grupos urónicos liberados en forma espontánea.

Una vez libre de grupos urónicos solubles, el tejido se escurrió por suave compresión en una tela de trama fina y al producto obtenido, todavía húmedo, se le adicionó acetona y se secó en estufa a 30 °C. Una vez seco, se tamizó para obtener la

serie de tamaños deseados, partículas retenidas por los tamices 35, 40, 50, 60, 80, 100 y 120. El sustrato se conserva a temperatura ambiente en frasco bien cerrado.

### 2.2.2 Reactivos químicos:

El ácido D-galacturónico monohidrato (a partir de ahora, GALA) y el ácido poligalacturónico (PGA) de naranja fueron de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

### 2.2.3 Buffer AcB:

En todas las medidas de actividad enzimática se utilizó buffer acético acetato de sodio (AcB) 20 mM, pH 5 preparado llevando una solución 20 mM de ácido acético a pH 5 con hidróxido de sodio.

### 2.2.4 Fuente de enzima:

Se utilizó un preparado comercial de enzima (Pectinase SE de Shikibo Ltd. Japan). Se preparó una solución stock en AcB 20 mM, pH 5,0 conteniendo  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  del preparado antes mencionado y esta solución fue utilizada para la optimización de la técnica y para la caracterización parcial del comportamiento cinético de la enzima.

También se utilizó el sobrenadante de un cultivo de *Geotrichum klebahnii* ATCC 42397 para verificar si la técnica propuesta tiene utilidad en la práctica real.

### 2.2.5 Ensayo enzimático:

La actividad PPasa se determinó midiendo la liberación de grupos urónicos a partir de protopectina de limón por el método de meta-hidroxidifenilo. Todas las determinaciones enzimáticas se hicieron a partir de distintas diluciones de una solución stock  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  de protopectinasa SE. Para todas las medidas se hicieron triplicados (salvo cuando se indique lo contrario). Se coloca el sustrato seco (protopectina : PP) en sendos tubos de ensayo y se adicionan  $950 \mu\text{l}$  de AcB, una vez hidratado el sustrato se colocan los tubos a  $0^\circ \text{C}$  y se pone en cada tubo  $50 \mu\text{l}$  de la muestra de enzima a determinar, convenientemente diluida. Para cada una de las muestras hace falta un blanco de reacción. A tiempo cero, se transfieren los tubos a un baño termostático con agitación orbital. Se incuba la mezcla de reacción a  $37^\circ \text{C}$  y 100 RPM, una vez transcurrido el tiempo de incubación se vuelve al baño agua hielo para detener la reacción.

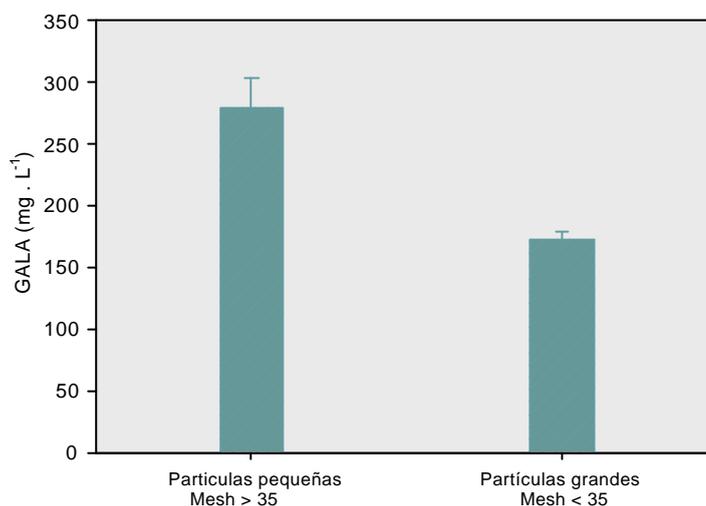
Se separa el sustrato del resto de la mezcla de reacción filtrándola a través de papel Watman N° 1. En la solución filtrada se realiza la determinación de ácidos urónicos utilizando GALA como patrón.

Se toman  $200 \mu\text{l}$  del filtrado (diluido convenientemente si hiciera falta), se adicionan 3 ml de una solución de tetraborato de sodio en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  32N (este paso debe ser llevado a cabo en un baño de agua hielo). La mezcla se lleva a un baño a ebullición durante 10 minutos, se enfría y se agrega a cada muestra  $30 \mu\text{L}$  de una solución de meta-hidroxidifenilo al 0,15% preparada usando como solvente una solución de NaOH 0,5 %, se agita y se dejan los tubos a temperatura ambiente durante 20 a 40 minutos. Se mide absorbancia a 525 nm contra un blanco de reactivos. La cantidad de pectina liberada se expresa como equivalentes de poder reductor de GALA monohidrato utilizando una curva de calibración hasta los  $250 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Se define la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que libera un micromol de poder reductor (como GALA) por minuto en las condiciones de reacción.

### 2.3 Resultados y discusión

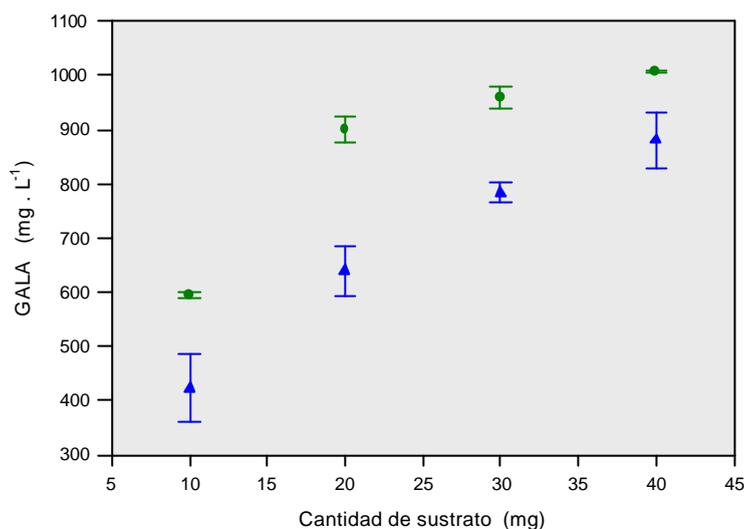
El albedo de limón picado y seco, que es el sustrato natural de la enzima, queda en principio con una dispersión muy importante en el tamaño de las partículas, desde partículas de más de un milímetro de diámetro hasta un polvo casi impalpable. Ante la sospecha de que esta dispersión pudiera ser la causa en la dispersión de la medida de actividad enzimática, se decidió pasar la muestra por un tamiz de Mesh 30 y uno de Mesh 35, luego de lo cual se repitió la reacción enzimática pero utilizando como sustrato en un caso las partículas que pasaron el tamiz de Mesh 30 pero quedaron retenidas en el 35 (grandes) y las que pasaron por ambos tamices (pequeñas) en el otro. Para la determinación enzimática, se colocaron 50  $\mu\text{l}$  de solución stock diluida 1:5 y 60 minutos de incubación a 37°C. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.2.



**Figura 1.2:** GALA liberado por una misma cantidad de enzima pero con diferentes tamaño de partículas de sustrato. En ambos casos el tubo contenía 20 mg de protopectina.

Con este sencillo procedimiento, no sólo disminuyó notoriamente la dispersión de resultados, sino que, agregando en ambos casos 10  $\mu\text{L}$  de la solución stock de enzima, en los tubos en que se habían utilizado las partículas más grandes, se obtuvo un valor menor de actividad. En el caso de las partículas grandes la dispersión es un poco menor que en las pequeñas porque hay en este grupo una menor variación en el tamaño. Este resultado es coherente con el hecho de que las reacciones enzimática de tipo heterogéneo dependen del área de sustrato expuesta a la enzima y no directamente de la cantidad de sustrato utilizado <sup>1</sup>. A igual masa de sustrato, la superficie de contacto sólido solución es mayor cuanto más chicas sean las partículas del mismo.

A fin de confirmar esta relación entre área y actividad, se decidió aumentar el área superficial del sustrato incrementando la cantidad de PP en el tubo de reacción pero manteniendo la división en “pequeñas” y “grandes”. Para reducir un poco el tiempo de medida, se aumentó la cantidad de enzima agregada (40  $\mu$ l de solución stock + 10  $\mu$ l de AcB) y se redujo el tiempo de incubación a 30 minutos. Al hacer esto se ve que la actividad recuperada se hace mayor al incrementar la masa de PP pesada pero la curva muestra un nivel de saturación (Fig. 2.2). Por otro lado, las partículas más pequeñas siguen mostrando una mayor actividad que las más grandes pero al incrementar la masa de sustrato, las diferencias se hacen menores indicando que la enzima podría estar saturándose.



**Figura 2.2:** GALA liberado por una misma cantidad de enzima con diferentes cantidades de PP. Partículas grandes (▲) y pequeñas (●)

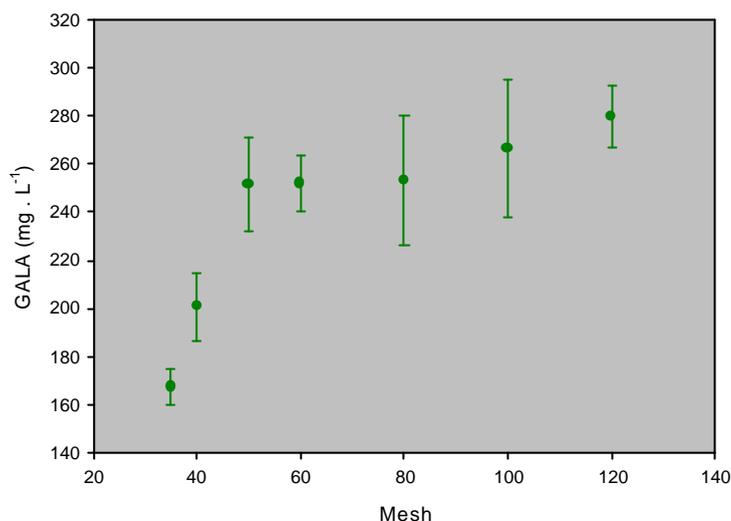
Este comportamiento de la actividad enzimática en función de la cantidad y tamaño del sustrato ha sido reportado también para celulasa actuando sobre paja de trigo <sup>6</sup>. En ese caso, la actividad reportada sobre paja molida y sobre paja molida y tamizada aumenta con el aumento de la cantidad de sustrato presentando en ambos casos una tendencia a saturarse, pero para todos los valores de sustrato medidos, la actividad obtenida con el sustrato tamizado es mayor que en el caso del sustrato molido.

El inconveniente con esta forma de incrementar el área en nuestra experiencia es que la mayor masa de sustrato absorbe cada vez más buffer para hidratarse y en las muestras con mayor masa es prácticamente imposible recuperar los 250  $\mu$ l de muestra para realizar la colorimetría. Aparte de ello, la disminución del volumen de la fase líquida debido al hinchamiento de las partículas de sustrato hace que las soluciones se concentren con respecto al buffer original pudiendo esto modificar las actividades enzimáticas medidas.

Para evitar este problema, se decidió seguir otro camino para aumentar el área de contacto. Aprovechando la relación inversa entre el área total de una determinada muestra particulada y el tamaño de las partículas, lo que se probó fue usar la misma cantidad de sustrato pero de un tamaño cada vez menor.

A fin de conseguir las fracciones necesarias para esta experiencia se pasó una cantidad de sustrato molido y seco por una serie mayor de tamices y se nombró a cada una con el número del tamiz que las hubiera retenido. Las fracciones ensayadas en esta experiencia fueron 20, 35, 50, 60, 80, 100 y 120.

Las condiciones de tiempo y temperatura fueron las mismas que en el ensayo anterior. En cada uno de los tubos se puso 20 mg del sustrato de cada uno de los tamaños obtenidos y 50  $\mu\text{l}$  de solución stock de enzima diluida 1:5. Los resultados obtenidos (Fig. 3.2) demuestran que para esta cantidad de sustrato, para tamaños de partícula menores que las retenidas por tamices de mesh 50, el área se hace saturante y no se encuentran diferencias significativas entre un tamaño y otro.



**Figura 3.2:** GALA liberado por una misma cantidad de enzima con 20 mg de PP pero de diferente tamaño.

Esto confirma el hecho de que lo que importa para la actividad enzimática en reacciones heterogéneas es lo que la enzima “ve” del sustrato y no directamente la cantidad de éste que se encuentre presente en el medio.

Suponiendo que las partículas son esferas cuyo diámetro está dado por el tamaño de la malla del tamiz más pequeño que pueden atravesar, se puede calcular la relación entre el área superficial y el volumen de las mismas <sup>7</sup>.

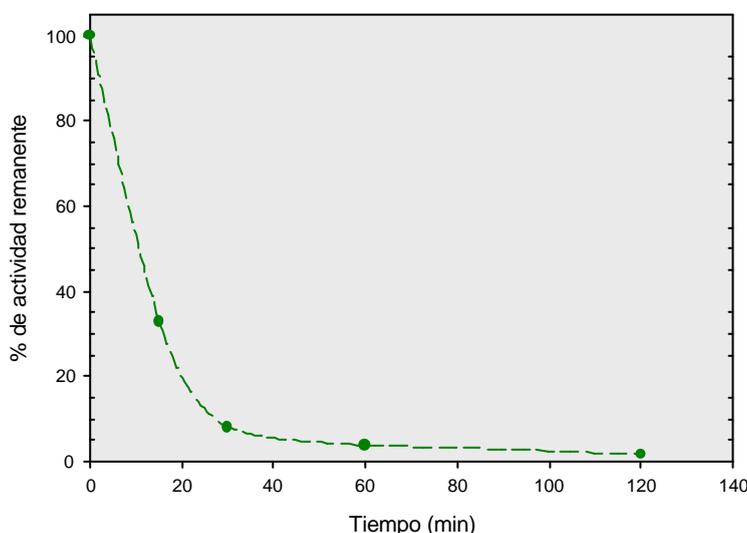
La forma de la curva de actividad enzimática en función del tamaño de partícula, con una parte dependiente y una independiente del mismo concuerda con la suposición de que la velocidad de la reacción es proporcional a la cantidad de enzima adsorbida sobre la superficie de las partículas y que el fenómeno de adsorción obedece a al modelo de una isoterma de Langmuir <sup>1</sup>. Este hecho sugiere que, en este caso, sólo la superficie más externa de la partícula está disponible para la enzima, la que no puede acceder a los poros del tejido vegetal ya que si así fuera no habría una relación tan directa entre el tamaño de las partículas y la actividad enzimática. Burns y col. <sup>8</sup> han reportado que la acción de celulasas de *Trichoderma reesei* sobre pulpa de madera también ocurre sobre la superficie más externa del sustrato ya que la enzima no puede acceder a los poros del mismo.

La capacidad de las pectinasas de distintos orígenes de adsorberse a polímeros ha sido ampliamente reportada en literatura <sup>9,10,11</sup>. Gupta y col. han postulado un método

de purificación basado en la propiedad de la PGasa de adsorberse a alginato de calcio. Utilizando este método, se consigue aumentar la actividad específica de la enzima hasta 10 veces con un rendimiento mayor del 80%.

El mismo comportamiento ha sido reportado para celulasas tanto sobre celulosa purificada <sup>12</sup> como sobre paja de trigo <sup>6</sup>. Dijkerman y col. <sup>13</sup> han reportado que la velocidad inicial en la hidrólisis de celulosa microcristalina por una celulasa fúngica es directamente proporcional a la cantidad de enzima adsorbida inicialmente al sustrato, más aún, Hogan y col <sup>14</sup> han reportado que la velocidad depende solamente de la cantidad de enzima inicialmente adsorbida al sustrato y que el resto de la enzima sólo participa en una forma minoritaria en el proceso.

A fin de confirmar que la enzima de *G. klebahnii* sigue este comportamiento se realizó la siguiente experiencia. A 200 mg de protopectina seca de la fracción que paso un tamiz 50 y quedó retenida en un tamiz 60 se le agregaron 9,5 mL de AcB 20 mM pH 5. Se dejó esta mezcla en un baño de agua y hielo por 30 minutos a fin de que la protopectina se hidrate y luego se le adicionaron 500 µL de solución stock de enzima (de esta forma se mantiene la relación enzima/buffer/sustrato del protocolo de medida de actividad enzimática). Al mismo tiempo se realiza un testigo en el que se agregan 500 µL de solución stock a 9,5 mL del mismo buffer. Este testigo tiene la finalidad de medir la caída de la actividad de la enzima en función del tiempo. Cada muestra y testigo se realizaron por duplicado. Se tomó una alícuota de cada muestra y testigo a los 15, 30, 60 y 120 minutos y a cada una de ellas se le midió actividad PGasa. La figura 4.2 muestra la caída de la actividad relativa (actividad de cada muestra dividida la actividad del testigo correspondiente a ese tiempo) en función del tiempo de incubación.



**Figura 4.2.:** Actividad remanente en el sobrenadante de la incubación a 0°C de PPasa-SE con protopectina de limón

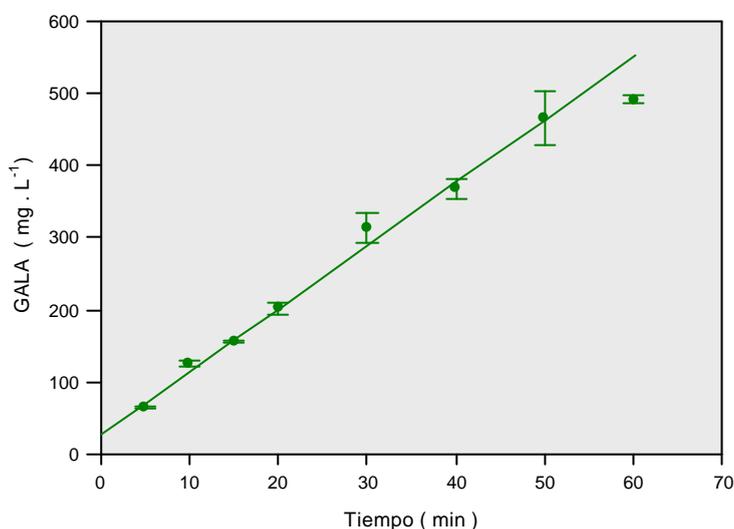
Puede verse que, aun en frío, la adsorción es muy notoria a tiempos cortos, quedando retenida casi el 95 % en 30 minutos.

Teniendo en cuenta estas propiedades de la enzima sobre sustrato sólido, se procedió a optimizar una técnica de medida de la actividad enzimática que fuera suficientemente confiable como para ser utilizada de rutina. Para el desarrollo de dicha técnica se tuvieron en cuenta los siguientes hechos:

- La enzima se adsorbe sobre el sustrato antes de actuar sobre él.
- El área expuesta del sustrato, y no su masa, es la variable más importante en el valor de la actividad enzimática.
- Utilizando 20 mg de protopectina por tubo el área se hace saturante cuando el tamaño de las partículas es tal que pasan el tamiz 50.

La fracción de sustrato que pasó tamiz 50 y quedó retenida en tamiz 60 fue la más abundante así esta fue elegida para los estudios siguientes.

La primera variable analizada una vez fija la cantidad de sustrato en el tubo de reacción, fue el tiempo de incubación en el que se puede trabajar sin inconveniente. Para la determinación enzimática se adicionó en todos los tubos 50  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:5 de la solución stock. En estas condiciones, la actividad enzimática se mantuvo proporcional al tiempo hasta los 50 minutos de reacción (Fig. 5.2).



**Figura 5.2:** GALA liberado en función del tiempo por una misma cantidad de enzima utilizando 20 mg de PP retenida por un tamiz de 60 mesh.

Por una cuestión de comodidad, se eligió un tiempo de 30 minutos como estándar, pero puede ser alargado sin inconvenientes si la cantidad de enzima es menor que la utilizada en estos ensayos.

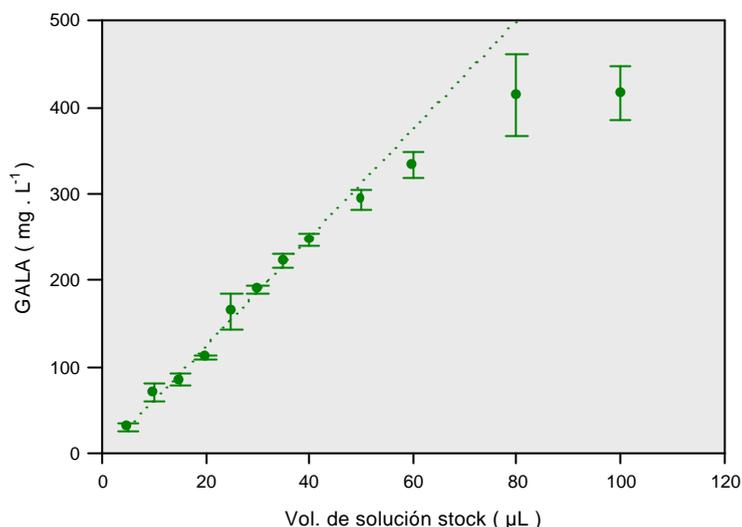
Con las condiciones de tiempo, temperatura y cantidad de sustrato fijas, se comenzó a probar que cantidad de enzima puede adicionarse al tubo de reacción. Para ello, se adicionaron diferentes volúmenes de la solución stock en tubos con la cantidad de AcB suficiente como para completar el volumen final de 1 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.2.

Puede verse que la relación enzima agregada / GALA liberado se mantiene lineal hasta aproximadamente  $5 \times 10^{-2}$  unidades en el tubo de reacción (50  $\mu\text{L}$  de solución stock).

Finalmente, la técnica quedó estandarizada con los siguientes parámetros:

- 20 mg de protopectina retenida en tamiz de mesh 60.
- 950  $\mu\text{L}$  de buffer HAc/NaAc 20 mM pH 5

- 50  $\mu\text{L}$  de solución de enzima convenientemente diluida de modo que no queden más de  $5 \times 10^{-2}$  unidades totales en el tubo de reacción
- 30 minutos de incubación
- Temperatura 37  $^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 6.2:** GALA liberado por cantidades crecientes de enzima utilizando 20 mg de PP retenido por un tamiz de 60 mesh.

Finalmente se probó si la técnica daba resultados reproducibles al medir la actividad de una muestra real. Para ello se tomaron diferentes diluciones (1/1, 1/1.5, 1/2 y 1/3 de un sobrenadante de un cultivo de *Geotrichum klebahnii* ATCC 42397 y se le midieron sus actividades con la técnica en cuestión. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla I.2. Como puede observarse, no se obtienen grandes diferencias a lo largo de todo el rango de diluciones.

Dilución del sobrenadante	Actividad medida ( $\text{U} \cdot 10^2$ )	Recuperación (%)
1/1	3.66	$100 \pm 1.2$
1/1.5	2.26	$92.6 \pm 4.5$
1/2	1.65	$89.9 \pm 9.6$
1/3	1.17	$96.2 \pm 8.9$

**Tabla I.2:** Actividad PPasa ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), determinadas utilizando el método propuesto, de diferentes diluciones de un sobrenadante de un cultivo de *G. klebahnii* ATCC 42397 realizado en el medio de referencia.

Cuidando mantener todas estas precauciones en la medida, la técnica posee una confiabilidad muy satisfactoria para ser usada en forma rutinaria, sin embargo posee algunas características no deseables. Las más importantes son las siguientes:

- 1.- Es muy engorrosa cuando hay que manejar un gran número de muestras sobre todo por la etapa de filtración de cada muestra y,

2.- Al no existir un sustrato comercial purificado, la actividad medida de una misma muestra varía cuando se la mide utilizando sustrato preparado de diferentes partidas. Esto se debe a que la protopectina puede cambiar su grado de metilación entre partida y partida y esta variable del sustrato es de mayor importancia en la actividad enzimática.

Por esta razón se decidió, siempre que se pudiera, utilizar como técnica de rutina aquella que aprovecha la actividad de PGasa sobre sustrato soluble como PGA, el desarrollo de la técnica en cuestión se detalla en el capítulo siguiente.

## 2.4 Referencias bibliográficas

1. **McLaren, A. D. and L. Packer.** 1970. Some aspect of enzyme reactions in heterogeneous system., p. 245-308. *In* F. F. Nord (ed.), *Advances in enzymology*. John Wiley & Sons, Bronx.
2. **Ghose, T. K. and V. S. Bisaria.** 1979. Studies on the mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulosic substances. *Biotechnology and Bioengineering* **21**:131-146.
3. **Lee, S. B., H. S. Shin, and D. Y. Ryu.** 1982. Adsorption of cellulase on cellulose: effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* **24**:2137-2153.
4. **Lee, Y. H. and L. T. Fan.** 1982. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Analysis of the initial rates. *Biotechnology and Bioengineering* **24**:2383-2406.
5. **Sakai, T.** 1988. Protopectinase from yeast and a Yeast-like Fungus. *Methods in enzymology* **161**:335-350.
6. **Estrada, P., C. Acebal, M. P. Castillon, I. Mata, and D. Romero.** 1988. Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on wheat straw. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **10**:49-58.
7. **Goldberger, W. M. and L. A. Robbins.** 1984. Solid-Solid and Liquid-Liquid system., p. 1-83. *In* R. Perry and G. Green (eds.), *Perry's chemical engineer's handbook*.
8. **Burns, D. S., H. Ooshima, and A. O. Converse.** 1989. Surface area of pretreated lignocellulosics as a function of the extent of enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **20**:79-94.
9. **Harsa, S., C. A. Zaror, and D. L. Pyle.** 1993. Adsorption of *Kluyveromyces marxianus* pectinase on CM-Sephadex gels. *Enzyme Microb. Technol.* **15**:906-915.
10. **Rozie, H., W. Somers, A. Bonte, J. Visser, K. Van't Riet, and F. M. Rombouts.** 1988. Adsorption characteristic of endo-polygalacturonase on alginate beads. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **10**:346-358.
11. **Gupta, M., D. Gouqiang, and B. Mattiasson.** 1993. Purification of endo polygalacturonase by affinity precipitation using alginate. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **18**:321-327.
12. **Ooshima, H., M. Sakata, and Y. Harano.** 1983. Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* **25**:3103-3114.
13. **Dijkerman, R., M. B. F. Vervuren, H. J. M. op Den Camp, and C. Van Der Drift.** 1996. Adsorption characteristics of cellulolytic enzymes from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. Strain E2 on microcrystalline cellulose. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:20-25.
14. **Hogan, C. M., M. Mes-Hartree, J. N. Saddler, and D. J. Kushner.** 1990. Assesment of methods to determine minimal cellulase concentration for efficient hydrolysis of cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**:614-620.

## CAPITULO 3

### Técnica de medida de actividad poligalacturonasa (PGasa)

#### 3.1 Introducción

La técnica desarrollada para la medida de actividad enzimática utilizando protopectina de limón como sustrato resulta muy engorrosa cuando el número de muestras a determinar es muy elevado. A fin de reemplazarla para las medidas de rutina se aprovechó el hecho de que la enzima actúa también sobre ácido poligalacturónico soluble y se puso a punto una técnica de medida confiable de la actividad sobre este sustrato.

En este capítulo se describe las tareas realizadas en la puesta a punto de dicha técnica así como en la caracterización parcial de la actividad enzimática.

Las técnicas reportadas en bibliografía para la medición de actividad poligalacturonasa se basan todas bien en la disminución de la viscosidad de una solución de ácido poligalacturónico (PGA) <sup>1 2 3 4</sup> o bien en el incremento del poder reductor debido a la liberación de grupos reductores a partir de PGA <sup>5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 4</sup>. La medición de las dos técnicas permite catalogar a una PGasa como endo o exoPGasa ya que, mientras las primeras producen una gran disminución de la viscosidad junto con el aumento del poder reductor, las últimas sólo incrementan el poder reductor de la mezcla de reacción.

El poder reductor generado puede medirse por varios métodos. Algunos autores <sup>15 16 17 18 19 13</sup> utilizan el método de Somogyi-Nelson <sup>20 21</sup>, otros <sup>22</sup>, el método de la reducción de ferrocianuro de potasio. También es utilizado <sup>23 24 25 26 2 3 4</sup> el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) de Miller <sup>27</sup>. En el presente trabajo se eligió el método de Somogyi-Nelson dado que posee una mayor sensibilidad <sup>28</sup>

En general las poligalacturonasa obedecen a una cinética de Michaelis Menten y como tal, la velocidad de reacción por ella catalizada tiene una dependencia con la concentración de sustrato del tipo

$$v = v_{max} \frac{S}{K_M + S} \quad (I)$$

Enzima	Origen	[Sustrato] g.L <sup>-1</sup>	Tiempo Min	Temp °C	pH	Referencia
PGasa	<i>Corticium rolsii</i>	5.0-6.0 <sup>a</sup>	30	30	2.5	1
PGasa	<i>G. klebahnii</i>	1.0 <sup>b</sup>	60	37	5.0	8
PGasa	Tomate	2.0 <sup>b</sup>	180	30	4.4	11
PGasa	<i>Erwinia carotovora</i>	2.0 <sup>b</sup>	10	30	5.3	29
PGasa	Tomate	5.0 <sup>c</sup>	10	25	4.2	10
PGasa	<i>A. Níger</i>	5.0 <sup>b</sup>	1	25	5.0	12
PGasa	<i>B. cinerea</i>	5.0 <sup>b</sup>	30	30	4.0	25
Pectinasa	<i>Sclerotium rofsii</i>	10.0 <sup>d</sup>	30	55	3.2	30
PGasa	<i>K. fragilis</i>	1.0 <sup>c</sup>	variable	30	5.0	31
Exo-PGasa	<i>G. lactis</i>	2.5 <sup>c,d</sup>	variable	30	5.6	14

<sup>a</sup> PGA (fracción soluble en ácido) <sup>b</sup> PGA <sup>c</sup> Poligalacturonato de sodio <sup>d</sup> Pectina

**Tabla I.3:** Parámetros típicos reportados para la medida de actividad poligalacturonasa.

La concentración de sustrato, así como las condiciones tiempo y temperatura utilizadas en la medida reportadas en bibliografía son variables. En la tabla I.3 se muestran algunos de esos valores.

Mc Feeters <sup>32</sup> ha reportado que por encima de 1.0 g.L<sup>-1</sup> la concentración de sustrato es saturante. Este dato no está de acuerdo con los valores K<sub>M</sub> reportados para diversas poligalacturonasas de origen vegetal y fúngico (Tabla II.3) ya que para que para ninguno de los K<sub>M</sub> reportados se observa que la concentración sea 10 veces superior a K<sub>M</sub>.

	Origen	Peso molecular	K <sub>m</sub> * (g.L <sup>-1</sup> )	Referencia
Hongos	<i>Aspergillus niger</i>	46000	0.54	33
	<i>Botrytis cinerea</i>	69000	1.20	25
	<i>Fusarium oxysporum</i>	37000	0.54	16
	<i>Verticillium. albo-atrum</i>	30000	1.50	2
	<i>Trichoderma koningii</i> PG-1	32000	0.80	23
	<i>Trichoderma koningii</i> PG-2	32000	0.85	23
Levaduras	<i>Saccharomyces fragilis</i>	46000	0.13	34
	<i>Saccharomyces fragilis</i>	50000	0.22	34
	<i>T. candida</i>		0.20	35
	<i>Cryptococcus albidus</i>	41000	0.57	4
	<i>Geotrichum lactis</i>	53000	0.09	14

\*para poligalacturonato de sodio

**TABLA II.3:** Propiedades de algunas endo-poligalacturonasas de origen vegetal y microbiano.

El mayor inconveniente de todas estas técnicas es que en concentraciones mayores de 3,0 g.L<sup>-1</sup> el sustrato gelifica durante la colorimetría <sup>32</sup>. Esta situación genera principalmente dos problemas. Por un lado la presencia del gel interfiere en la medida de absorbancia a 660 nm, y además el gel retiene en su interior parte del complejo coloreado formado por el reactivo de Nelson con el óxido cuproso y hace que para medir la absorbancia haya que centrifugar las muestras una por una. Una alternativa posible a este inconveniente es la utilización de 2-cianoacetamida para medir el poder reductor generado durante la reacción enzimática <sup>11</sup>. Este reactivo reacciona con los grupos reductores para dar un producto que absorbe luz a una longitud de onda de 276 nm. A diferencia de la técnica de Somogyi-Nelson se agrega un solo reactivo y la muestra no gelifica. Los mayores inconvenientes que presenta es que hay que leer en el UV y que a esta longitud de onda pueden interferir las proteínas que haya en la muestra a analizar si su concentración es elevada.

En vista de que no se encontró una técnica que fuera completamente adecuada para la PGasa de *G. klebahnii*, la primera parte del plan de trabajo consistió en estudiar que concentración de sustrato y tiempo de reacción son las adecuadas para que posea una sensibilidad y sencillez aceptables.

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Reactivos químicos:

Los reactivos químicos y la enzima comercial utilizadas en las experiencias citadas

en el presente capítulo son las mismas que los utilizados en el capítulo referido a la técnica de PPasa.

### 3.2.2 Técnica enzimática

A pesar de que en esta parte del trabajo se fueron modificando variables tales como concentración de sustrato y tiempo de reacción, la técnica mantuvo el siguiente protocolo:

Se agregan 450  $\mu\text{L}$  de sustrato (en la concentración que corresponda) disuelto en AcB 20mM pH 5 en tubos pequeños (al menos tres tubos por muestra, duplicado y blanco de reacción).

Se termostatan los tubos a 37 °C.

Se incorpora a tiempos regulares 50  $\mu\text{L}$  de enzima (diluida convenientemente) en AcB (sólo a los tubos de muestra, no a los blancos).

Se incuba a 37 °C.

Al tiempo convenido para cada tubo (manteniendo el orden del agregado de muestra) se agregan 500  $\mu\text{L}$  de reactivo de Somogyi <sup>21</sup>. Al finalizar el agregado de Somogyi sobre las muestras, se agrega en los tubos de los blancos

Se agrega la muestra correspondiente a cada blanco.

Se lleva a ebullición por 10 minutos

Se deja enfriar por 10 minutos

Se agregan 500  $\mu\text{L}$  reactivo de Nelson <sup>20</sup>

Se deja reposar 30 minutos

Se agregan 4.5 mL de agua

Se agita y se lee a 660 nm.

## 3.3 Resultados y discusión

### 3.3.1 Determinación de condiciones de medida

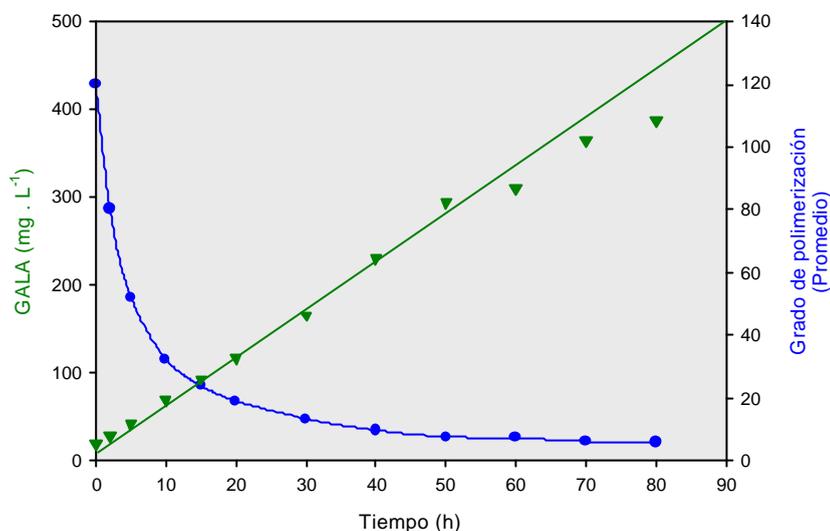
La primera variable ensayada fue la concentración de sustrato a utilizar. En principio, dado que la mayoría de las técnicas reportan un valor cercano a 5,0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , se intentó aumentar la misma al menos hasta ese valor pero, tal como se esperaba, por encima de 3,0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , el sustrato gelifica durante la colorimetría. Debido a este inconveniente, se decidió fijar la concentración de sustrato en 2,0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En aquellos casos en los que se debió superar esta concentración (en la determinación de  $K_M$ ), se cuidó de agitar el tubo de reacción para que el complejo coloreado no quedara retenido en el interior del gel, que fue posteriormente removido por centrifugación (200 x g, 3 min.) para evitar interferencias en la determinación de la absorbancia de 660 nm.

Al principio del trabajo no era conocido el valor de  $K_M$  por lo que no pudo conjeturarse que la enzima estuviera saturada. Por esta razón, se determinó el rango de tiempo en el cual la medida enzimática se mantiene lineal (Fig. 1.3).

Por medidas anteriores de la actividad enzimática de la solución stock, se eligió para esta experiencia trabajar con una dilución 1:20 preparada en AcB.

Puede observarse claramente que, en estas condiciones, la velocidad de reacción se mantiene constante hasta los 50 minutos de incubación y que el grado de polimerización disminuye hasta valores cercanos a 5. Mientras el sustrato tiene un

grado de polimerización mayor de 10 la velocidad de reacción permanece constante (ver más adelante).



**Figura 1.3:** Relación entre la liberación de GALA (▼), el grado de polimerización promedio (●) (calculado en función del poder reductor) y el tiempo de incubación con 50 µl de solución stock (dil 1:20) y 2.0 g.L<sup>-1</sup> de PGA.

Cuando el sustrato fue sometido a una hidrólisis más prolongada, la cantidad final de equivalentes de poder reductor liberados (ver más abajo) fue de 500 mg.L<sup>-1</sup>. Esto significa que la velocidad de reacción se mantuvo constante aproximadamente hasta haber liberado aproximadamente el 50 % de los grupos reductores disponibles. Finalmente se decidió, por razones prácticas, tomar 10 min. como tiempo de reacción. Este tiempo puede extenderse si la muestra analizada tiene una actividad muy baja.

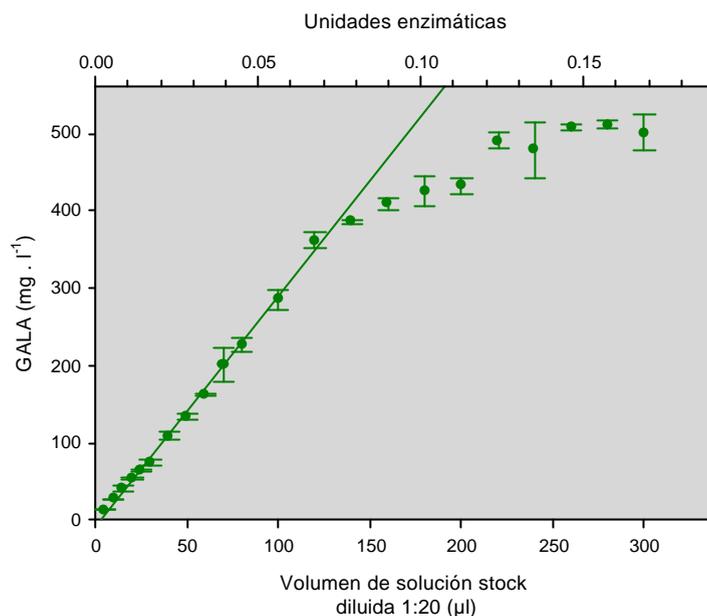
Una vez fijadas las condiciones de concentración de sustrato y tiempo, se procedió a determinar hasta qué concentración de enzima es posible medir con el método sin que deje de ser lineal la liberación de grupos reductores en función del tiempo. Para esto, se agregaron diferentes cantidades de enzima en el tubo de reacción. La escala de abscisas se expresa tanto como volumen de la solución stock diluida 1:20 como en unidades de actividad en el tubo de reacción, definiéndose a la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que libera un micromol de poder reductor (como GALA) por minuto en las condiciones de reacción (figura 2.3).

La velocidad de reacción se mantuvo constante hasta el agregado de 120 µl de dicha solución. Cantidades superiores de enzima, llegan a liberar una cantidad de aproximadamente 500 mg.L<sup>-1</sup> pero no en forma directamente proporcional a la cantidad de enzima agregada.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los pasos anteriores, se proponen las siguientes condiciones para la medida de la actividad PGasa.

- ◆ Sustrato: Poligalacturonato de sodio 2 g.L<sup>-1</sup> en AcB 20 mM, pH 5
- ◆ Tiempo: 10 minutos

## ◆ Temperatura: 37°C



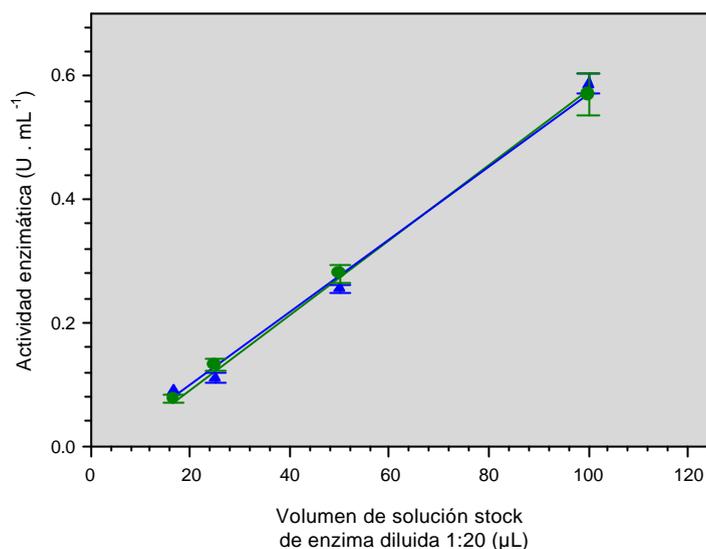
**Figura 2.3:** Liberación de GALA con 10 minutos de incubación a 37°C en función de la cantidad de enzima adicionada al tubo de reacción con una concentración de PGA de 2.0 g.L<sup>-1</sup>.

En estas condiciones, la técnica es lineal hasta el agregado de 0.08 unidades de PGasa en el tubo de reacción (Fig. 2.3).

Cuando hay que medir actividad enzimática de diferentes muestras es de uso común mantener el sustrato termostático a la temperatura de trabajo y sobre éste agregar la muestra de enzima a intervalos regulares de tiempo y, al finalizar el tiempo de incubación para cada muestra, detener la reacción también a intervalos regulares, ya sea por el agregado de algún reactivo o por el cambio de temperatura. Utilizar este método cuando hay que manejar un gran número de muestras resulta tedioso y extremadamente complicado para programar los tiempos de agregado de enzima. Si se agrega la muestra de enzima cada 15 segundos y se mide cada muestra por duplicado y con un blanco de reacción, en 10 minutos de reacción no pueden medirse más de 20 muestras sin que se superpongan los tiempos de agregado de la enzima y de finalización de las primeras muestras. A fin de evitar este inconveniente, se probó el siguiente método. Se coloca 450 µl de sustrato en cada tubo a utilizar y se sumergen dichos tubos en un baño de agua-hielo. En cada uno de los tubos, se adicionan 50 µl de la solución de enzima a analizar, convenientemente diluida. A tiempo cero, se transfieren todos los tubos a un baño termostático a 37°C durante 10 minutos cuidando de agitar por unos segundos a fin de acelerar la transferencia de calor. Transcurrido ese tiempo, se vuelven las muestras al baño de agua-hielo y se agregan 50 µl de la solución de enzima en los tubos correspondientes a cada blanco. La técnica colorimétrica es igual para ambos métodos.

Esta técnica fue contrastado contra la técnica original utilizando diferentes volúmenes de la solución stock, obteniéndose, en las condiciones de reacción propuestas, resultados muy similares entre ambos protocolos (Fig. 3.3). Todas las

muestras fueron tratadas por triplicado.



**Figura 3.3:** Actividad comparativa utilizando el método tradicional de medida (●) y el método con preincubación en hielo (▲).

### 3.3.2 Caracterización de la actividad enzimática.

El primer parámetro medido fue el grado máximo de hidrólisis que la enzima puede realizar. El grado de polimerización del producto obtenido en cada tiempo de reacción se calculó en función del poder reductor de la muestra.

Como puede verse en la figura 1.3, en promedio, el valor inicial del grado de polimerización del PGA (calculado por el valor del poder reductor de los blancos de reacción) fue estimado en 120 ( $PM \cong 21000$ ). Considerando el incremento del poder reductor de la mezcla, el grado de polimerización final del producto puede ser estimado entre 3 y 4. A la solución con el máximo grado de hidrólisis se le dio el nombre de Solución de Productos Finales (SPF).

Blanco y *col*<sup>13</sup> han reportado un valor de 4 para el grado de polimerización del producto final de degradación de una endopoligalacturonasa de *S. cerevisiae*. Este valor es coherente con otros reportados para otras endoPGasas las que, en general, no pueden degradar dímeros y trímeros de ácido galacturónico<sup>36, 37</sup> o lo hacen a una velocidad mucho menor. Se ha reportado que la endo PGasa de *Saccharomyces fragilis* degrada al trigalacturónico a una velocidad 50 veces menor que al tetragalacturónico. Un caso similar se encuentra en *Aspergillus niger* para una endo PGasa extracelular en la que la relación de velocidades para la degradación de tetragalacturónico a trigalacturónico es de 20<sup>37</sup>.

Tal como se ve en la Fig. 2.3, cuando se agregan más de 0.08 U de PGasa en el tubo de reacción, la relación entre poder reductor liberado y enzima agregado se aparta de la linealidad. Hay al menos dos posibles hipótesis para explicar este fenómeno, la primera es que la reacción no esté transcurriendo en condiciones saturantes y la velocidad de reacción medida no sea la inicial sino un promedio de velocidades. La segunda posibilidad es que el incremento de la concentración de

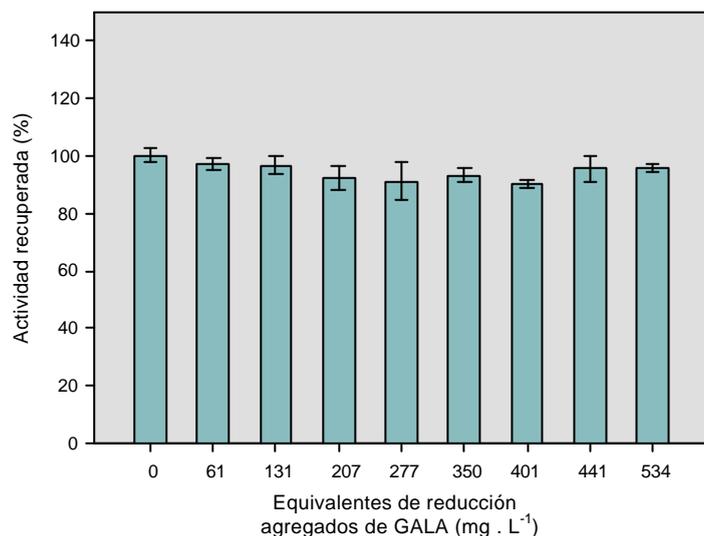
productos de reacción inhiba de alguna forma a la enzima.

A fin de ver cual de las dos posibilidades es la causante de ese comportamiento, se midió la actividad enzimática en ausencia y en presencia de diferentes cantidades de SPF. La solución de productos finales fue obtenida en este caso de una forma ligeramente modificada a fin de ahorrar tiempo. La solución de PGA ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) fue tratada directamente con la solución stock de enzima (sin diluir) durante 15 minutos.

El protocolo de trabajo fue el siguiente. Se preparó una solución  $18 \text{ g.L}^{-1}$  de PGA en AcB, de ésta se adicionaron  $50 \mu\text{l}$  en todos los tubos y luego se adicionaron 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400  $\mu\text{l}$  de SPF completándose en cada caso el volumen final de 450  $\mu\text{l}$  de reacción con AcB. De cada serie se realizaron cuadruplicados, un blanco con SPF sin enzima y un blanco de sustrato (sin SPF ni enzima). En todos los tubos de reacción se pusieron 0.06 unidades de PGasa. La actividad recuperada se calcula restando a cada tubo de cada serie el valor del blanco con SPF.

Como puede verse en la figura 4.3, la actividad medida en cada uno de los casos fue similar, y no se notó un decaimiento de la actividad aún por el agregado de altas cantidades de productos finales de reacción (equivalentes a  $534 \text{ mg.L}^{-1}$  de GALA). Los equivalentes de SFP agregados fueron medidos de los blancos de reacción sin enzima.

Estos resultados indican que el decaimiento en la velocidad de reacción no se produce por la acumulación de productos finales de reacción, al menos en las condiciones de medida, sino que es causado por la disminución de la concentración de sustrato durante la misma. Según puede verse en la figura 1.3, la actividad enzimática no depende directamente de la cantidad de sustrato sino de su grado de polimerización, como la enzima es una endo-PGasa, los productos de la reacción enzimática son a su vez sustrato de la enzima por lo que la concentración de sustrato no disminuye durante la reacción hasta que el grado de polimerización alcanza un valor de aproximadamente 10.

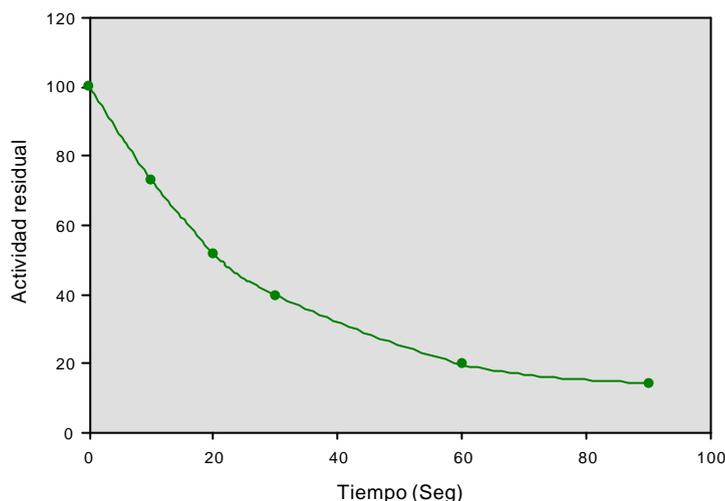


**Figura 4.3:** Actividad recuperada en relación al agregado de diferentes cantidades de productos finales de la reacción, agregando en todos los tubos 0.06 U de PGasa.

Existen algunas variables comunes de laboratorio que suelen no tenerse en cuenta

en el momento de realizar una técnica enzimática, dos de ellas son el tiempo transcurrido entre la dilución de la muestra y la medida de actividad y la otra es el tiempo de agitación en vortex de la muestra. Dado que se encontraron en principio alguna variaciones de difícil explicación, se decidió estudiar el efecto de estas dos variables sobre la actividad de la enzima.

Para estudiar el efecto de la agitación se realizó el siguiente protocolo. Una muestra de cultivo de *G. klebahnii* se diluyó 1:10 en el tubo de reacción y se enfrió en un baño de agua hielo. Luego se agitó en el vortex y cada 10 segundo se tomó una muestra para determinar actividad enzimática. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.3.



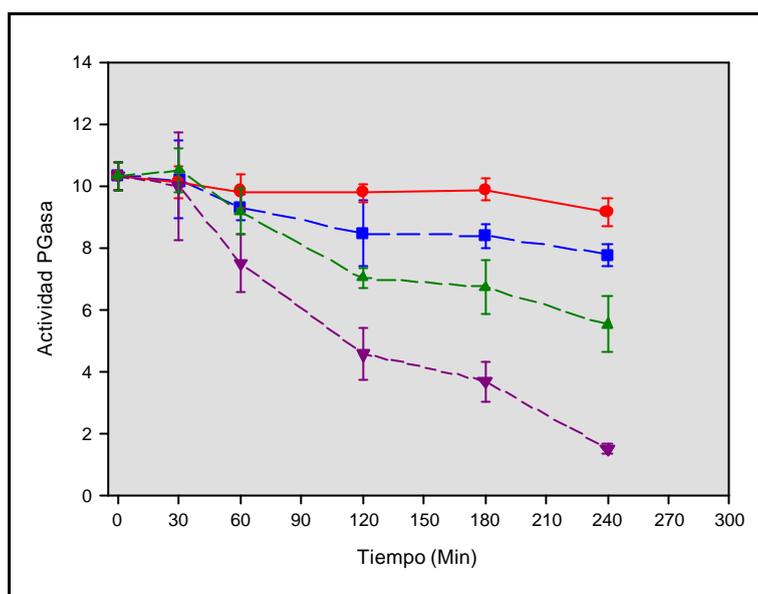
**Figura 5.3:** Efecto de la agitación sobre la actividad enzimática.

Puede verse que la enzima pierde gran parte de la actividad con la agitación. Este efecto no es en general tenido en cuenta en la medidas de rutina sin embargo, Colombie y col.<sup>38</sup> han encontrado el mismo comportamiento para lisozima de clara de huevo. Este efecto puede deberse a la desnaturalización de la enzima debida a las fuerzas de corte que se generan en el solvente durante la agitación sumado al efecto del O<sub>2</sub> que se disuelve debido a la agitación<sup>39</sup>.

En relación al efecto del tiempo transcurrido entre la dilución y la determinación enzimática, se realizó el siguiente ensayo. Se diluyo con AcB la solución stock 1:20 y se incubó la solución diluida y un testigo de la solución sin diluir a 0°C y a 37 °C. Los resultados obtenidos pueden observarse en la Fig. 6.3.

Como puede observarse, la enzima es muy estable cuando esta en una concentración relativamente alta y en frío, conservando más del 90 % de la actividad inicial aun después de 4 horas. En contraste, cuando se diluye, la estabilidad disminuye bastante perdiendo aproximadamente la mitad de la actividad en ese período de tiempo. Wang y Keen<sup>2</sup> han encontrado el mismo efecto para una endopoligalacturonasa de *Verticillum albo-atrum*. Cuando esta enzima esta en el medio de cultivo es sumamente estable pudiendo incluso concentrarse a 40-45 °C sin mayores perdidas de actividad, pero pierde rápidamente la actividad cuando es purificada. Blanco y col.<sup>13</sup> también ha encontrado una estabilidad muy grande para una PGasa de *S. cereviciae* la cual pierde menos de un 5% de la actividad cuando se

la incubaba a 37°C por el término de una hora.



**Figura 6.3:** Actividad PGasa en función del tiempo de incubación a temperatura constante. ● Solución stock a 0°C. ■ Solución stock a 37°C ▲ Solución diluida a 0°C. ▼ Solución diluida a 37°C

Observando estos resultados, se determinó que para las medidas de rutina es muy importante realizar las diluciones a último momento y homogeneizarlas, o bien por inversión, o utilizando el vortex pero durante un tiempo extremadamente corto (habitualmente con un par de pulsos de un segundo o menos es suficiente para conseguir una buena homogeneidad).

Es habitual que las enzimas se vean afectadas en su actividad por la presencia de cationes en la mezcla de reacción<sup>40, 5</sup>. Este efecto podría alterar las medidas de los cultivos ya que el medio de cultivo posee varios cationes indispensables para el crecimiento del *G. klebahnii*.

Para investigar si dichos metales poseen algún efecto sobre la enzima, se realizó la siguiente experiencia. Se incubaron alícuotas de la solución stock con diferentes concentraciones de dichos metales, los cationes ensayados fueron  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  por ser estos los más frecuentes en los medios de cultivo. En todos los casos se ensayaron dos concentraciones distintas, 1.0 y 10 mM.

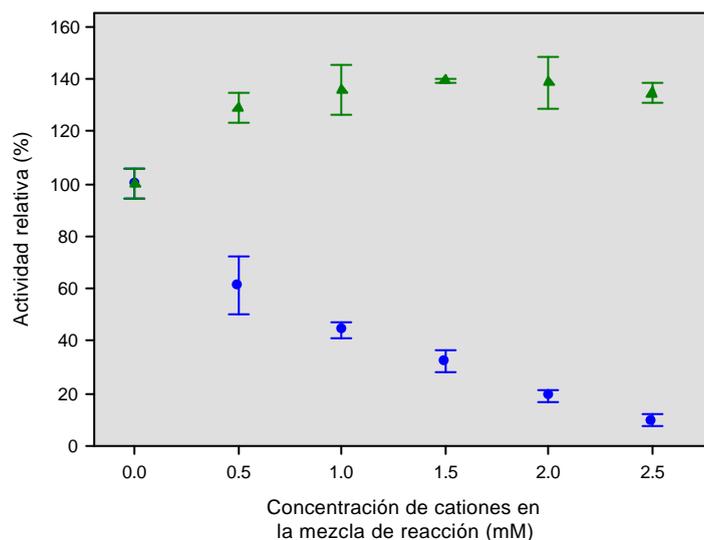
Para el ensayo, se incubó la solución stock con cada uno de los metales a 37°C durante 30 minutos y luego se procedió a la medida de la actividad enzimática con la técnica habitual, luego de las diluciones correspondientes, la concentración de los metales en las mezclas de reacción fueron  $5,0 \times 10^{-3}$  y  $5,0 \times 10^{-2}$  mM respectivamente. Las muestras se incuban previamente a la medida porque la inactivación de las enzimas por metales suele no ser inmediata y en caso de realizar la adición de los cationes sobre la mezcla de reacción en el momento de comenzar la cinética, puede que en los 10 minutos de reacción no se observe ningún efecto.

No se encontraron diferencias significativas en la actividad medida con respecto a los testigos sin tratamiento salvo el caso de la incubación con la solución 10mM de  $\text{Cu}^{+2}$ , en este caso, la actividad recuperada fue del 75 %. Wang & Keen<sup>2</sup> reportan un valor de  $K_i = 7.0 \times 10^{-3}$  mM para la endo-PGasa de *Verticillium albo-atrum* lo que representa un 58 % de inhibición para una concentración  $5,0 \times 10^{-2}$  mM de  $\text{Cu}^{+2}$ .

Cabe destacar que esta es una concentración prácticamente imposible de encontrar en un medio de cultivo. Esto indica que la actividad enzimática puede ser medida sin interferencia directamente en el sobrenadante de los cultivos, siempre y cuando la concentración de azúcares reductores lo permita.

Otro ensayo realizado para ver las posibles interferencias en la medida fue la medida de la actividad enzimática preparando las soluciones de PGasa y de PGA en buffer acético/acetato preparado con  $\text{Na}^+$  o con  $\text{K}^+$ . En esta prueba no se obtuvieron diferencias significativas entre uno y otro buffer.

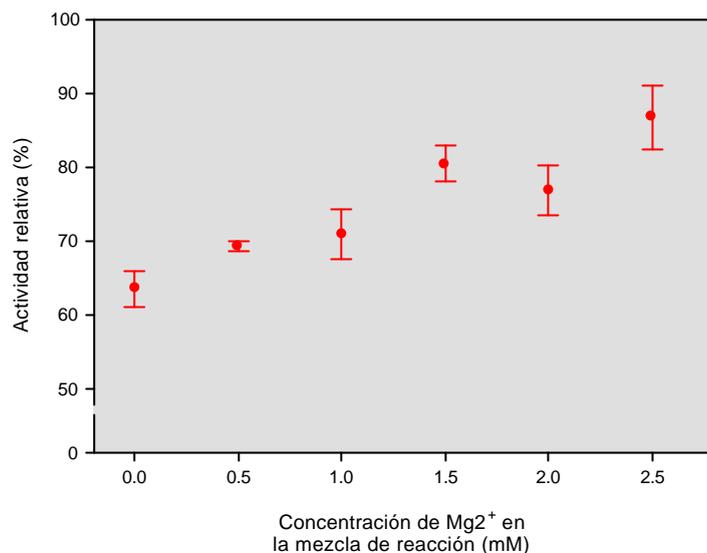
Sakai y col.<sup>41</sup> reportan que a concentración 1.0 mM de  $\text{Ca}^{+2}$  en la mezcla de reacción se observa una actividad residual del 44% de la del testigo. Para verificar este posible efecto, se estudió el efecto del  $\text{Ca}^{+2}$  a concentraciones mayores que las de la experiencia anterior, no incubando la enzima previamente sino agregando dicho catión directamente en la mezcla de reacción en concentraciones variables, desde 0 a 2.5 mM. La actividad enzimática se ve fuertemente inhibida a concentraciones relativamente bajas (Fig. 7.3), este resultado es concordante con la PGasa de *Monilinia fructicola* la cual pierde más de un 50% de la actividad control con concentraciones de  $0.6 \text{ g.L}^{-1}$  de calcio<sup>42</sup> y con una PGasa de *A. niger* cuya actividad se ve reducida hasta un 36% en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  2,0 mM<sup>26</sup>. A diferencia del trabajo de Sakai antes mencionado, en nuestro caso el  $\text{Mg}^{+2}$  posee un efecto activador (Fig. 7.3).



**Figura 7.3:** Actividad recuperada con el agregado de diferentes cantidades de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (▲) y  $\text{CaCl}_2$  (●) en la mezcla de reacción.

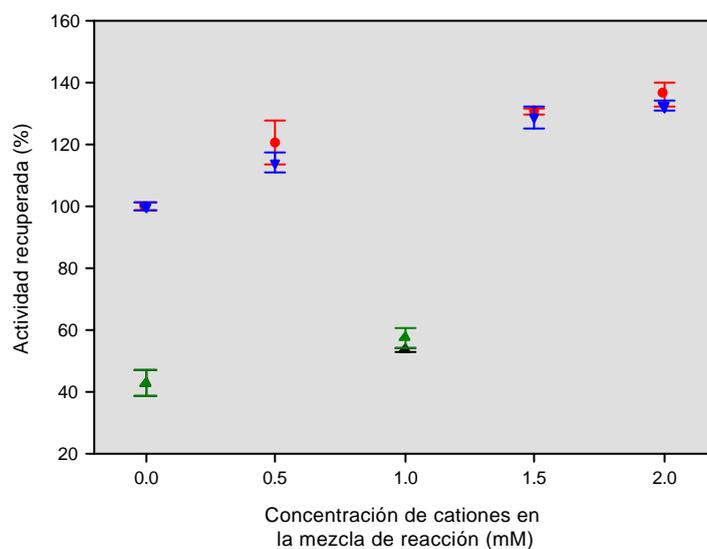
Cuando se ensayó el efecto combinado de ambos cationes, se observó que el efecto inhibitorio del  $\text{Ca}^{+2}$  en concentración 0.5 mM, es parcialmente revertido por concentraciones crecientes de  $\text{Mg}^{+2}$  (Fig. 8.3).

Cuando las soluciones de dichos cationes se prepararon a partir de  $\text{SO}_4^{-2}$  o  $\text{Cl}^-$ , no se encontraron diferencias entre las medidas de inhibición y activación, lo que indica que el efecto es causado por el catión y no por el anión. La Fig. 9.3 muestra los resultados de dicha experiencia en la que ensayó el efecto del  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{MgCl}_2$  en concentraciones 0.5, 1.5 y 2.0 mM y la reversión de la inhibición de 1.0 mM de  $\text{CaCl}_2$  causada por concentraciones 1.0 mM de  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{MgCl}_2$ .



**Figura 8.3:** Actividad relativa con el agregado de 0.5 mM de CaCl<sub>2</sub> y diferentes cantidades de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

Las causas de este comportamiento excede los límites de nuestro plan de trabajo y aún deben ser elucidadas.



**Figura 9.3:** actividad relativa en presencia de diferentes cantidades de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (▼) y MgCl<sub>2</sub> (●) y con CaCl<sub>2</sub> 1.0 mM, en presencia y ausencia de 1.0 mM de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (▲) y MgCl<sub>2</sub> (■)

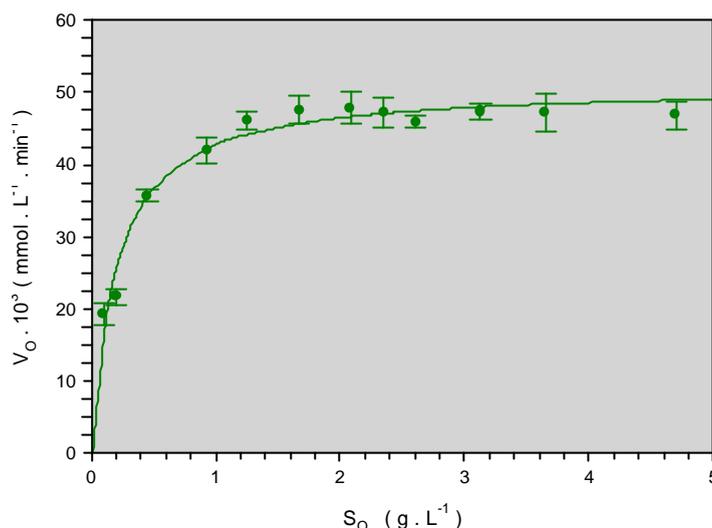
### 3.3.3 Determinación de constantes cinéticas de la PGasa de *G. klebahnii*.

A fin de determinar las constantes cinéticas de la enzima, se determinaron las velocidades iniciales con diferentes concentraciones de sustrato, desde 0.1 a 2.5 g.L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>. Durante la colorimetría, el gel formado por el sustrato a concentraciones mayores de  $2 \text{ g.L}^{-1}$ , hubo de ser removido por centrifugación. Para esta determinación, se realizaron quintuplicados de las muestras.

Como puede verse en la figura 10.3, la cinética de hidrólisis del PGA puede ser descrita por una cinética del tipo de Michaelis-Menten la cual responde a una ecuación del tipo

$$V = V_{max} \frac{S}{K_m + S}$$



**Figura 10.3:** Gráfica de Michaelis-Menten. Velocidad inicial en función de la concentración inicial de sustrato.

Los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron calculados a partir de la transformación de Hanes-Hultin<sup>43</sup>.

$$\frac{S_0}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{S_0}{V_{max}}$$

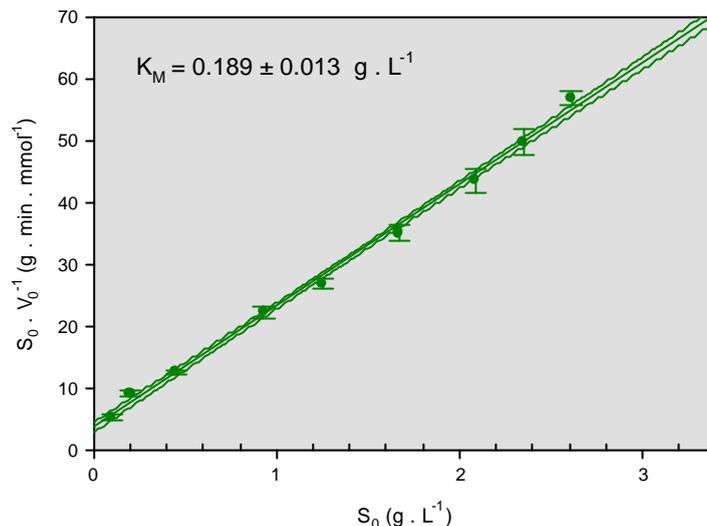
donde  $S_0$  es la concentración inicial de sustrato y  $V_0$  la velocidad inicial de la reacción.

La figura 11.3 muestra la gráfica de esta ecuación, a partir de ella pueden determinarse fácilmente los parámetros cinéticos de la enzima. Esta transformación tiene la ventaja con respecto a las demás linealizaciones de la ecuación de Michaelis-Menten que no agrupa los datos lejos del origen tal como lo hace la doble recíproca o de Lineweaver-Burk sino que distribuye uniformemente los datos a lo largo de la gráfica.

El  $K_M$  aparente para dicha reacción es de  $0.189 \text{ g.L}^{-1}$ , dicho valor fue calculado a través de la regresión de la ecuación antes mencionada. Cabe destacar que este valor de  $K_m$  bajo con respecto a otros reportados para diferentes PGasas de diversos orígenes<sup>44, 45</sup> y según puede verse en la tabla II.3, muestra que la PGasa de *G. klebahnii* posee propiedades cinéticas más cercanas a las de levaduras que a las de

hongos filamentosos y vegetales.

Este valor confirma que la concentración elegida para la medida es la correcta ya que es mayor que  $10 \times K_M$ .



**Figura 11.3:** Gráfica de Hanes-Hultin.

Para verificar si el método puede ser utilizado en la medida directa en medios de cultivo, se midió la actividad encontrada en diferentes diluciones del sobrenadante de un cultivo batch de *G. klebahnii* ATCC 42397 crecido en el medio testigo. Las medidas se realizaron por triplicado. Los resultados se indican en la Tabla III.3. Como puede verse, no se encontraron diferencias significativas en las actividades recuperadas. Cuando la muestra tiene baja actividad, se pueden utilizar mayores tiempos de incubación sin que se observen diferencias significativas.

Dilución del sobrenadante	Tiempo (min)	Actividad recuperada (U.mL <sup>-1</sup> )
1:15	10	14.3
1:40	10	15.0
1:100	30	14.1

**Tabla III.3:** Actividad medida en sobrenadantes de cultivos de *G. klebahnii* a diferentes diluciones con la técnica optimizada.

### 3.4 Referencias bibliográficas

1. **Takawa, K. and A. Kaji.** 1988. Polygalacturonase from *Corticium rolfsii*. Methods in enzymology **161**:361-365.
2. **Wang, M. C. and N. T. Keen** 1970. Purification and characterization of endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. Archives of Biochemistry and Biophysics **141**:749-757.
3. **Schwam, R. F. and A. H. Rose.** 1994. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. J. Appl. Bacteriol. **76**:62-67.
4. **Federici, F.** 1985. Production, purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var *albidus*. Antonie van Leeuwenhoek **51**:139-150.
5. **Kertest, Z. I. and R. J. Mc Colloch.** 1953. Enzymes acting on pectic substances. Adv. Carbohyd. Chem. and Biochem. **5**:79-102.
6. **Voragen, A. G. and Pilnik W.** 1989. Pectin-degrading enzymes in fruit and vegetable processing. Biocatalysis in Agricultural Biotechnology **93**:93-115.
7. **Fogarty, W. and O. Ward.** 1974. Pectinases and pectic Polysaccharides. Progress in Industrial Microbiology. **13**:59-117.
8. **Iguchi, K., M. Kishida, and T. Sakai.** 1996. Purification and characterization of three extracellular protopectinases with polygalacturonase activities from *Trichosporon penicillatum*. Biosc. Biotech. Biochem **60**:603-607.
9. **Schejter, A. and L. Marcus.** 1988. Isozymes of Pectinesterase and Polygalacturonase from *Botrytis cinerea* Pers. Methods in enzymology **161**:366-373.
10. **Mikes, O. and L. Rexova-Benková.** 1988. High-performance liquid chromatography of pectic enzymes. Methods in enzymology **161**:385-399.
11. **Gross, K.** 1982. A rapid and sensitive spectrophotometric method for Assaing Polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. Hort. Science **17**:933-934.
12. **Lanzarini, G., A. Manzo, G. Spagna, and P. G. Pifferi.** 1984. Polygalacturonase activity determination by spectrophotometric analysis of uronic acidss with m-hydroxydiphenil. Annali di Chimica **74**:705-713.
13. **Blanco, P., C. Sierio, A. Diaz, and T. G. Villa.** 1994. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Microbiol. **40**:974-977.
14. **Pardo, C., M. A. Lapeña, and M. Gacto.** 1991. Purification and characterization of an extracellular exopolygalacturonase from *Geotrichum lactis*. Can. J. Microbiol. **37**:974-977.
15. **Rexova-Benková, L. and V. Tibensky.** 1972. Selective Purification os *Aspergillus niger* endopolygalacturonase by afinity chromatography on cross-linked pectic acid. Biochimica et Biophysica Acta **268**:187-193.
16. **Strand, L. L., M. E. Corden, and D. L. Mac Donald.** 1975. Characterization of two endopolygalacturonase isozymes produced by *Fusarium oxysporum f.sp. lkopersici*. Biochimica et Biophysica Acta **429**:870-883.
17. **Rexova-Benková, L., J. Omelkova, K. Filka, and J. Kocourer.** 1983. Selective isolation of endo-D-galacturonase of aspergillus niger based on interaction with tri(D-galactosiduronic acid) covalently bound to poly(hydroxyalkyl methacrylate).

- Carbohydrate Research **122**:269-281.
18. **Contreras Esquivel, J. C., R. A. Hours, C. E. Voget, and C. F. Mignone**. 1999. *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. Journal of Bioscience and Bioengineering **88**:48-52.
  19. **Channe, P. S. and J. G. Shewale**. 1995. Immobilization of pectinase from *Sclerotium rolfsii*. Folia Microbiol. **40**:118-122.
  20. **Nelson, N.** 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. J. Biol. Chem. **153**:376-380.
  21. Somogyi, N. Notes on sugar determination. Journal Biological Chemistry 195, 19-23. 1952. Ref Type: Abstract
  22. **Rozie, H., W. Somers, A. Bonte, J. Visser, K. Van't Riet, and F. M. Rombouts**. 1988. Adsorption characteristic of endo-polygalacturonase on alginate beads. Biotechnology and Applied Biochemistry **10**:346-358.
  23. **Fanelli, C., M. G. Cacace, and F. Cervone**. 1978. Purification and properties of two polygalacturonases from *Trichoderma koningii*. Journal of General Microbiology **104**:305-309.
  24. **Cervone, F., A. Scala, M. Foresti, M. G. Cacace, and C. Noviello**. 1977. Endopolygalacturonase from *Rhizoctonia fragariae* purification and characterization of two isoenzymes. Biochimica et Biophysica Acta **482**:379-385.
  25. **Urbanek, H. and J. Zalewska-Sobczar**. 1974. Polygalacturonase of *Botrytis cinerea* e-200 pers. Biochimica et Biophysica Acta **377**:402-409.
  26. **Gupta, M., D. Gouqiang, and B. Mattiasson**. 1993. Purification of endo polygalacturonase by affinity precipitation using alginate. Biotechnology and Applied Biochemistry **18**:321-327.
  27. **Miller, G. L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry **31**:426-428.
  28. **Kawano, C. Y., M. A. dos Santos Cunha Chellegatti, S. Said, and M. J. Vieira Fonseca**. 1999. Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. Biotechnol. Appl. Biochem. **29**:133-140.
  29. **Collmer, A., J. Ried, and M. Mount**. 1988. Assay Methods for Pectic Enzymes. Methods in enzymology **161**:329-335.
  30. **Channe, P. S. and J. G. Shewale**. 1995. Pectinase production by *Sclerotium rolfsii*: effect of culture conditions. Folia Microbiol. **40**:111-117.
  31. **García-Garibay, M., L. Gomez-Ruiz, and E. Bárzana**. 1987. Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. Biotech. Lett. **9**:411-416.
  32. **McFeeters, R. F., Hankin L., and Lacy G.H.** 1992. Pectinolytic and pectolytic microorganisms, p. 213-223. In Vanderzant C and Splittstoesser D. (eds.), Compendium of methods for the microbiological examinations of food.
  33. **Heinrichova, K. and M. Wojciechowicz**. 1989. The pectinolytic enzyme of *Selenomonas rumiantum*. J. Appl. Bacteriol. **66**:169-174.
  34. **Lim, J., Y. Yamasaki, and J. Ozawa**. 1980. Multiple forms of endopolygalacturonase from *Saccharomyces fragillis*. Agric. Biol. Chem. **44**:473-480.
  35. **Call, H. P., J. Walter, and C. C. Emeis**. 1985. Maceration activity of an endopolygalacturonase from *Candida macedoniensis*. J. Food Biochem. **9**:325-348.

36. **Rombouts, F. M. and Pilnik W.** 1980. Pectic enzymes *In* A. H. Rose (ed.), *Microbial enzymes and Bioconversions*, *Economis Microbiology*. Academic Press, London.
37. **Rexova-Benková, L. and O. Markovic.** 1976. Pectic enzymes, p. 323-385. *In* R. S. Tipson and D. Horton (eds.), *Adv. Carbohyd. Chem. and Biochem.*
38. **Colombie, S., A. Gaunand, M. Rinaudo, and B. Lindet.** 2000. Irreversible lysozyme inactivation and aggregation induced by stirring: kinetic study and aggregates characterization. *Biotech. Lett.* **22**:277-283.
39. **Maa, Y. F. and C. C. Hsu.** 1997. Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interfase. *Biotechnology and Bioengineering* **54**:503-512.
40. **Sakai, T.** 1988. Protopectinase from yeast and a Yeast-like Fungus. *Methods in enzymology* **161**:335-350.
41. **Sakai, T. and M. Okushima.** 1982. Purification and crystallization of protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agriculture, Biology and Chemistry* **46**:667-676.
42. **Biggs, A. R., El-Kholi.M.M., S. El-Neshawy, and R. Nickerson.** 1997. Effect of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. *Plant Disease* **81**:399-403.
43. **Kubi, S. A.** 1991. Some complex kinetic mechanisms and treatment of enzyme kinetic data, p. 341-376. *A study of enzymes*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
44. **Whitaker, J. R.** 1990. Microbial pectolytic enzymes, p. 133-176. *In* W. Fogarty and C. T. Kelly (eds.), *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Elsevier Science Publisher, New York.
45. **Pilnik W. and F. M. Rombouts.** 1981. Pectic Enzymes, p. 105-128. *In* G. G. Birch, N. Blakebrough, and K. J. Parker (eds.), *Enzymes and Food Processing*. Applied Science Publishers LTD, London.

## Capítulo 4

### Estudio del crecimiento de *G. klebahnii*.

#### 4.1 Introducción

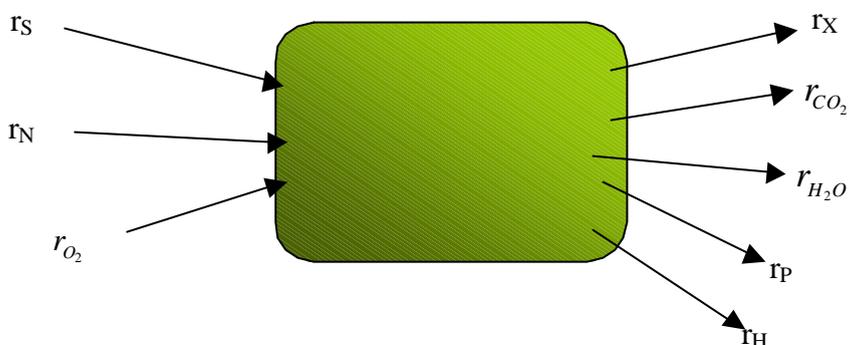
##### 4.1.1 Nomenclatura utilizada en el presente capítulo

FCE	Fuente de Carbono y Energía
X	Concentración de biomasa ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ o $\text{cmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
FN	Fuente de nitrógeno
S	Sustrato (FCE)
P	Producto (Etanol si no se indica lo contrario)
$r_X$	Velocidad volumétrica de producción de biomasa ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ o $\text{cmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
$r_S$	Velocidad volumétrica de consumo de FCE
$r_{\text{O}_2}$	Velocidad volumétrica de consumo de $\text{O}_2$
$r_{\text{CO}_2}$	Velocidad volumétrica de producción de $\text{CO}_2$
$r_N$	Velocidad volumétrica de consumo de FN
$r_H$	Velocidad volumétrica de producción de calor ( $\text{KJ} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
$q_i$	Velocidad específica de consumo o producción de algún metabolito ( $\text{g} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ )
$Y_{X/S}$	Rendimiento de biomasa en función del sustrato ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )
$Y_{P/S}$	Rendimiento de producto en función del sustrato
$Y_{\text{CO}_2/S}$	Rendimiento de $\text{CO}_2$ en función del sustrato
$y_{X/S}$	Rendimiento de biomasa en función del sustrato ( $\text{cmol} \cdot \text{cmol}^{-1}$ )
$y_{P/S}$	Rendimiento de producto en función del sustrato
$y_{\text{CO}_2/S}$	Rendimiento de $\text{CO}_2$ en función del sustrato
$m_S$	Coefficiente de mantenimiento celular ( $\text{g}_S \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
D	Velocidad de dilución en un cultivo continuo ( $\text{h}^{-1}$ )

### 4.1.2 Marco teórico.

En este capítulo se vuelcan los resultados de una serie de estudios realizados a fin de recabar información acerca de la estequiometría, energética y cinética del crecimiento de *G. klebahnii* dado que en la bibliografía consultada no se ha encontrado información alguna al respecto. A fin de conseguir la información requerida, se realizaron estudios tanto en sistema batch como en cultivo continuo

Para los cálculos básicos se utilizó el modelo llamado de “caja negra”. En este modelo se considera que la célula es un compartimiento abierto que recibe un flujo de FCE, uno de fuente de nitrógeno y uno de  $O_2$  y del cual salen flujos de biomasa,  $CO_2$ ,  $H_2O$ , algún producto (si lo hubiera) y energía (como calor). En este modelo no se hace ninguna suposición sobre el metabolismo celular. En la figura 1.4 se observa un esquema del modelo utilizado.



**Figura 1.4:** Esquema del crecimiento celular según el modelo de caja negra

La suma de los flujos de cada uno de los elementos (C, H, O, N) que ingresa al sistema, debe ser igual a la suma de los flujos de salida de ese elemento.

A fin de facilitar los cálculos debido a la complejidad de los compuestos involucrados (especialmente la biomasa) se define una cantidad determinada de cada sustancia denominada carbono-mol (cmol) como la cantidad de cualquier compuesto carbonado que contiene 12 g de carbono.

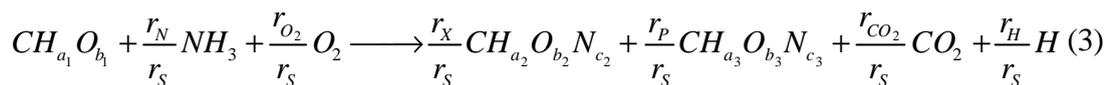
La ecuación que relaciona los flujos de ingreso y egreso del sistema queda definida de la siguiente forma. Se omite el flujo de agua ya que el cultivo se realiza en medio acuoso.



La conveniencia del uso del cmol queda en evidencia de esta forma ya que si se expresan los flujos en  $cmol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$  se observa que:

$$r_S = r_X + r_{CO_2} + r_P \quad (2)$$

Si se divide a la primera ecuación por  $r_S$  se obtiene la siguiente ecuación:



Las relaciones de velocidades resultan ser los coeficientes estequiométricos de cada uno de los componentes participantes de la ecuación de crecimiento. Por convención toman la siguiente denominación:

$$\frac{r_N}{r_S} = a \quad \frac{r_{O_2}}{r_S} = b \quad \frac{r_X}{r_S} = y_{X/S} \quad \frac{r_P}{r_S} = y_{P/S} \quad \frac{r_{CO_2}}{r_S} = y_{CO_2/S} \quad \frac{r_H}{r_S} = Q \quad (4)$$

Los coeficientes correspondientes a los productos son las cantidades que se obtiene de cada uno de ellos cada vez que se consume un cmol de FCE y se los denomina rendimientos.

Para calcular los coeficientes estequiométricos de la ecuación de crecimiento se deben medir todas las variables del cultivo, biomasa, FCE, velocidad de consumo de  $O_2$  y de producción de  $CO_2$  y concentración de producto (si lo hubiera). El modo de cálculo de los rendimientos en cada sistema de cultivo se explican más adelante.

La composición macromolecular (cantidad y calidad de hidratos de carbono, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) de los diferentes microorganismos es muy variable. Incluso existe una gran variabilidad dentro de la misma especie en los diferentes estadios de crecimiento sin embargo, la composición elemental es altamente conservada<sup>1 2</sup>.

Analizando la composición elemental de una gran cantidad de microorganismos, tanto eucariotes como procariotes, se ha encontrado que existe una regularidad en su "fórmula mínima". Se puede definir un microorganismo estándar o promedio como aquel que posee la siguiente composición:  $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$ , siendo estos componentes el 95% en masa del microorganismo (el 5% restante son sales), esta fórmula estándar resulta de mucha utilidad cuando no se cuenta con información acerca de la composición exacta del microorganismo bajo estudio.

Si se consume un C-mol de FCE (12 g de carbono) y la fuente de nitrógeno no aporta carbono, por la ley de conservación de la materia deberá haber 12 g de carbono del lado de los productos. Si los rendimientos se expresan en carbono mol de biomasa,  $CO_2$  o producto por carbono mol de FCE, la suma de los rendimientos de biomasa,  $CO_2$  y producto debe ser igual a uno.

De un balance similar al anterior pero para los electrones surge que, en un cultivo aerobio, todos los electrones disponibles de la fuente de carbono y energía deben repartirse entre el  $O_2$ , la biomasa y los productos (si los hubiera). Para cuantificar la cantidad de electrones disponibles de una sustancia se define un parámetro llamado grado de reducción ( $\gamma$ )<sup>3</sup>. Este parámetro es igual a la cantidad de electrones que una sustancia puede entregar durante su combustión hasta un nivel de referencia dado, usualmente  $CO_2$ ,  $H_2O$  y  $NH_3$ , los que se toman como estado de referencia y como tal tienen un valor de  $\gamma$  igual a 0 ya que no tienen electrones disponibles. Mediante el uso de balances elementales se demuestra formalmente que para un cmol de cualquier sustancia genérica  $CH_aO_bN_c$ , el valor de  $\gamma$  (para la referencia antes mencionada) viene dado por:

$$\gamma = 4 + a - 2b - 3c. \quad (5)$$

Como ejemplo de estos parámetros la tabla I.4 muestra los valores de la fórmula molecular, fórmula del C-mol y  $\gamma$  de algunos compuestos usualmente relacionados con diferentes cultivos microbianos.

Compuesto	Fórmula molecular	C-mol	Peso de un c-mol	$\gamma^*$
ácido oxálico	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	CHO <sub>2</sub>	45	1
ácido fórmico	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	46	2
ácido acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> O	30	4
glucosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	CH <sub>2</sub> O	30	4
biomasa (estándar)	-----	CH <sub>1.8</sub> O <sub>0.5</sub> N <sub>0.2</sub>	25.8	4.2
glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	CH <sub>2.66</sub> <sup>o</sup>	30.66	4.67
etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	CH <sub>3</sub> O <sub>0.5</sub>	23	6
metanol	CH <sub>4</sub> O	CH <sub>4</sub> O	32	6
metano	CH <sub>4</sub>	CH <sub>4</sub>	16	8

\* Tomando como referencia H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>.

**Tabla I.4:** Fórmula molecular, fórmula mínima y valores de grado de reducción para algunos compuestos carbonados comunes.

Matemáticamente, estos dos balances quedan expresados como:

$$y_{X/S} + y_{CO_2/S} + y_{P/S} = 1 \quad \text{Balance de carbono} \quad (6)$$

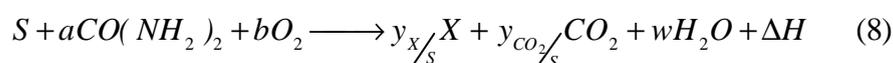
$$g_s - 4b = y_{X/S}g_x + y_{P/S}g_p$$

o, reordenando Balance de grado de reducción (7)

$$\frac{y_{X/S}g_x}{g_s} + \frac{y_{P/S}g_p}{g_s} + \frac{4b}{g_s} = 1$$

donde 4b son los electrones de la fuente de carbono que van a parar al O<sub>2</sub> para obtener energía a través de la cadena respiratoria. En caso de que la fuente de nitrógeno posea carbono, debe ser considerado dentro del balance correspondiente.

En el caso particular de *G. klebahnii* creciendo aeróbicamente con urea como fuente de nitrógeno y en condiciones en las que no genera producto, la ecuación estequiométrica se reduce a:



El balance de carbono resulta ser:

$$y_{X/S} + y_{CO_2/S} = 1 + a \quad (9)$$

En cuanto al balance de grado de reducción, no se ve alterado si se utiliza como nivel de referencia para el nitrógeno a la urea.

No toda la FCE que se consume se utiliza para la producción de biomasa o productos. En todos los cultivos de microorganismos existe una fracción de FCE que se degrada a fin de obtener energía para mantener a las células viables. Esta energía se

destina al recambio de proteínas, de m-RNA, en las bacterias gram positivas, al recambio de pared, a mantener gradientes de pH, electroquímicos u osmóticos y también se gasta en ciclos fútiles. A esta fracción de FCE se le llama energía de mantenimiento.

Para explicar este concepto es conveniente volver a la ecuación (1) e introducir en ella el postulado de Pirt <sup>4</sup> que dice que existe un cierto flujo de FCE, proporcional a la cantidad de biomasa, que se destina al mantenimiento celular

$$r_m = m_s \cdot X \quad (10)$$

donde  $r_m$  es la velocidad de consumo de FCE utilizada para el mantenimiento celular y  $m_s$ , es el coeficiente de mantenimiento celular, la cantidad, en gramos o cmol, que se consume de FCE por unidad de tiempo y de cantidad biomasa.

Si la ecuación 1 se desdobra en una que contenga al flujo de FCE destinado al crecimiento  $r_c$  y otra que incluya al flujo destinado al mantenimiento  $r_m$ , queda el siguiente sistema. Por simplicidad se considera que no hay formación de producto (aunque el tratamiento en ese caso es exactamente el mismo) y se omite el flujo de agua.

$$r_s = r_c + r_m \quad (11)$$



El rendimiento observado resulta, tal como se derivó de la ecuación 1, de dividir el flujo de biomasa por el flujo total de FCE.

$$y_{X/S} = \frac{r_X}{r_s} = \frac{r_X}{r_c + r_m} \quad (14)$$

Si se divide  $r_X$  por  $r_c$  se obtiene el valor del rendimiento verdadero  $y_{X/S}^{\max}$  que representa la cantidad de biomasa que se obtendría a partir de un carbono mol de FCE si no existiera mantenimiento.

$$y_{X/S}^{\max} = \frac{r_X}{r_c} \quad (15)$$

Si se invierte la ecuación 14 queda:

$$\frac{r_s}{r_X} = \frac{r_c}{r_X} + \frac{r_m}{r_X}$$

$$\text{Como } r_X = \mu X \quad \Rightarrow$$

$$\frac{1}{y_{X/S}} = \frac{1}{y_{X/S}^{\max}} + \frac{m_s}{\mu} \quad (16)$$

Reordenando la ecuación 16 se llega a:

$$r_s = \frac{r_x}{y_{x/s}^{\max}} + m_s X \quad (17)$$

La ecuación 17 se conoce como ecuación de Pirt.

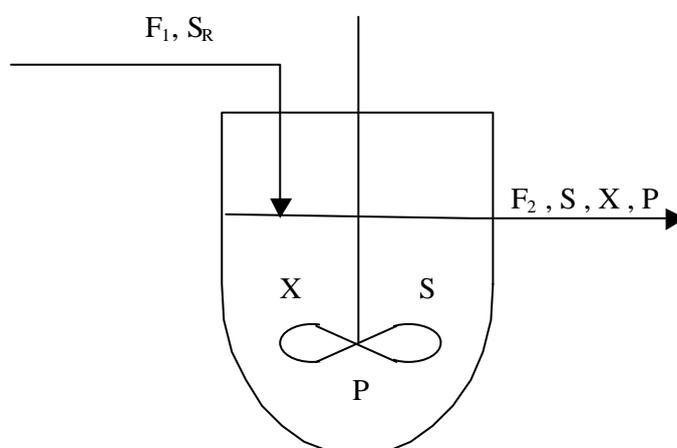
El rendimiento verdadero y el coeficiente de mantenimiento celular dependen principalmente del microorganismo pero también dependen en forma muy marcada del entorno en el cual debe crecer. Cuando el microorganismo crece en las condiciones óptimas de temperatura, pH y presión osmótica los valores de  $m_s$  se hacen mínimos y pueden aumentar más de diez veces cuando dichas condiciones se modifican. En la tabla II.4 se hace referencia a algunos datos bibliográficos que ilustran este comportamiento <sup>4</sup>  
5.

Microorganismo	FCE	FN	Condiciones de crecimiento	$m_s$ g <sub>s</sub> g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Triptofano	NH <sub>4</sub> Cl (2 g/L)	Anaeróbico	2.88
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Triptofano	NH <sub>4</sub> Cl (4 g/L)	Anaeróbico	3.69
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Glucosa	NH <sub>4</sub> Cl	Aeróbico	0.06
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa	NH <sub>4</sub> Cl	Aeróbico C.C. a D = 0.15	0.016
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa		Anaeróbico	0.036
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa		anaeróbico NaCl 1M	0.360
<i>Azotobacter vinelandii</i>		N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> disuelto 0.2 Atm	1.5
<i>Azotobacter vinelandii</i>		N <sub>2</sub>	o <sub>2</sub> disuelto 0.02 Atm	0.15
<i>Bacillus coagulans</i>	Glucosa	NH <sub>4</sub> Cl	C.C. D = 0.4 h <sup>-1</sup>	0.16

**Tabla II.4:** valores del coeficiente de mantenimiento para diferentes condiciones de cultivo.

### 4.1.3 Balances de materia en el biorreactor.

La figura 2.4 muestra un esquema general de un cultivo en un biorreactor. Se indica el flujo de entrada ( $F_1$ ) y salida ( $F_2$ ),  $S_R$  indica la concentración de FCE en el deposito de alimentación (puede ser el limitante o no),  $X$ ,  $S$  y  $P$  son las concentraciones de



**Figura 2.4:** Diagrama esquemático de un cultivo en biorreactor.

biomasa, FCE y producto respectivamente en el biorreactor y, si se acepta la hipótesis de mezclado perfecto, como la composición del reactor es homogénea, es también la concentración de dichas sustancias en el flujo de salida.

Dependiendo del sistema de cultivo que se use algunos de los flujos arriba mencionados pueden ser nulos. En un sistema batch,  $F_1$  y  $F_2$  son nulos y el sistema es cerrado para la fase líquida, en un sistema tipo batch alimentado,  $F_1$  es distinto de cero y  $F_2$  es nulo y en un sistema de cultivo continuo,  $F_1$  y  $F_2$  son iguales entre si y distintos de cero.

Para llevar a cabo un estudio cinético de un cultivo se realiza un balance para las diferentes propiedades de estado (biomasa, FCE, producto, etc) teniendo en cuenta para cada una de ellas la cantidad que entra, la que sale, la que se genera dentro del reactor y la que se consume dentro del mismo.

En forma general, matemáticamente dicho balance queda expresado como:

$$\frac{dAV}{dt} = F_1 A_r - F_2 A_e \pm V r_A \quad (18)$$

donde  $dAV/dt$  es la velocidad de acumulación de la propiedad extensiva A (como cantidad absoluta),  $F_1$  y  $F_2$  son los caudales de ingreso y egreso de medio al reactor en litros por hora,  $A_r$  y  $A_e$  son las concentraciones de A en la alimentación y en el reactor respectivamente, V es el volumen del reactor y  $r_A$  es la velocidad volumétrica de producción o consumo de A respectivamente. Si el mezclado es perfecto,  $A_r$  dentro del reactor y  $A_e$  en la corriente de salida, son iguales.

#### **Cultivos batch:**

Tal como se indicó anteriormente, en los cultivos en batch no entra ni sale medio de cultivo por lo que los flujos  $F_1$  y  $F_2$  son nulos y el volumen es constante durante todo el cultivo.

Para este caso en particular, los balances de materia quedan representados por:

$$\frac{dXV}{dt} = V r_x \quad \Rightarrow \quad \frac{dX}{dt} = r_x \quad (19)$$

$$\frac{dSV}{dt} = V r_s \quad \Rightarrow \quad \frac{dS}{dt} = r_s \quad (20)$$

Debido a que en este tipo de cultivos es imposible medir en forma precisa el valor de  $r_x$  y  $r_s$ , no pueden calcularse los rendimientos como una relación de velocidades, tal cual surge de la relación de flujos (ec 4). En los cultivos en batch se calculan los rendimientos globales, utilizando para el cálculo el valor integrado de cada una de las velocidades durante toda la fase de crecimiento.

Por las ecuaciones 19 y 20 resulta:

$$y_{x/s} = \frac{dx}{ds} \approx - \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

Análogamente

$$y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} \quad y_{CO_2/S} = -\frac{CO_{2(tot)}}{\Delta S} \quad b = \frac{O_{2(tot)}}{\Delta S}$$

Una vez calculados los rendimientos, los balances de carbono y grado de reducción se calculan tal cual se indica en las ec 6 y 7.

**Cultivos continuos.**

El cultivo continuo tiene la particularidad de que  $F_1$  y  $F_2$  son iguales entre si, por lo que el volumen permanece constante, luego:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{F_1 A_r}{V} - \frac{F_2 A_e}{V} \pm r_A$$

a la relación  $F/V$  , que es constante si  $F$  es constante, se la denomina velocidad de dilución ( $D$ ) y es una variable experimental muy importante en este tipo de cultivo. Tiene unidades de  $h^{-1}$ . A la inversa de  $D$  se la denomina tiempo de retención y equivale al tiempo que transcurre mientras fluye por el reactor un volumen de medio igual al volumen del cultivo.

En estado estacionario:

$$\frac{dA}{dt} = DA_r - D\tilde{A} \pm r_A = 0$$

para cualquiera de las variables extensivas del cultivo.

Para el caso particular de la biomasa ( $X$ ), no se incorpora con el medio ( $X_r = 0$ ) y sólo se produce dentro del reactor. La ecuación de balance para biomasa es:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= -DX + r_X = 0 \\ \text{si } r_X &= \mu X \Rightarrow \mu X - DX = 0 \Rightarrow \\ \mu X &= DX \Rightarrow \end{aligned}$$

$$\mu = D$$

Como  $\mu$  queda fijo a través del caudal de alimentación y no depende de los componentes del medio de cultivo o de los parámetros físicos del cultivo (pH, temperatura, etc.), se puede estudiar el efecto de cualquiera de estas variables (por ejemplo diferente fuente de carbono) con la seguridad de que un cambio observado en un parámetro determinado estará causado por dicho cambio y no a la variación que este cambio produce en la velocidad de crecimiento.

La ecuación de balance para el FCE toma la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= DS_r - D\tilde{S} - r_s = 0 \\ r_s &= D(S_r - \tilde{S}) \end{aligned}$$

Dado que en este tipo de cultivo tanto las velocidades volumétricas como las específicas pueden ser calculadas con gran exactitud, los rendimientos se calculan en función de ellas y no de las cantidades globales como en el batch. En este caso tendremos:

$$y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} \quad , \quad y_{CO_2/S} = \frac{r_{CO_2}}{r_S} \quad \text{o} \quad b = \frac{r_{O_2}}{r_S}$$

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Cepa.

Se utilizó en todos los caso el *Geotrichum klebahnii* (*G. klebahnii*) ATCC 42397. Como no se dispone de su composición elemental, se utilizó la propuesta por Dekkers y col <sup>6</sup> para *Sacharomyces cerevisiae* creciendo en un medio definido limitado en glucosa ( $\text{CH}_{1.83}\text{O}_{0.56}\text{N}_{0.17}$ ). Con esta composición, suponiendo un 5 % de sales, el peso del carbono mol de biomasa es de 26.45 y el grado de reducción con respecto a la urea es 4.2.

### 4.2.2 Mantenimiento de la cepa.

La cepa se conserva a  $-70^{\circ}\text{C}$  en glicerol al 15 % (V/V). Se repica en un medio de mantenimiento y se la mantiene bajo vaselina a  $4^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 6 meses. Este cultivo es el que se utiliza para sembrar todos los cultivos realizados tanto en batch como en cultivo continuo.

### 4.2.3 Medios de cultivo.

#### Medio de mantenimiento:

Componente	Concentración
Peptona de carne	5 g.L <sup>-1</sup>
Extracto de levadura	5 g.L <sup>-1</sup>
Glucosa	20 g.L <sup>-1</sup>
Agar	20 g.L <sup>-1</sup>
PH	5.0

#### Medio de referencia (MR):

Los trabajos reportados sobre cultivos de *G. klebahnii* por Sakai y col fueron realizados en un medio complejo, llamado por el autor GYP (20 g.L<sup>-1</sup> de glucosa, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona de carne y 5 g.L<sup>-1</sup> de extracto de levadura) <sup>7</sup>.

Los medios complejos poseen una serie de inconvenientes para el tipo de estudios que se quería realizar.

- Es muy engorroso estudiar su composición química y más difícil aun conocer su composición macromolecular. La naturaleza de los las peptonas y extracto de levadura cambia de una marca a otra e incluso de una partida a otra. Dado que no había reportado ningún medio sintético para el crecimiento de este microorganismo, se diseñó el utilizado como testigo siguiendo los lineamientos dados por Fiechter <sup>8</sup>. Este medio fue probado en cultivos batch y en sistema continuo (ver más adelante).

Componente	Concentración
Glucosa	5.0 g.L <sup>-1</sup>
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub>	1 g.L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.1 g.L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.6 g.L <sup>-1</sup>
Urea	0.6 g.L <sup>-1</sup>

Ac. Cítrico	0.45 g.L <sup>-1</sup>
Solución de cationes	1 mL.L <sup>-1</sup>
Solución de aniones	1 mL.L <sup>-1</sup>
Solución de vitaminas	1 mL.L <sup>-1</sup>
pH	5.0

Solución de Vitaminas *	
Ácido Fólico	6 mg.L <sup>-1</sup>
Inositol	6 mg.L <sup>-1</sup>
Biotina	6 mg.L <sup>-1</sup>
Pantotenato de Ca	0.80 g.L <sup>-1</sup>
Ácido p-amino benzoico	0.80 g.L <sup>-1</sup>
Riboflavina	0.80 g.L <sup>-1</sup>
Piridoxina	1.60 g.L <sup>-1</sup>

Solución de Aniones *	
Componente	Concentración
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.65 g.L <sup>-1</sup>
IK	0.1 g.L <sup>-1</sup>
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	0.1 g.L <sup>-1</sup>

Solución de Cationes *	
Acido cítrico	0.60 g.L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.15 g.L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	3.00 g.L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.00 g.L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15.0 g.L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.75 g.L <sup>-1</sup>
PH	1.5

(\*) Soluciones stock 1000X y agregadas al medio a razón de 1 mL.L<sup>-1</sup>, las vitaminas y la urea se esterilizan por filtración.

#### 4.2.4 Cultivos en batch

**Reactor:** para la realización de estos cultivos se utilizó un biorreactor LKB de 4 litros de capacidad, el cultivo se agitó a 500 RPM y se le suministró aire con un caudal de  $0,6 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ .

**Medida de oxígeno disuelto:** durante el cultivo se midió el nivel de  $\text{O}_2$  disuelto con un electrodo de tipo polarográfico (Ingold).

**Medida de gases:** los niveles de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  en el gas de salida del reactor se determinaron con un detector Servomex de tipo paramagnético y con un detector Horiba Pir 2000 con sensor infrarrojo respectivamente. Con estos datos y el valor del caudal de aire se determinaron las velocidades de consumo de  $\text{O}_2$  y producción de  $\text{CO}_2$ .

La velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  y producción de  $\text{CO}_2$  se determinan a través de un balance de materia sobre la fase gaseosa. Midiendo la composición del gas a la salida del reactor pueden calcularse las velocidades de consumo de  $\text{O}_2$  y producción de  $\text{CO}_2$  por medio de las siguientes ecuaciones.

$$r_{\text{O}_2} = -\frac{F \cdot 0.79}{V} \cdot \frac{T_0}{T \cdot 22.4} \cdot 60 \cdot \left( \frac{(\% \text{O}_2)_2}{100 - (\% \text{O}_2)_2 - (\% \text{CO}_2)_2} - \frac{(\% \text{O}_2)_1}{79} \right)$$

$$r_{\text{CO}_2} = \frac{F \cdot 0.79}{V} \cdot \frac{T_0}{T \cdot 22.4} \cdot 60 \cdot \left( \frac{(\% \text{CO}_2)_2}{100 - (\% \text{O}_2)_2 - (\% \text{CO}_2)_2} - \frac{(\% \text{CO}_2)_1}{79} \right)$$

En donde F es el caudal de alimentación de aire medido en litros por minuto, 0.79 es el porcentaje de nitrógeno en el aire, V es el volumen del cultivo en litros,  $T_0$  y T son 273 K y la temperatura de trabajo (la de los gases), 22.4 es el volumen ocupado por un mol de gas en condiciones normales de temperatura y presión.

En reactores grandes, de tipo industrial este valor de velocidad debiera estar corregido además de por la temperatura, por la diferencia de presión entre la que existe en la entrada de gases y 1 Atm (CNTP) ya que la altura de líquido sobre la entrada de gases suele ser apreciable y además es normal trabajar con una presión mayor de la atmosférica en el espacio cabeza del reactor. Sin embargo, para reactores pequeños como el usado en estas experiencias puede despreciarse dicha corrección. Los subíndices 1 y 2 representan porcentajes a la entrada y salida del reactor respectivamente. Las ecuaciones expresan la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  y producción de  $\text{CO}_2$  en moles por litro de cultivo y por hora.

La cantidad total de  $\text{O}_2$  consumido y  $\text{CO}_2$  producido durante el cultivo se calculan como la integral de la velocidad correspondiente en función del tiempo

$$\text{O}_2 \text{ total consumido} = \int_{t_0}^{t_f} r_{\text{O}_2} dt$$

$$\text{CO}_2 \text{ total producido} = \int_{t_0}^{t_f} r_{\text{CO}_2} dt$$

**Biomasa:** dado que el microorganismo no forma pellets compactos cuando se lo centrifuga, la determinación de peso seco no puede hacerse por centrifugación y debió

ser realizada por filtración en membrana de celulosa. El filtro utilizado fue de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro (E04WP04700, MSI, USA). La biomasa retenida se lavó y secó a peso constante a 80°C<sup>9</sup>.

**Determinación de fuente de carbono:** la glucosa se determinó por el método enzimático de glucosa oxidasa (Wiener lab. Argentina)<sup>10</sup>.

**Determinación de etanol:** El etanol fue determinado mediante el método enzimático de Boehringer Mannheim.

**Determinación de amonio:** El amonio se determinó mediante el método de azul de indofenol. Para tal fin se utilizó el Kit de Uremia (Wiener lab. Argentina).

**Medidas de pH:** Fue monitoreado con un electrodo de vidrio (Mettler Toledo)

Con todos estos datos, se realizaron los cálculos estequiométricos correspondientes. Para que los cultivos en el biorreactor fueran cinéticamente comparables a los cultivos en erlenmeyer (en los que se estudió ampliamente la expresión de la PGasa), se inocularon con una suspensión realizada a partir de cultivos en agar inclinado conservando la relación número de tubos / volumen de cultivo igual a los cultivos en erlenmeyers.

#### 4.2.5 Cultivos continuos

En esta serie de cultivos se utilizó como base el medio de referencia antes citado (MR) el cual está limitado en glucosa y en él se fueron variando los diferentes componentes o parámetros a estudiar. Las modificaciones realizadas al medio de referencia para adaptarlo a las demás limitaciones fueron las siguientes (los demás componentes en cada caso fueron los del MR):

a.- Limitado en fósforo:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.043 g L<sup>-1</sup>

b.- Limitado en nitrógeno: Urea 0.075 g L<sup>-1</sup>

c.- Limitado en vitaminas: Solución madre de vitaminas 0.01 mL L<sup>-1</sup>

Todos los cultivos se realizaron en un biorreactor Inceltech IH serie 210 de 1 L de volumen útil máximo, control automático de temperatura y pH y monitoreo de O<sub>2</sub> con electrodo polarográfico. El volumen del cultivo fue de 700 mL, la velocidad de dilución (D) utilizada fue de 0,2 h<sup>-1</sup>, salvo que se indique lo contrario, el pH se mantuvo en 5.0  $\pm$  0.1 por el agregado de solución 1,0 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o NaOH. En todos los continuos se determinó "on line" temperatura, pH, agitación y O<sub>2</sub> disuelto.

El comienzo de todos los cultivos fue similar. El biorreactor, conteniendo un litro de medio de cultivo, fue sembrado directamente de un agar inclinado. Una vez agotado el sustrato limitante se abre el tubo de rebalse con lo que el volumen disminuye a 700 ml (volumen de trabajo) y se comienza con la alimentación del medio correspondiente. Por regla general, aun en aquellos cultivos que se mantuvieron con una limitación distinta a la FCE, la alimentación con el medio correspondiente se comenzó en el momento en que el O<sub>2</sub> disuelto comenzó a aumentar, señal de que el batch ha alcanzado la fase estacionaria.

A fin de asegurar que se haya alcanzado el estado estacionario se dejó transcurrir alrededor de 10 tiempos de retención antes de tomar las muestras de cultivo para realizar las medidas correspondientes.

Para tomar la muestra correspondiente se recogió el efluente del biorreactor en un recipiente sobre hielo y esa muestra se fraccionó, 25 ml para medida de peso seco y el resto para determinaciones analíticas, actividad enzimática, FCE, etc. De cada estado estacionario se tomaron tres muestras separadas al menos 4 tiempos de retención entre

si.

Luego de cada cambio de condición de cultivo se dejó transcurrir al menos 10 tiempos de retención a fin de asegurar que se hubiera llegado a un nuevo estado estacionario.

Las medidas de pH, O<sub>2</sub> disuelto , gases a la salida, peso seco y FCE remanente se realizaron de igual forma que en los cultivos batch.

### 4.3 Resultados y discusión.

#### 4.3.1 Cultivos batch

La tabla III.4 muestra los datos del cultivo realizado en batch en el biorreactor LKB utilizando el medio de referencia. En este caso no se controló el pH (sólo se midió) ya que durante el cultivo la incorporación de urea no lo modifica y se quería verificar si aumentaba al agotarse la fuente de carbono.

Tiempo (Horas)	D.O.	pH	X (g · L <sup>-1</sup> )	S (g · L <sup>-1</sup> )	rO <sub>2</sub> mmol.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	rCO <sub>2</sub> mmol.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	CR mol CO <sub>2</sub> mol O <sub>2</sub>
0	0.03	5.44	0.01	4.94	0.263	0.290	1.103
2.5	0.032	5.48	0.01	4.74	0.467	0.309	0.662
4.5	0.047	5.51	0.01	4.47	0.676	0.329	0.487
6.5	0.101	5.53	0.01	4.92	0.801	0.416	0.519
8.5	0.153	5.48	0.01	4.82	0.443	1.010	2.280
10.5	0.206	5.50	0.04	4.49	0.878	1.021	1.163
12.5	0.348	5.53	0.01	4.29	0.669	1.032	1.543
14.5	0.573	5.64	0.02	4.12	1.491	1.564	1.049
17	0.995	5.69	0.22	3.85	2.585	2.852	1.103
18.5	1.27	5.62	0.28	3.57	3.162	3.388	1.071
21	2.2	5.69	0.86	2.28	6.154	6.454	1.049
23.5	5.1	5.78	1.89	0.94	15.171	15.691	1.034
25	7	6.19	2.52	0.03	3.929	5.361	1.364
26	7.32	6.6	2.44	0.03	3.461	3.616	1.045
27.5	7.2	6.95	2.39	0.01	0.935	1.706	1.825

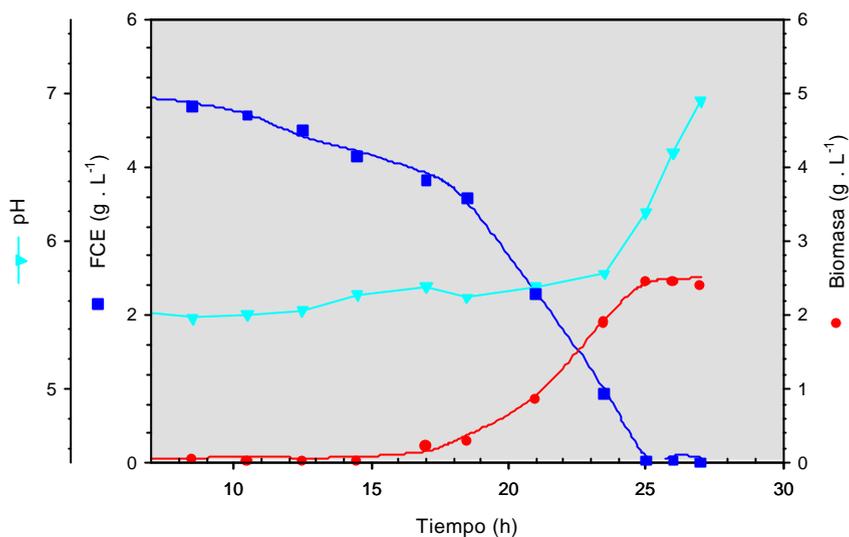
CR: Cociente respiratorio

**Tabla III.4:** Datos experimentales del cultivo de *G. klebahnii* con glucosa, urea y sales. 500 RPM y 0.6 L.min<sup>-1</sup> de aireación.

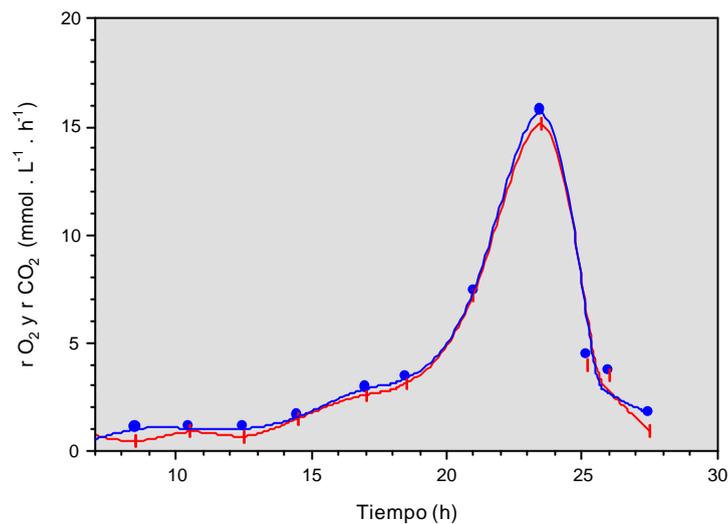
En los primeros datos, donde la biomasa es muy pequeña, los valores de r<sub>O<sub>2</sub></sub> y r<sub>CO<sub>2</sub></sub> son muy pequeños y los errores se magnifican por lo que el valor del cociente respiratorio (CR) está completamente alejado de la unidad.

En las figuras 3.4 y 4.4 se observa la curva de crecimiento de *G. klebahnii* sobre el medio de referencia así como las curvas de consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>. Debido a que *G. klebahnii* posee en estas condiciones una fase lag relativamente larga, se omiten los datos correspondientes a las primeras 7 horas de cultivo. Puede observarse que una vez agotada la fuente de carbono el pH del cultivo comienza a aumentar. Este efecto se debe a que la urea debe ser hidrolizada a amoníaco y dióxido de carbono para poder ser incorporada en la biomasa. Mientras hay fuente de carbono disponible el amoníaco es asimilado a la biomasa pero cuando se agota la fuente de carbono y se detiene el crecimiento, el amoníaco se libera al medio de cultivo, alcalinizándolo. El aumento de pH se corresponde con un aumento en la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el medio. Este comportamiento se corroboró experimentalmente.

De la curva de crecimiento se determinó un valor de μ<sub>max</sub> de 0,45 h<sup>-1</sup> (r<sup>2</sup> = 0.954), este valor es típico para el crecimiento de levaduras sobre monosacáridos <sup>11</sup>. Fiechter y col <sup>12</sup> reportan un valor de μ<sub>max</sub> de 0,40 h<sup>-1</sup> para *Trichosporom cutaneum* creciendo sobre glucosa como FCE.



**Figura 3.4:** Fuente de carbono, pH y curva de crecimiento de *G. klebahnii* creciendo en el medio de referencia.



**Figura 4.4:** velocidad de consumo de O<sub>2</sub> (♦) y de producción de CO<sub>2</sub> (●) en función del tiempo .

En la tabla IV.4 se indican las cantidades medida de cada una de las variables así como el valor de los rendimientos y de los balances correspondientes.

$\Delta S$ g.L <sup>-1</sup>	$\Delta X$ g.L <sup>-1</sup>	O <sub>2</sub> tot mM	CO <sub>2</sub> tot mM	$y_{x/s}$	$y_{CO_2/s}$	b	BC	B <sub>γ</sub>
4.93	2.38	78.828	84.691	0.549	0.504	0.480	1.053	1.056

**Tabla IV.4:** Análisis estequiométrico de una cultivo batch de *G. klebahnii* limitado en glucosa y con urea como FN. Los rendimientos están expresados en cmol.cmol<sup>-1</sup>.

Teniendo en cuenta el carbono de la urea (ec. 9) el valor esperado para el balance de carbono es 1.05. Estos resultados en los balances indican que en estas condiciones de crecimiento el microorganismo no genera ningún producto carbonado en cantidad mensurable. Datos semejantes han sido informados para *Trichosporom cutaneum*. Fiechter reporta un rendimiento de 0.55 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>, un cociente respiratorio cercano a uno durante todo el cultivo y ninguna formación de productos distintos de biomasa y dióxido de carbono<sup>12</sup>

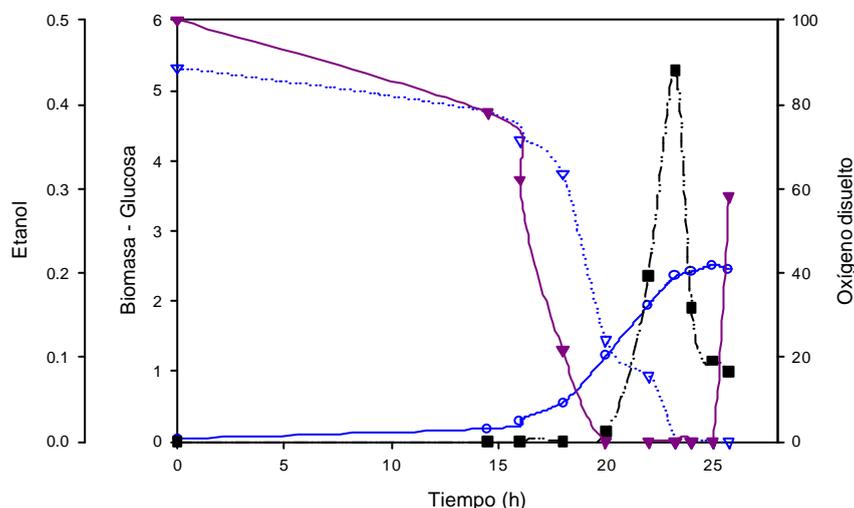
El cultivo realizado con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fuente de nitrógeno arrojó resultados similares en cuanto a rendimiento y cinética de producción de biomasa.

Creciendo a máxima velocidad, al final de la fase exponencial, en la salida de gases puede sentirse un aroma a ácido sulfhídrico, si el aire de salida se burbujea en una solución de acetato de plomo se observa un precipitado negro de sulfuro de plomo. Estos resultados indican que el microorganismo es reductor de sulfato.

*G. klebahnii* no puede crecer con nitrato como fuente de nitrógeno ya que cuando se reemplazó la urea por cantidad equivalente de NaNO<sub>3</sub> no se observó crecimiento.

Si los cultivos se limitan en O<sub>2</sub>, genera algún tipo de producto que posee aroma a manzana. Este producto no ha sido identificado por nosotros pero G. Pastore y col<sup>13</sup> han reportado la presencia de etil-isovalerato y etil-hexanoato así como etil-butarato y etil-propionato en cultivos de *Geotrichum sp.* Aunque los autores no lo mencionan en el trabajo, teniendo en cuenta las condiciones de cultivo, 50 g/l de glucosa en erlemeyers agitados, puede asegurarse que estuvieron limitados en O<sub>2</sub>. La cantidad de estos productos es mínima ya que no alteran los balances de carbono y grado de reducción.

A diferencia de *Trichosporom cutaneum*<sup>12</sup>, cuando *G. klebahnii* crece bajo limitación por O<sub>2</sub>, produce etanol (Fig 5.4).



**Figura 5.4:** Crecimiento  $\circ$ , consumo de glucosa  $\nabla$ , generación de etanol  $\blacksquare$  y O<sub>2</sub> disuelto  $\blacktriangledown$  en función del tiempo en un cultivo de *G. klebahnii* limitado en O<sub>2</sub>.

Se observa claramente que desde que el cultivo se limita en O<sub>2</sub> hasta que se agota la glucosa se produce etanol rápidamente, el cual es posteriormente metabolizado cuando se agota la glucosa.

En la tabla V.4 se resumen los datos del cultivo hasta el momento en que se acaba la

glucosa.

$\Delta S$ g.L <sup>-1</sup>	$\Delta X$ g.L <sup>-1</sup>	$\Delta P$ g.L <sup>-1</sup>	O <sub>2</sub> tot mM	CO <sub>2</sub> tot mM	$y_{X/S}$	$y_{CO_2/S}$	$y_{P/S}$	b	BC	B <sub>γ</sub>
5.32	2.31	0.45	66.77	68.54	0.504	0.386	0.11	0.376	1.00	1.07

**Tabla V.4:** Análisis estequiométrico de una cultivo batch de *G. klebahnii* limitado en O<sub>2</sub>. Glucosa como FCE y urea como FN. Los rendimientos están expresados en cmol.cmol<sup>-1</sup>.

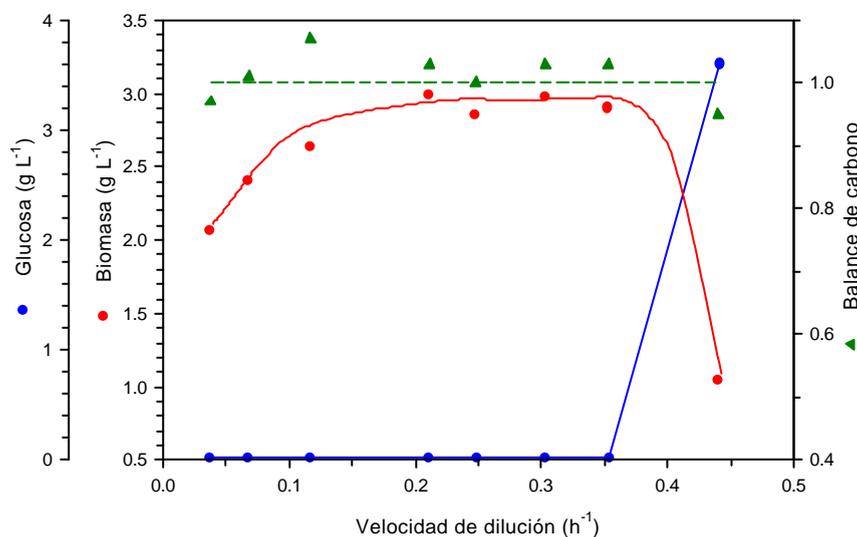
Los valores de los balances indican que no se genera ningún otro producto carbonado distinto del etanol que sea cuantitativamente significativo.

### 4.3.2 Cultivos continuos.

Para estudiar el comportamiento estequiométrico y cinético de *G. klebahnii* en cultivo continuo se utilizó el medio de referencia (glucosa limitante) y se modificó la velocidad de dilución entre valores de 0.04 y 0.44 h<sup>-1</sup>.

En cada valor de D, una vez alcanzado el estado estacionario, se determino el peso seco, los valores de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> a la salida del reactor y el nivel de FCE remanente. Con esos valores se determinaron los rendimientos correspondientes.

Los valores de biomasa, FCE y el balance de carbono en estado estacionario se muestran en la figura 6.4.



**Figura 6.4:** Crecimiento, FCE remanente y balance de carbono en cultivo continuo a diferentes valores de D con el MR.

La biomasa se mantiene relativamente constante mientras D se mantiene entre 0.1 y 0.35 h<sup>-1</sup>. Por fuera de estos límites la biomasa disminuye. La disminución en el peso seco a valores altos de D obedece al efecto de lavado causado por el incremento en la

concentración de FCE remanente, cuando  $D = \mu_{\max}$ , la concentración de biomasa se hace cero y el cultivo se lava. Para velocidades de dilución menores que  $0.35 \text{ h}^{-1}$  la concentración de glucosa fue siempre menor que  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , lo que es razonable ya que el medio MR se diseño limitado en FCE.

De todos modos, la limitación en FCE fue confirmada en forma independiente realizando un cultivo continuo a un  $D$  de 0.2 en el que se cambió la concentración de la FCE (sin modificar la concentración de los demás componentes del medio) de 5 a  $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  y se observó un cambio proporcional en la concentración de biomasa.

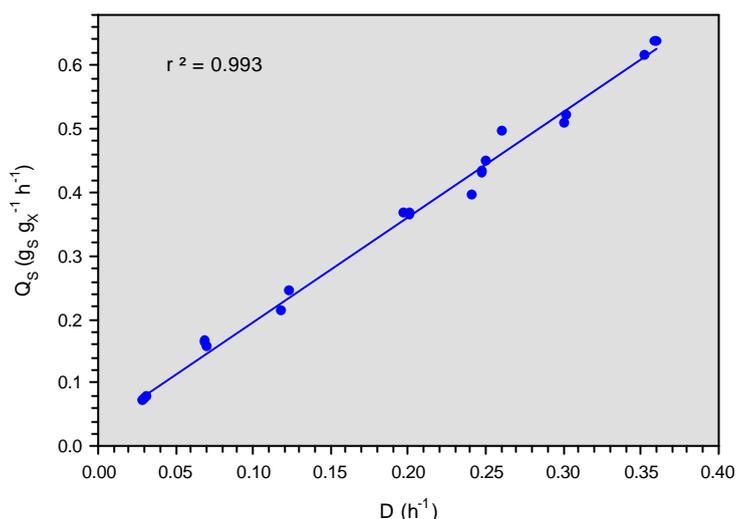
La disminución de biomasa que se observa a valores bajos de  $D$  se debe al efecto del mantenimiento celular.

Para todo el rango de  $D$  el balance de carbono es muy próximo a 1, indicando que no hay formación de producto más allá de biomasa y  $\text{CO}_2$ .

La ecuación de Pirt (Ec 17.4) puede expresarse en función de las velocidades específicas:

$$q_s = \frac{m}{y_{X/S}^{\max}} + m_s.$$

Para determinar los valores de  $y_{X/S}^{\max}$  y  $m_s$  se realiza una gráfica de  $q_s$  vs  $D$ . De la ordenada al origen se calcula el coeficiente de mantenimiento celular y la inversa de la pendiente es el rendimiento verdadero (Fig. 7.4).



**Figura 7.4:** velocidad específica de consumo de FCE en función de la velocidad de dilución. Cultivo continuo en MR.

Los valores obtenidos para el crecimiento de *G. klebahnii* sobre glucosa son:  $y_{X/S}^{\max} = 0.606 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $m_s = 0.0303 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  o, lo que es lo mismo,  $0.686 \text{ cmol} \cdot \text{cmol}^{-1}$  y  $0.0268 \text{ cmol} \cdot \text{cmol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Estos valores son del orden de los hallados para levaduras <sup>41</sup> e indican que *G. klebahnii* es sumamente eficiente en la utilización de la FCE.

El mismo planteo puede realizarse teniendo en cuenta el consumo de  $\text{O}_2$ . Si se considera que el  $\text{O}_2$  consumido durante el crecimiento se divide entre el que se usa para la síntesis de biomasa y el que se utiliza para el mantenimiento la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  puede dividirse en:

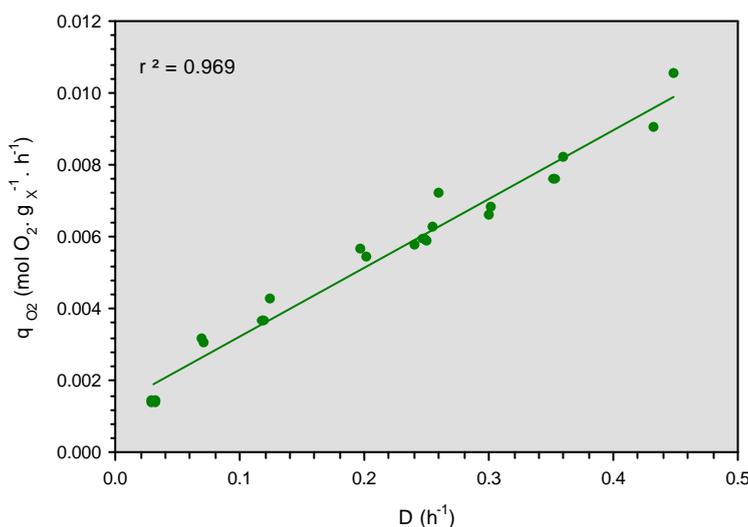
$$q_{O_2} = \frac{\mu}{y'_{X/O}} + m_o$$

Si se realiza un gráfico de  $q_{O_2}$  en función de  $\mu$ , puede determinarse el valor de  $y'_{X/O}$  y  $m_o$  (Fig 8.4).

Los valores hallados para  $y^{\max}_{X/O}$  y  $m_o$  son  $2.03 \text{ g}_X \cdot \text{mol}_{O_2}^{-1}$  y  $1.32 \cdot 10^{-3} \text{ mol}_{O_2} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  respectivamente ( $1.98 \text{ cmol}_X \cdot \text{mol}_{O_2}^{-1}$  y  $0.035 \text{ mol}_{O_2} \cdot \text{cmol}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Estos valores son comparables a los habitualmente hallados para levaduras y hongos <sup>1</sup>.

Obsérvese que el valor obtenido para  $m_o$  es sólo ligeramente superior a  $m_s$ , esto es razonable ya que ambos valores no son independientes sino que están relacionados mediante el balance de grado de reducción. Si se introduce dicho balance en la ecuación de Pirt y se reordena se llega a:

$$q_{O_2} = D \cdot \left( \frac{1}{y^{\max}_{X/S}} - \frac{g_X}{g_S} \right) \cdot \frac{g_S}{4} + m_s \cdot \frac{g_S}{4}$$



**Figura 8.4:** Velocidad específica de consumo de  $Q$  en función de la velocidad de dilución.

de donde se deduce que:

$$m_o = m_s \cdot \frac{g_S}{4} \quad \text{y} \quad \frac{1}{y'_{X/O}} = \left( \frac{1}{y^{\max}_{X/S}} - \frac{g_X}{g_S} \right) \frac{g_S}{4}$$

Los valores así calculados para  $m_o$  e  $Y_{X/O}$  son  $0.0303 \text{ cmol}_X \cdot \text{mol}_{O_2}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  y  $2.45 \text{ cmol}_X \cdot \text{mol}_{O_2}^{-1}$  (ver resultados experimentales más arriba). El hecho de que dos medidas absolutamente independientes entreguen valores similares refuerza la validez del modelo planteado.

Finalmente se determinó el valor de  $\mu_{\max}$  en las condiciones de crecimiento del

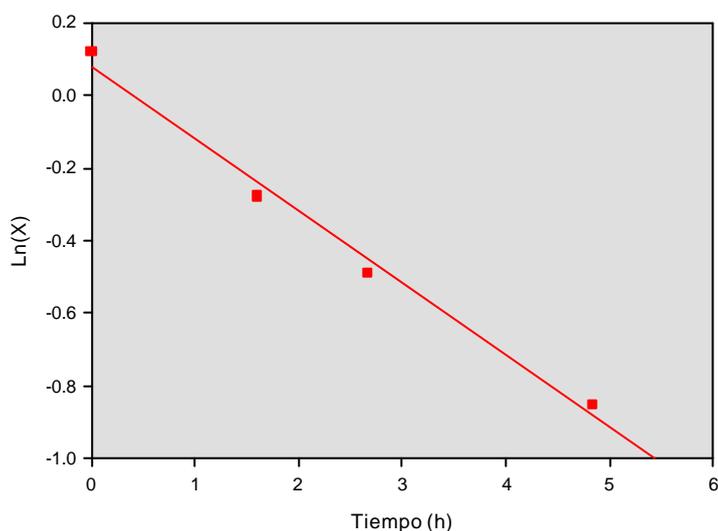
cultivo continuo en MR. Para ello se utilizó el método de lavado. En este método se aumenta el valor de la velocidad de dilución hasta un 50 o 100 % por encima del valor de  $\mu_{\max}$  estimado para el microorganismo. Al estar  $D$  por encima de  $\mu_{\max}$  el sistema no puede llegar a estado estacionario, por lo que se observa que

$$V \frac{dX}{dt} = V \cdot \mu \cdot X - F \cdot X < 0$$

y el cultivo se lava. Reordenando la ecuación anterior e integrando en ambos miembros, se llega a:

$$\ln(X) = \ln(X_0) + t \cdot (\mu_m - D)$$

De este modo, realizando un gráfico de  $\ln(x)$  en función del tiempo, de la pendiente puede calcularse el valor de  $\mu_{\max}$ . En este proceso, el valor de  $D$  se fijó en  $0.6 \text{ h}^{-1}$ . La figura 9.4 muestra los resultados obtenidos.



**Figura 9.4:** Perfil del lavado de un cultivo continuo de *G. klebahnii* a una velocidad de dilución de  $0.6 \text{ h}^{-1}$ .

De la experiencia anterior pudo determinarse un valor de  $\mu_{\max}$  de  $0.401 \text{ h}^{-1}$ , muy semejante al encontrado en batch lo cual es esperable ya que, a pesar de no ser las mismas condiciones de cultivo, el medio es el mismo en ambos casos.

Este resultado es menor que el hallado en la experiencia representada en la figura 6.4 en la cual hay un punto a un  $D = 0.45$ . Puede que el dato de la figura anterior no esté en estado estacionario. Cuando la diferencia entre  $D$  y  $\mu_{\max}$  es muy pequeña el tiempo que tarda el cultivo en lavarse puede ser muy largo y dos muestras sucesivas del mismo “estado estacionario” pueden dar valores similares de biomasa sin que en realidad el estado estacionario exista.

En la figura 10.4 se reproducen los valores experimentales de la figura 6.4 junto con el valor de biomasa y sustrato estacionario obtenidos por simulación suponiendo que *G.*

*klebahnii* obedece al modelo de Monod en el que la velocidad de crecimiento esta relacionada a la concentración de sustrato mediante la ecuación:

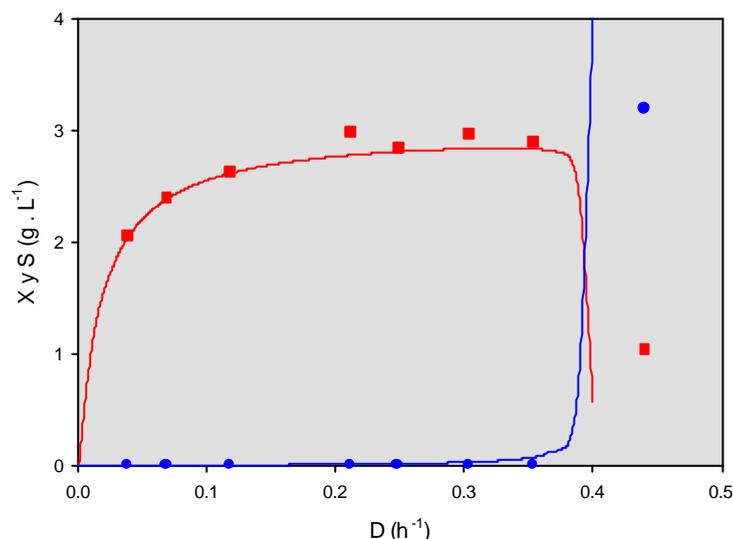
$$m = m_{\max} \frac{S}{K_S + S}$$

La simulación se realizó teniendo en cuenta además que la velocidad de consumo de sustrato obedece a la ecuación de Pirt:

$$r_s = \frac{r_x}{y_{x/s}^{\max}} + m_s X$$

Para el cálculo de los datos se utilizaron los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos anteriormente y se supuso una constante de afinidad para la glucosa ( $K_S$ ) igual a  $0.01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Dado que la determinación de  $K_S$  no era objetivo de este trabajo, las muestras de cultivo no se tomaron con los recaudos necesarios pero, como la curva estimada representa a los datos experimentales en forma altamente satisfactoria, puede suponerse que *G. klebahnii* posee una constante de afinidad por la glucosa del orden del que supuso para la simulación. Tal como se mencionó más arriba, el punto de  $D = 0.45$  probablemente no corresponde a un estado estacionario.



**Figura 10.4:** valores de S y X calculados en base a los coeficientes cinéticos y estequiométricos de *G. klebahnii*.  
 ■ Valores reales de biomasa, ● valores reales de FCE.

Como conclusión resulta que el crecimiento de *G. klebahnii* en el medio RM puede representarse satisfactoriamente mediante los siguientes parámetros:

$$\mu_{\max} = 0.401 \text{ h}^{-1} \quad K_S \approx 0.010 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \quad y_{x/s}^{\max} = 0.606 \text{ g}_x \cdot \text{g}_s^{-1} \quad m_s = 0.0303 \text{ g}_s \cdot \text{g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

#### 4.3.2.1 Efecto de otras limitaciones sobre el crecimiento de *G. klebahnii*.

Se estudió también la limitación en otros nutrientes distintos de la glucosa, los

valores de las velocidades específicas de consumo de glucosa y  $O_2$ , así como de producción de  $CO_2$  se muestran en la tabla VI.4. Se muestra asimismo los valores de los rendimientos obtenidos en cada caso y los valores obtenidos para los balances de carbono y grado de reducción.

Estos resultados sugieren que *G. klebahnii* no posee metabolismo de sobreflujo <sup>14</sup>, es decir, no produce productos carbonados distintos de biomasa y dióxido de carbono bajo limitaciones distintas de la fuente de carbono y energía. En este sentido, *G. klebahnii* se comporta como un microorganismo insensible a la glucosa <sup>15</sup>, es decir, la incorporación de glucosa se controla por la velocidad de crecimiento independientemente del sustrato que sea el limitante.

En la tabla también se observa que los rendimientos bajo limitación por glucosa y por urea son similares entre si pero que son significativamente menores en los cultivos limitados por fosfato o vitaminas ya que están separados por más de tres desviaciones estándar de los primeros. En el caso de la limitación por vitaminas una de ellas (del pool completo) es el verdadero sustrato limitante.

Ya que no hay productos formados aparte de biomasa y  $CO_2$  ( $BC = 1.050$ ) una explicación razonable para esta disminución en el  $y_{X/S}$  es que exista una reducción en la eficiencia de la utilización de la fuente de carbono. Esta disminución en la eficiencia puede deberse a:

- ◆ una eficiencia reducida en la síntesis de la biomasa (menor cantidad de biomasa que puede generarse con una determinada cantidad de ATP, es decir, un menor  $y_{X/ATP}$ ) o
- ◆ una disminución en la capacidad de obtener energía de la FCE en la cadena respiratoria. Esto se explicaría como una disminución de la relación P/O, es decir, el número de moles de ATP generados por atomogrammo de  $O_2$  consumido.

En el caso particular de la limitación por fósforo es muy probable que la disminución se deba a un déficit en la producción de energía ya que, aunque hay relativamente pocos estudios acerca de los requerimientos de aniones en los medios de cultivo, el  $H_2PO_4^-$  se reconoce desde hace tiempo como un metabolito crítico para el crecimiento celular <sup>16</sup> y para la glucólisis <sup>17</sup>. La limitación en  $H_2PO_4^-$  genera una marcada disminución en el rendimiento celular así como una alteración en la pared celular (a través de una alteración en el metabolismo de los lípidos) <sup>18 19</sup>.

Teniendo en cuenta que es medio de cultivo en todas las limitaciones es, cualitativamente, el mismo, es esperable que no haya variaciones en el valor de  $y_{X/ATP}$  y que sea la disminución en la eficiencia para generar energía la que genere la pérdida de rendimiento celular. Esta hipótesis será discutida más adelante.

### 4.3.3 Reconciliación de datos

Si se dispone del valor de los errores cometidos en cada determinación ( $\mu$ ,  $q_s$ ,  $q_{O_2}$  y  $q_{CO_2}$ ), bien por medidas propias de desviación estándar, bien por conocimiento de la analítica utilizada, pueden reconciliarse los valores obtenidos mediante un método relativamente sencillo descrito por Stephanopoulos <sup>20</sup> en su libro *Metabolic engineering*. En el anexo 1 se explica detalladamente este procedimiento.

Como puede verse los valores obtenidos mediante la reconciliación de datos no poseen una gran diferencia con respecto a los obtenidos con las medidas no tratadas (Tabla VII.4) de lo que se desprende que las medidas experimentales son muy confiables. El error más grande se encuentra siempre en la medida del porcentaje de  $O_2$ .

Sustrato limitante	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Glucosa en ee (g L <sup>-1</sup> )	qS	qO2	qCO2	Y <sub>X/S</sub>	Y <sub>CO2/S</sub>	b	B.C.	B.γ.
Glucosa	0.197 (1.4 10 <sup>-3</sup> )	0.015	0.300 (2.1 10 <sup>-3</sup> )	0.126 (5.3 10 <sup>-3</sup> )	0.123 (3.4 10 <sup>-3</sup> )	0.657 (0.007)	0.410 (0.012)	0.420 (0.018)	1.067	1.110
Urea	0.202 (1.2 10 <sup>-3</sup> )	2.83	0.324 (6.1 10 <sup>-3</sup> )	0.123 (6.5 10 <sup>-3</sup> )	0.150 (5.5 10 <sup>-3</sup> )	0.623 (0.012)	0.463 (0.019)	0.380 (0.021)	1.086	1.034
Fosfato	0.204 (1.1 10 <sup>-3</sup> )	2.81	0.345 (1.2 10 <sup>-3</sup> )	0.158 (4.6 10 <sup>-3</sup> )	0.161 (4.6 10 <sup>-3</sup> )	0.591 (0.004)	0.467 (0.013)	0.458 (0.013)	1.058	1.079
Vitaminas	0.207 (5.8 10 <sup>-4</sup> )	2.80	0.366 (1.3 10 <sup>-2</sup> )	0.180 (1.3 10 <sup>-3</sup> )	0.184 (1.5 10 <sup>-3</sup> )	0.566 (0.003)	0.503 (0.004)	0.492 (0.004)	1.068	1.086

**Tabla VI.4:** Efecto de distintas limitaciones nutricionales sobre el crecimiento de *G. klebahnii*. Datos obtenidos en cultivo continuo a D = 0.2 h<sup>-1</sup>. Las velocidades específicas se expresan en cmol . cmol<sup>-1</sup> . h<sup>-1</sup> y los rendimientos en cmol . cmol<sup>-1</sup>. Los valores entre paréntesis representan la desviación estándar de cada medida.

Sustrato limitante	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Glucosa en ee (g L <sup>-1</sup> )	qS	qO2	qCO2	Y <sub>X/S</sub>	Y <sub>CO2/S</sub>	b	B.C.	B.γ.
Glucosa	0.1951 (1.31 10 <sup>-3</sup> )	0.015	0.301 (1.75 10 <sup>-3</sup> )	0.0993 (1.94 10 <sup>-3</sup> )	0.126 (1.86 10 <sup>-3</sup> )	0.642 (0.006)	0.413 (0.007)	0.327 (0.007)	1.055	1.000
Urea	0.201 (1.19 10 <sup>-3</sup> )	2.83	0.331 (3.55 10 <sup>-3</sup> )	0.1194 (3.49 10 <sup>-3</sup> )	0.147 (3.47 10 <sup>-3</sup> )	0.607 (0.007)	0.443 (0.012)	0.361 (0.011)	1.050	0.998
Fosfato	0.203 (1.05 10 <sup>-3</sup> )	2.81	0.347 (1.13 10 <sup>-3</sup> )	0.1339 (1.49 10 <sup>-3</sup> )	0.161 (1.40 10 <sup>-3</sup> )	0.585 (0.004)	0.465 (0.004)	0.386 (0.004)	1.050	1.000
Vitaminas	0.186 (1.57 10 <sup>-3</sup> )	2.80	0.366 (1.26 10 <sup>-2</sup> )	0.1711 (1.02 10 <sup>-3</sup> )	0.196 (9.02 10 <sup>-4</sup> )	0.507 (0.005)	0.536 (0.003)	0.468 (0.003)	1.043	1.000

**Tabla VII.4:** Efecto de distintas limitaciones nutricionales sobre el crecimiento de *G. klebahnii*. Datos obtenidos en cultivo continuo a D = 0.2 h<sup>-1</sup>. (datos reconciliados según método descrito en el anexo 1)

Puede observarse, tal como se indica en el apéndice, que las desviaciones estándar de los valores estimados son menores a los de los datos crudos.

#### 4.3.4 Modelos metabólicos.

El modelo de caja negra utilizado hasta el momento no permite realizar un estudio detallado del metabolismo celular. A fin de conocer el destino de los diferentes nutrientes (especialmente la FCE) e intentar determinar los valores de  $Y_{X/ATP}$  y P/O se utilizó un modelo más complejo que incorpora datos del metabolismo del microorganismo. Esta metodología es conocida como Análisis de flujos metabólicos<sup>20</sup>.

Para poder realizar este tipo de análisis debe poseerse la mayor cantidad de información posible acerca del metabolismo del microorganismo a estudiar ya que su objetivo es calcular el flujo de materia a través de las diferentes reacciones metabólicas a partir de medidas experimentales aplicando balances de materia.

Operativamente se realizó una serie de cultivos batch en los que *G. klebahnii* creció durante un tiempo en forma completamente irrestricta y luego de un tiempo, limitado en  $O_2$ . De esta forma se consigue que aparezca un producto (etanol) en una de las fases de crecimiento (la limitada) y en la otra no.

En las reacciones químicas consideradas deben incluirse todos los reactivos que intervengan en ella (reactivos, productos, intermediarios energéticos, etc) con sus correspondientes coeficientes estequiométricos. Es aquí donde es de suma importancia el conocimiento teórico del sistema a estudiar.

Los datos en base a los cuales se realizan los cálculos son los flujos extracelulares tanto de sustratos como de metabolitos. Se considera que la velocidad neta de acumulación de metabolitos intracelulares (ATP, NADH, NADPH, etc) e intermediarios metabólicos es cero.

Lo primero que debe hacerse es separar al metabolismo a estudiar en tantas reacciones como haga falta, sin escribir reacciones de más, que agreguen complejidad al sistema sin aportar información útil.

El modelo metabólico propuesto para el crecimiento de *G. klebahnii* se basa en las siguientes suposiciones:

- *G. klebahnii* realiza glucólisis a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)
- Tal como ocurre en hongos<sup>21</sup> y en otras levaduras<sup>22 23</sup>, no existe una transhidrogenasa que interconvierta NADH y NADPH.
- El paso de Isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato en el ciclo de TCA (mitocondria) está catalizado por una enzima NADH dependiente. Por lo que *G. klebahnii* no puede obtener NADPH a través de esta paso tal cual lo hacen las bacterias.
- El NADPH se obtiene a partir de la ruta de las pentosas fosfato (PP) o a partir de una isocitrato deshidrogenasa citoplasmática que requiere del transporte de isocitrato del espacio mitocondrial al citoplasma.
- El NADH descargado en cadena respiratoria tiene un valor de P/O máximo posible de 3 si es de origen mitocondrial pero el generado en citoplasma no puede atravesar la membrana interna mitocondrial y debe ser transportado hacia el interior de la mitocondria mediante el sistema de lanzadera del glicerofosfato que transporta un par electrónico del NADH citoplasmático hasta un  $FADH_2$  mitocondrial. Este se descarga en la ubiquinona (UQ) a posteriori del centro I

por lo que sólo puede generar, a lo sumo 2 ATP<sup>24</sup>.

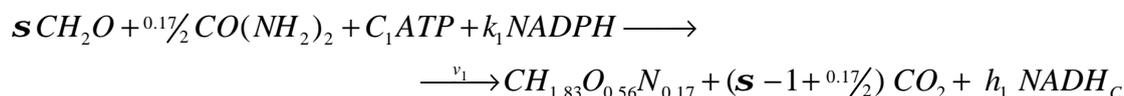
En base a estas condiciones se divide al metabolismo en dos, por un lado la síntesis de biomasa a partir de la FCE, ATP, FN y NADPH y por el otro, las reacciones pertenecientes al catabolismo en las que *G. klebahnii* obtiene poder reductor y energía consumiendo FCE y O<sub>2</sub> y produciendo etanol (cuando crece limitado en O<sub>2</sub>).

Los componentes que se incluyen para armar el modelo son: Glucosa (FCE), urea (FN), NADPH, biomasa (X), ATP, NADH (discriminando entre el producido en el citoplasma, NADH<sub>C</sub> y el producido en el espacio mitocondrial, NADH<sub>M</sub>), CO<sub>2</sub>, ácido pirúvico, etanol (P), FADH<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>.

El esquema del modelo utilizado se muestra en la figura 11.4

En base al esquema, el metabolismo puede representarse mediante las siguientes ecuaciones:

#### 1 Síntesis de biomasa



donde:

$\sigma$  es la cantidad de fuente de carbono (en carbono moles) necesario para generar un carbono mol de biomasa. En general, para levaduras es ligeramente mayor que 1 debido a la pérdida de carbono como CO<sub>2</sub> producido por decarboxilación durante la síntesis de aminoácidos.

$c_1$  y  $k_1$  son las cantidades de ATP y NADPH requeridas para la síntesis de un carbono mol de biomasa.  $C_1$  es, numéricamente, la inversa del  $y_{X/ATP}$ .

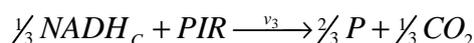
$h_1$  es la cantidad de poder reductor que se genera durante la síntesis de biomasa.

No se conocen los valores de  $\sigma$ ,  $h_1$  y  $k_1$  para *G. klebahnii* pero, como su metabolismo es similar al de levaduras, se consideraron los valores reportados por Bruinenberg y *col* para *Sacharomyces cerevisiae* creciendo en un medio sintético con glucosa como FCE y amonio como fuente de nitrógeno<sup>25</sup>. Los valores reportados son: 1.106, 0.3374 y 0.2326 respectivamente.

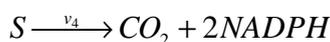
#### 2 Obtención de NADH<sub>C</sub>, ac. pirúvico y ATP a través de la ruta de EMP.

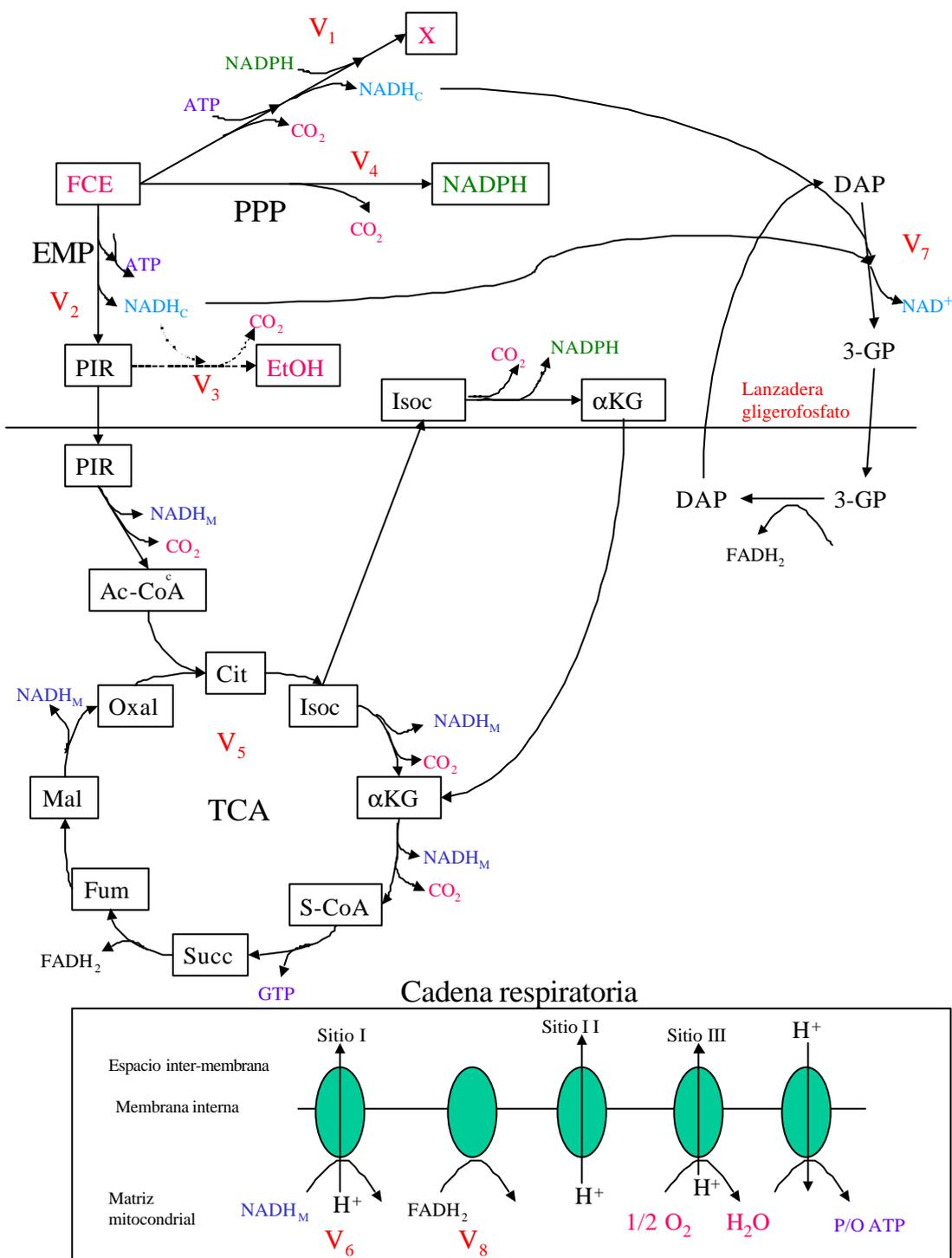


#### 3 Reoxidación del NADH<sub>C</sub> con formación de etanol (reacción que sólo ocurre en condiciones de limitación por O<sub>2</sub>)



#### 4 Obtención de NADPH a través de la ruta de PP (en su función oxidativa).





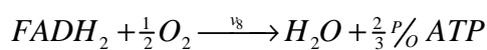
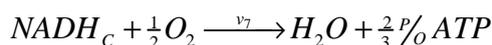
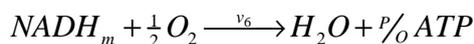
**Figura 11.4:** Esquema metabólico utilizado para el diseño del modelo descrito en la sección 3.4.3.  $V_1$  a  $V_8$  indican los flujos considerados.

5 Ingreso del ácido pirúvico en el ciclo de Krebs con formación de  $NADH_m$ ,  $NADPH$ ,  $FADH_2$  y  $ATP$ .



El parámetro  $\beta$  se define como la proporción de  $NADPH$  que se forma en PP y la que se forma por reducción de isocitrato fuera de la mitocondria <sup>25</sup>. Si  $\beta$  vale 1, todo el  $NADPH$  se obtiene en PP, si vale 0, en la ruta alternativa. Como por cada isocitrato que se reduce fuera de la mitocondria se produce un  $NADPH$  a expensas de un  $NADH$  que se hubiese formado en el TCA, la estequiometría de ambos metabolitos se ve afectada por  $\beta$ .

6, 7 y 8: Reoxidación del poder reductor en la cadena de citocromos con producción de  $ATP$ . La cantidad de  $ATP$  generada en la descarga de  $NADH_c$ ,  $NADH_m$  y  $FADH_2$  es diferente debido a que ingresan en la cadena a diferentes niveles por lo que debe plantearse una ecuación para cada uno.



$P/O$ , como ya se indicó, es la cantidad de  $ATP$  generado por cada par electrónico que pasa a través de la cadena de citocromos.

Una vez que se tiene armada la serie de reacciones que se desea considerar, se realiza un balance de materia en función de las velocidades para cada uno de los componentes involucrados en ellas.

Para ello se considera (por convención) como negativo a todo componente que se consuma y como positivo a todo aquel que se produzca. La suma algebraica de las velocidades producción o consumo de cada componente (resultante del producto entre el flujo a través de cada reacción ( $v_i$ ) y el coeficiente estequiométrico del componente en la misma) en todas las reacciones debe ser igual a la velocidad específica de formación o consumo de dicho componente. Por ejemplo, la biomasa sólo participa en la reacción 1 y su coeficiente estequiométrico es 1, por lo tanto

$$v_1 = \mu.$$

Si consideramos a la FCE, se gasta en la reacción 1 con un coeficiente  $\sigma$  y en la 2 y 4 con un coeficiente 1, entonces se observa que  $-\sigma \cdot v_1 - v_2 - v_4 = q_s$ . Si se realiza el mismo procedimiento para el resto de los 11 componentes se obtiene.

$$\begin{aligned}
 -\mathbf{S} \cdot v_1 - v_2 - v_4 &= q_S \\
 -c_1 \cdot v_1 + \frac{1}{3} \cdot v_2 + \frac{1}{3} \cdot v_5 + \frac{P}{O} \cdot v_6 + \frac{2}{3} \frac{P}{O} \cdot v_7 + \frac{2}{3} \frac{P}{O} \cdot v_8 &= q_{ATP} \\
 -k_1 \cdot v_1 + 2 \cdot v_4 + \left(\frac{1-b}{3}\right) \cdot v_5 &= q_{NADPH} \\
 v_1 &= \mathbf{m} \\
 (\mathbf{S} - 1 + \frac{0.17}{2}) \cdot v_1 + \frac{1}{3} \cdot v_3 + v_4 + v_5 &= q_{CO_2} \\
 h_1 \cdot v_1 + \frac{1}{3} \cdot v_2 - \frac{1}{3} \cdot v_3 - v_7 &= q_{NADH_c} \quad (a) \\
 \left(1 + \frac{b}{3}\right) \cdot v_5 - v_6 &= q_{NADH_m} \\
 v_2 - v_3 - v_5 &= q_{PIR} \\
 \frac{2}{3} \cdot v_3 &= q_P \\
 -\frac{1}{2} \cdot v_6 - \frac{1}{2} \cdot v_7 - \frac{1}{2} \cdot v_8 &= q_{O_2} \\
 \frac{1}{3} \cdot v_5 - v_8 &= q_{FADH_2}
 \end{aligned}$$

Vale recordar que las velocidades  $q_{NADH}$ ,  $q_{NADPH}$ ,  $q_{FADH_2}$ ,  $q_{PIR}$  y  $q_{ATP}$  son nulas ya que estos componentes celulares no se acumulan durante el crecimiento microbiano.

Una vez medidos los valores de las diferentes velocidades específicas, pueden estimarse los valores de  $v_1$  a  $v_8$ . Dado que se calculan a partir de una serie de ecuaciones lineales, la forma más sencilla de hacerlo es a través del cálculo matricial. Para ello debe definirse primero la matriz estequiométrica de tantas filas como componentes haya y tantas columnas como reacciones estén involucradas. Se completan las filas con todos los coeficientes estequiométricos (incluidos los nulos) para cada componente. En el ejemplo considerado la matriz resulta ser:

	$v_1$	$v_2$	$v_3$	$v_4$	$v_5$	$v_6$	$v_7$	$v_8$
$S$	$-\mathbf{s}$	-1	0	-1	0	0	0	0
$ATP$	$-c_1$	$\frac{1}{3}$	0	0	$\frac{1}{3}$	$\frac{P}{O}$	$\frac{2P}{3O}$	$\frac{2P}{3O}$
$NADPH$	$-k_1$	0	0	2	$\left(\frac{1-b}{3}\right)$	0	0	0
$Biomasa$	1	0	0	0	0	0	0	0
$CO_2$	$\mathbf{s} - 1 + \frac{0.17}{2}$	0	$\frac{1}{3}$	1	1	0	0	0
$NADH_c$	$h_1$	$\frac{1}{3}$	$-\frac{1}{3}$	0	0	0	-1	0
$NADH_m$	0	0	0	0	$\left(1 + \frac{b}{3}\right)$	-1	0	0
$PIR$	0	1	-1	0	-1	0	0	0
$P_{EtOH}$	0	0	$\frac{2}{3}$	0	0	0	0	0
$O_2$	0	0	0	0	0	$-\frac{1}{2}$	$-\frac{1}{2}$	$-\frac{1}{2}$
$FADH_2$	0	0	0	0	$\frac{1}{3}$	0	0	-1

Si se define al vector de los flujos ( $V$ ) y el de las velocidades específicas ( $Q$ ) como:

$$V = \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_8 \end{pmatrix} \quad Q = \begin{pmatrix} q_S \\ q_{ATP} \\ q_{NADPH} \\ \mu \\ q_{CO_2} \\ q_{NADH_C} \\ q_{NADH_m} \\ q_{PIR} \\ q_{EtOH} \\ q_{O_2} \\ q_{FADH_2} \end{pmatrix}$$

el sistema de ecuaciones (a) queda expresado como  $A \cdot V = Q$

Dado que hay más balances que incógnitas se puede estimar los valores de los flujos por un mecanismo de cuadrados mínimos lo que resulta en valores más confiables ya que se utilizan todos los valores experimentales y no sólo algunos. El número de grados de libertad es 3 tomando en cuenta todos los balances o 2 si se deja de lado el balance de ATP. El balance de ATP no es posible usarlo en estas condiciones ya que no se conocen ni  $Y_{X/ATP}$  ni la relación P/O y ambos parámetros aparecen sólo en esa ecuación.

La solución del sistema por cuadrados mínimos está dada por  $V = A^\# \cdot Q$ , donde  $A^\# = (A^T \cdot A)^{-1} \cdot A^T$ , es la matriz pseudoinversa de A.

Como esta experiencia se realizó en cultivos batch, las velocidades específicas de consumo se reemplazaron por cantidades globales consumidas o producidas en cada etapa. El tratamiento matemático es el mismo.

Los resultados experimentales se presentan en la tabla VIII.4 (todos los datos en  $\text{cmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Condición	$\Delta X$	$\Delta S$	$\Delta CO_2$	$\Delta O_2$	$\Delta P$
Sin limitación	0.321	-0.468	0.196	-0.166	0
Limitado en $O_2$	0.171	-0.803	0.227	-0.0793	0.327

**Tabla VIII.4:** Consumo de FCE y  $O_2$  y formación de biomasa  $CO_2$  y etanol en cada una de las fases del cultivo de *G. klebahnii*.

Durante las dos etapas del cultivo se forma diferente cantidad de biomasa lo que dificulta el análisis comparativo de los resultados. A fin se evitar este inconveniente, se normalizaron los valores obtenidos a 1  $\text{cmol}$  de biomasa. Los resultados así obtenidos se presentan en la tabla IX.4 (todos los datos en  $\text{cmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Condición	$\Delta X$	$\Delta S$	$\Delta CO_2$	$\Delta O_2$	$\Delta P$
Sin limitación	1	-1.459	0.610	-0.516	0
Limitado en $O_2$	1	-4.696	1.326	-0.464	1.912

**Tabla IX.4:** Consumo de FCE y  $O_2$  y formación de biomasa  $CO_2$  y etanol en cada una de las fases del cultivo de *G. klebahnii*. Valores normalizados a un  $\text{cmol}$  de biomasa

Resolviendo el sistema de ecuaciones para ambas condiciones de crecimiento se obtienen los valores de los 8 flujos. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla X.4.

Limitado	$v_1$	$v_2$	$v_3$	$v_4$	$v_5$	$v_6$	$v_7$	$v_8$
Sin limitación	1	0.28	-0.036	0.112	0.329	0.447	0.451	0.118
Limitado	1	3.001	2.742	0.104	0.154	0.23	0.448	0.076

**Tabla X.4:** Flujo a través de las reacciones del esquema metabólico de la figura 10 sin y con limitación por  $O_2$ .

Se observa claramente que las velocidades de reacción sufren drásticos cambios cuando las condiciones de cultivo son cambiados. El consumo de sustrato para la obtención de energía ( $v_2$ ) aumenta enormemente debido a la menor eficiencia de las rutas fermentativas.

El valor esperado de  $v_3$  en condiciones sin limitación es cero, el modelo arroja un valor muy próximo a éste. Debe tenerse en cuenta que el cálculo de los distintos  $v$  se hizo por cuadrados mínimos y no corresponden a una solución exacta del sistema. En contraposición cuando el cultivo se encuentra limitado en  $O_2$  se observa que la velocidad de producción de etanol toma valores considerables.

La ruta de las PP ( $v_4$ ) no sufre mayores cambios en las dos condiciones. Este resultado es esperable ya que el poder NADPH obtenido en esta ruta se utiliza principalmente para la generación de biomasa por lo que resulta estar directamente relacionada con  $v_1$ . Para el cálculo se consideró un valor de  $\beta$  de 1. Si el valor de  $\beta$  se varía a valores tan bajos como 0.5, los resultados no se modifican mayormente ( $v_4$  toma valores de 0.107 y 0.102 en condiciones sin y con limitación respectivamente).

Las velocidades  $v_5$ ,  $v_6$  y  $v_8$  (ciclo de los ácidos tricarbónicos y descarga del poder reductor mitocondrial en cadena respiratoria) en la fase limitada disminuyen aproximadamente a un 50 % del valor hallado en la etapa sin limitación. Estos tres flujos están directamente relacionados con el consumo de  $O_2$  y por ende, a la transferencia desde la fase gaseosa. Debido a la mayor eficiencia en la obtención de energía por las rutas aeróbicas con respecto a las fermentativas, el cambio observado en  $v_5$ ,  $v_6$  y  $v_8$  producen un cambio mucho mayor, en proporción, sobre  $v_2$  y  $v_3$  (efecto Pasteur).

La descarga de  $NADH_C$  en la cadena de citocromos  $v_7$  no se ve alterado ya que el incremento en la producción de  $NADH_C$  debido al aumento de  $v_2$  se ve compensado por el incremento en su consumo a través de  $v_3$ .

Si se utilizan las velocidades calculadas para estimar los valores experimentales (a través del producto matricial  $A \cdot V = Q$ , resultan valores muy aproximados a los reales (Tabla XI.4) lo que demuestra que el modelo es aceptable. Sin embargo cuando se intentó utilizar el balance de ATP para calcular  $C_1$  y P/O, se obtuvieron valores

Condición	$\Delta X$	$\Delta S$	$\Delta CO_2$	$\Delta O_2$	$\Delta P$
Sin limitación	0.316	-0.473	0.196	-0.16	$7.5 \cdot 10^{-3}$
Limitado en $O_2$	0.186	-0.785	0.254	-0.07	0.341

**Tabla XI.4:** estimados de los valores experimentales calculados a partir de los flujos a través de las distintas rutas metabólicas del modelo.

completamente alejados de la realidad, valores de  $y_{X/ATP}$  mayores que el máximo teórico ( $1.2 \text{ cmol}_X \cdot \text{mol}_{ATP}^{-1}$ ) y valores de P/O mayores que 3. Esta falla en el modelo puede deberse a la presencia de algún producto no tenido en cuenta cuya concentración no sea lo suficientemente alta como para alterar los balances en forma muy marcada pero que modifique en cierto grado las ecuaciones de balance utilizadas.

El mismo modelo de crecimiento se aplicó a los cultivos continuos con diferentes limitaciones, en este fue eliminada la ecuación de formación de etanol debido a que los cultivos nunca sufrieron limitación por  $O_2$ . En este caso se trabajó directamente con los valores de las  $q$  correspondientes (Tabla VI.4). Al igual que con el modelo con producción de etanol, no se observaron diferencias significativas cuando se modificó el valor de  $\beta$  por lo que se mantuvo su valor constante en 1

Los valores obtenidos para las velocidades bajo las cuatro limitaciones se presentan en la Tabla XII.4.

Limitación	$v_1$	$v_2$	$v_4$	$v_5$	$v_6$	$v_7$	$v_8$
Glucosa	0.192	0.072	0.019	0.074	0.105	0.094	0.030
Urea	0.199	0.084	0.023	0.087	0.117	0.096	0.030
Fósforo	0.200	0.106	0.021	0.108	0.149	0.108	0.041
Vitaminas	0.202	0.127	0.021	0.130	0.178	0.115	0.048

**Tabla XII.4:** Distribución de flujos de *G. klebahnii* creciendo en cultivo continuo ( $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ ) bajo distintas limitaciones.

Puede verse claramente que en el caso de las limitaciones por fósforo y vitaminas el flujo a través de las reacciones de obtención de energía ( $v_2$  y  $v_5$  a  $v_8$ ) es mayor, lo que indica una menor eficiencia en la obtención de energía (a través de la relación P/O), o en su utilización para generar biomasa (un valor alto de  $C_1$ ). El hecho de no conocer ninguno de los dos valores, no permite diferenciar cual de los dos es el que produce la variación en los flujos. Sin embargo como los medios de cultivo poseen en todos los casos los mismos constituyentes es esperable que la biomasa se haya sintetizado siempre desde los mismos componentes precursores. Por esta razón, sumado a que los cultivos se realizaron todos a igual  $D$  (mismo mantenimiento), es esperable que el  $y_{X/ATP}$  sea el mismo en todos los casos. Si esto es así, la explicación más factible para la disminución en el  $y_{X/S}$  es que haya una disminución en la eficiencia energética.

Si se despeja la relación P/O del balance de ATP resulta:

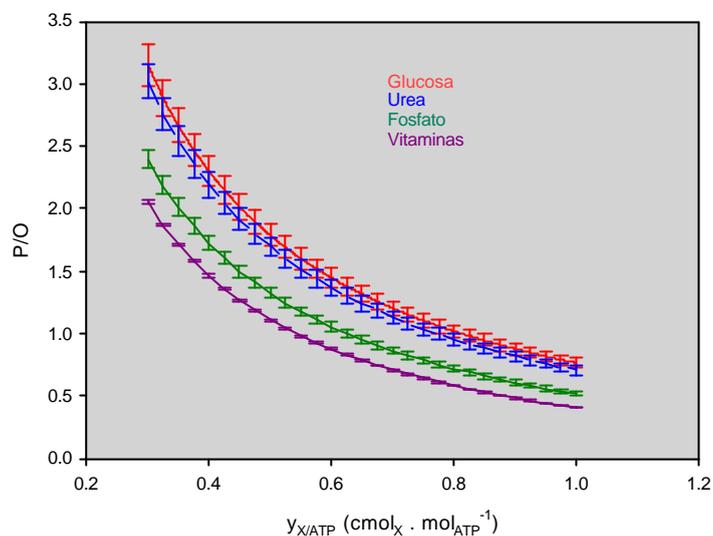
$$P/O = \frac{v_1 / y_{X/ATP} - \frac{1}{3} \cdot (v_2 + v_5)}{v_6 + \frac{2}{3} \cdot (v_7 + v_8)}$$

Utilizando al valor de  $y_{X/ATP}$  como variable se puede calcular el valor de la relación P/O para diferentes valores de  $y_{X/ATP}$ . Los resultados para las cuatro limitaciones se muestran en la figura 12.4.

Como puede observarse, cualquiera sea el valor de  $y_{X/ATP}$ , la relación P/O en los cultivos limitados en FCE y en urea son prácticamente iguales y mayores a los observados en los cultivos limitados en fósforo o vitaminas. Las barras de error fueron calculadas en base a los errores experimentales de cada variable.

En un metabolismo completamente oxidativo, la cantidad de ATP producido en la cadena respiratoria es proporcional al  $O_2$  consumido, es por eso que el consumo de  $O_2$

puede ser utilizado como una medida del requerimiento de energía para la síntesis de biomasa <sup>26</sup>. En la tabla VI.4 se observa que los valores de  $q_{O_2}$  obtenidos en las limitaciones por fosfato y vitaminas son mayores que los que se observan bajo limitación de carbono o nitrógeno.



**Figura 12.4:** Valores de la relación P/O en cuatro limitaciones diferentes en función del  $y_{X/ATP}$  ( $\text{cmol} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

Estos datos concuerdan con los observados en la figura 12.4 en relación a la relación P/O. Ha sido reportado que levaduras creciendo en cultivo continuo limitado en sulfato pierden uno de los sitios de fosforilación de la cadena respiratoria <sup>4</sup>. No es posible determinar, con la información que surge de estos experimentos, si este ha sido el caso, de todos modos si resulta claro que la limitación por fósforo o vitaminas disminuye el grado de acoplamiento.

### 4.4. Anexo 1:

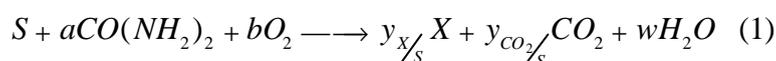
#### Análisis de consistencia de datos <sup>20</sup>

El análisis de consistencia de datos del modelo de caja negra permite corregir los valores de velocidades específicas de consumo y producción de sustratos, biomasa y metabolitos durante el crecimiento en cultivo continuo.

Se basa en la realización de los mismos balances elementales vistos hasta ahora pero teniendo en cuenta las desviaciones estándar de las medidas experimentales.

---

Para ejemplificar este procedimiento se utilizará el crecimiento aeróbico de *G. klebahnii* sobre glucosa y Urea (U) limitado en vitaminas (tabla IV.4 y V.4). La ecuación de crecimiento puede ser representada como:



En el modelo de caja negra, se dispone de P+N+1 variables: P coeficientes estequiométricos para los productos metabólicos, N para los sustratos y 1 para la biomasa. Como debe cumplirse el balance de materia para todos los elementos involucrados en reactivos y productos, estas variables no son independientes sino que están sujetas a ciertas restricciones. Cada balance elemental plantea una restricción para las variables.

Los balances elementales pueden ser convenientemente representados escribiendo las composiciones elementales de sustratos y productos en una matriz E, en nuestro caso:

$$E = \begin{matrix} & \begin{matrix} X & CO_2 & H_2O & S & O_2 & U \end{matrix} \\ \begin{pmatrix} 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ 1.83 & 0 & 2 & 2 & 0 & 4 \\ 0.56 & 2 & 1 & 1 & 2 & 1 \\ 0.17 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 \end{pmatrix} & \begin{matrix} C \\ H \\ O \\ N \end{matrix} \end{matrix} \quad (2)$$

En general se consideran los cuatro elementos principales (CHON), aunque pueden agregarse tantos como sea necesario, por lo que la matriz resulta tener cuatro filas. Con la matriz elemental planteada de esta forma, los balances elementales pueden calcularse a partir de la operación matricial:

$$E \cdot q = 0 \quad (3)$$

donde q es el vector de las velocidades específicas:

$$q = (\mu, q_{CO_2}, q_{H_2O}, q_S, q_{O_2}, q_U)^T$$


---

Con N+P+1 velocidades específicas e I restricciones el numero de grados de libertad es  $F = N+P+1-I$ . Si se miden experimentalmente F variables es posible calcular las restantes mediante las ecuaciones de balance pero en este caso, al no existir redundancia en las medidas, no es posible realizar un análisis de consistencia de las

mediciones. Para poder realizar un análisis de este tipo se deben medir más variables que grados de libertad.

De los balances elementales que resultan del producto E.q, uno de ellos debe usarse para calcular la velocidad de producción de H<sub>2</sub>O ya que es imposible medir este metabolito en medios líquidos. Con el resto puede analizarse la bondad de los datos experimentales.

Una forma más efectiva de utilizar los datos se basa en el uso simultáneo de todos los balances tanto para calcular las velocidades no medidas como para el análisis de consistencia de datos.

Para realizar esta operación deben dividirse la matriz elemental E y el vector de las velocidades q en dos, una de las variables medidas (M, q<sub>m</sub>) y otra de las que deben calcularse (C, q<sub>c</sub>). En este caso el producto E.q = 0 se transforma ahora en M . q<sub>m</sub> + C . q<sub>c</sub> = 0. Si se hubieran medido F variables, habría ecuaciones redundantes suficientes sólo para calcular las velocidades no medidas y C sería una matriz cuadrada de dimensiones I x I, el número de restricciones o de balances.

En este caso, las velocidades no medidas (q<sub>c</sub>) pueden calcularse como:

$$q_c = -C^{-1} \cdot M \cdot q_m \quad (4)$$

Si hubieran más velocidades medidas que grados de libertad puede usarse la aproximación por cuadrados mínimos para el cálculo de las velocidades faltantes con lo que se obtienen mejores estimados de las mismas.

En esta situación la matriz C no es cuadrada por lo que no puede obtenerse su inversa para el calculo de q<sub>c</sub>. En este caso se calcula la matriz pseudoinversa  $C^\# = (C^T \cdot C)^{-1} C^T$  y se utilizar para el calculo de q<sub>c</sub> como  $q_c = C^\# \cdot M \cdot q_m$ .

En sistemas sobredeterminados (número de variables medidas mayor que F) una vez calculadas las velocidades se pueden utilizar los balances remanentes para verificar la consistencia de datos tanto de las variables medidas como de las estimadas. Para ello debe calcularse la matriz de redundancia R definida como:

$$R = M - C \cdot (C^T \cdot C)^{-1} C^T \cdot M \quad (5)$$

El rango de R indica el número de ecuaciones independientes que deben ser satisfechas por las velocidades (medidas y calculadas) y por lo tanto, R tiene I – (rango R) filas dependientes. Si se eliminan las filas dependientes se obtiene la matriz de redundancia reducida R<sub>r</sub>.

Volviendo al ejemplo: Si se miden μ, q<sub>s</sub>, q<sub>O2</sub> y q<sub>CO2</sub>, se obtienen las siguientes matrices.

$$M = \begin{pmatrix} s & O_2 & CO_2 & X \\ 1 & 0 & 1 & 1 \\ 2 & 0 & 0 & 1.83 \\ 1 & 2 & 2 & 0.56 \\ 0 & 0 & 0 & 0.17 \end{pmatrix}; \quad C = \begin{pmatrix} U & H_2O \\ 1 & 0 \\ 4 & 2 \\ 1 & 1 \\ 2 & 0 \end{pmatrix} \begin{matrix} C \\ H \\ O \\ N \end{matrix} \quad (6)$$

Las cuatro columnas de M corresponden a glucosa, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y biomasa y las dos de C

corresponden a urea y agua. Las filas de ambas matrices representan los cuatro balances elementales. Como el sistema tiene seis componentes y cuatro restricciones, posee dos grados de libertad. Como se miden cuatro variables, el sistema esta sobredeterminado.

Si se calcula la matriz de redundancia se obtiene:

$$R = \begin{pmatrix} 0.828 & 0.276 & 1.103 & 0.72 \\ -0.069 & -0.690 & -0.759 & 0.03 \\ 0.138 & 1.380 & 1.517 & -0.06 \\ -0.345 & 0.551 & 0.207 & -0.39 \end{pmatrix} \quad (7)$$

la cual tiene un rango de 2 ya que la tercera y la cuarta filas son combinaciones lineales de las dos primeras. Eliminadas las dos últimas filas se obtiene la matriz de redundancia reducida  $R_r$ :<sup>27</sup>

$$R_r = \begin{pmatrix} 0.8276 & 0.2759 & 1.1034 & 0.72 \\ -0.069 & -0.6897 & -0.7586 & 0.03 \end{pmatrix} \quad (8)$$

Multiplicando  $R_r$  por el vector  $q_m$  se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$R_r \cdot q_m = \begin{pmatrix} 0.8672 \cdot q_s + 0.2759 \cdot q_{o_2} + 1.1034 \cdot q_{co_2} + 0.72 \cdot m \\ 0.069 \cdot q_s - 0.6897 \cdot q_{o_2} - 0.7586 \cdot q_{co_2} + 0.03 \cdot m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (9)$$

ambas filas terminan siendo una combinación lineal de todos los balances elementales.

Habitualmente las medidas experimentales están siempre asociadas a un error, tanto aleatorio (ruido) como sistemático. Como consecuencia de dicho error el producto  $R \cdot q_m = 0$  no es, en general, exacto.

Es posible que existan ciertos residuos distintos de cero cuando se multiplica el vector de las velocidades medidas por la matriz de redundancia reducida. Esta diferencia puede ser expresada teniendo en cuenta que el vector de las velocidades medidas  $\overline{q_m}$  es igual a la suma entre el vector de las velocidades verdaderas  $q_m$  y el vector de los errores de cada medida  $\delta$ .

$$\overline{q_m} = q_m + d \quad (10)$$

combinando esta suma con el producto  $R_r \cdot q_m = 0$  se obtiene el vector de los residuos para cada velocidad  $\epsilon$ .

$$e = R_r \cdot \overline{q_m} = R_r \cdot (q_m + d) = R_r \cdot d \quad (11)$$

Dado que siempre existe cierto ruido en las medidas, el mejor juego de ellas es aquel que minimiza el valor de  $\epsilon$  y se determina de la siguiente manera. Si se asume que los errores están distribuidos en forma normal con una media igual a cero y una matriz varianza-covarianza F:

$$E(\mathbf{d}) = 0$$

$$F = E \left[ (\bar{q}_m - q_m) \cdot (\bar{q}_m - q_m)^T \right] = E(\mathbf{d}\mathbf{d}^T) \quad (12)$$

donde E es el operador de los valores esperados. Se puede demostrar que los residuos también se distribuyen con una distribución normal alrededor de cero.

$$E(\mathbf{e}) = R_r \cdot E(\mathbf{d}) = 0 \quad (13)$$

la matriz de varianza covarianza de los residuos está dada por:

$$P = E(\mathbf{e}\mathbf{e}^T) = R_r E(\mathbf{d}\mathbf{d}^T) R_r^T = R_r F R_r^T \quad (14)$$

El estimador de mínima varianza del vector de los errores  $\delta$  se obtiene minimizando la suma de cuadrados de los errores normalizados según su varianza:

$$\min_{\mathbf{d}} (\mathbf{d}^T F^{-1} \mathbf{d}) \quad (15)$$

La solución está dada por:

$$\hat{\mathbf{d}} = F R_r^T P^{-1} \mathbf{e} = F R_r^T P^{-1} R_r q_m \quad (16)$$

donde el circunflejo indica que es un estimado de  $\delta$ . El mejor estimado para las velocidades medidas se obtiene a partir de la ec. 16 con :

$$\hat{q}_m = \bar{q}_m - \hat{\mathbf{d}} = (I - F R_r^T P^{-1} R_r) q_m \quad (17)$$

donde I es la matriz identidad. Los valores estimados a través de la ecuación 17 tienen menores desviaciones que los valores crudos <sup>28</sup>. Los estimados calculados de esta forma pueden ser usados luego para calcular las velocidades no medidas.

---

Volviendo al ejemplo de *G. klebahnii*, se había calculado la matriz de redundancia reducida los valores medidos de glucosa, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y biomasa están dados por:

$$r_m = \begin{pmatrix} -q_s \\ -q_{O_2} \\ q_{CO_2} \\ \mathbf{m} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -0.366 \\ -0.180 \\ 0.184 \\ 0.207 \end{pmatrix} \quad (18)$$

donde todas las velocidades están expresadas en  $\text{cmol} \cdot \text{cmol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Para calcular los mejores estimados debe conocerse el error de las medidas independientes. Si se asume un error porcentual de 4 % en la medida de glucosa, 3 % para biomasa, 5 % para CO<sub>2</sub> y de un 10 % para el O<sub>2</sub> se obtiene una matriz de varianza covarianza F:

$$F = 10^{-3} \begin{pmatrix} 0.2143 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0.324 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0.1219 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0.0386 \end{pmatrix} \begin{matrix} s \\ O_2 \\ CO_2 \\ x \end{matrix} \quad (19)$$

y a través de la ecuación 14 se puede obtener P (la matriz de varianza covarianza de los residuos):

$$P = 10^{-3} \begin{pmatrix} 0.3398 & -0.1751 \\ -0.1751 & 0.2253 \end{pmatrix} \quad (20)$$

El vector de los errores en las medidas experimentales  $\delta$  y el de los valores estimados de las velocidades  $q_m$  resultan:

$$\hat{d} = \begin{pmatrix} 0.0087 \\ -0.0208 \\ -0.0029 \\ 0.0018 \end{pmatrix} \quad \hat{q}_m = \begin{pmatrix} -0.3747 \\ -0.1592 \\ 0.1869 \\ 0.2052 \end{pmatrix} \quad (21)$$

Como puede verse las modificaciones hechas a las velocidades medidas son pequeñas. Tal cual se observa en la tabla V.4, los balances de carbono y grado de reducción se acercan mucho más a la unidad cuando se utilizan los datos reconciliados.

Normalmente, la matriz de varianza covarianza se asume como diagonal, lo que indica que las medidas no están correlacionadas. Sin embargo, las velocidades específicas, los rendimientos e incluso las velocidades volumétricas raramente se miden directamente. En general son derivadas de medidas experimentales denominadas variables primarias las cuales pueden influir sobre más de una velocidad. Por ejemplo, la medida de  $O_2$  influye sobre el valor de la velocidad volumétrica de consumo de  $O_2$  y de producción de  $CO_2$  así como la medida del volumen de medio de cultivo influye sobre todas las velocidades. En todos los casos mencionados anteriormente que poseen errores correlacionados es complicado definir la verdadera matriz de varianza covarianza (F).

Se puede decidir considerar a F como diagonal si se tienen en cuenta valores adecuados para los errores de cada medida. Alternativamente, si todas las medidas son de la misma magnitud, se puede utilizar la estimación por cuadrados mínimos dada por:

$$\hat{r}_m = (I - R_r^T \cdot (R_r \cdot R_r^T)^{-1} \cdot R_r) \cdot \bar{r}_m$$

la cual está basada en la suposición de que todas las variables medidas tienen el mismo error. Como en esta ecuación se usan los valores absolutos de las variables, estas deben ser del mismo orden.

Si alguno de los residuos es significativamente distinto que cero, se concluye que, o bien hay un error sistemático en al menos una de las medidas, o bien hay un error en el modelo planteado.

A fin de cuantificar el hecho de ser “significativamente distinto de cero” se introduce el test  $h$  dado por la suma de los cuadrados ponderados de los residuos:

$$h = \mathbf{e}^T \cdot \mathbf{P}^{-1} \cdot \mathbf{e}$$

Cuando los datos crudos no están correlacionados, la función  $h$  tiene una distribución de tipo  $\chi^2$  (Wang 1983) y se ha visto que lo mismo ocurre aunque los datos estén correlacionados. En la tabla XIV.4 se indican los valores de la función  $\chi^2$  para diferentes niveles de confianza.

Grados de libertad	Nivel de confianza					
	0.500	0.750	0.900	0.950	0.975	0.990
1	0.46	1.32	2.71	3.84	5.02	6.63
2	1.39	2.77	4.61	5.99	7.38	9.21
3	2.37	4.11	6.25	7.81	9.35	11.30
4	3.36	5.39	7.78	9.49	11.10	13.30
5	4.35	6.63	9.24	11.10	12.80	15.10

**Tabla XIII.4:** Valores de la distribución  $\chi^2$  para diferentes grados de libertad.

Los grados de libertad de la función  $\chi^2$  resultan del rango de la matriz  $\mathbf{P}$  que a su vez resulta igual al rango de la matriz de redundancia reducida  $\mathbf{Rr}$ , el número de ecuaciones independientes.

Por comparación del valor calculado de  $h$  con el valor de la distribución  $\chi^2$  para  $\text{rank}(\mathbf{Rr})$  grados de libertad es posible detectar la presencia de errores sistemáticos en las medidas con cierto grado de confianza.

Si para un grado de confianza suficientemente alto se obtiene un valor de  $h$  mayor que el de  $\chi^2$  es que hay algo mal en los datos o el modelo elegido.

continuyendo con el ejemplo del *G. klebahnii* se tiene que el valor del vector de los residuos es:

$$\mathbf{e} = \begin{pmatrix} 0.00047 \\ 0.016 \end{pmatrix}$$

y la función  $h$  resulta ser:

$$h = \mathbf{e}^T \cdot \mathbf{P}^{-1} \cdot \mathbf{e} = 1.838$$

Los grados de libertad de la función  $\chi^2$  en este caso son 2. El valor de la distribución  $\chi^2$  vale 2.77 para ese número de grados de libertad y un valor de confianza de 0.75. Con este valor puede asumirse que no existe un error sistemático en las medidas experimentales.

### **Cálculo en base a los balances de carbono y grado de reducción.**

Este mismo tratamiento puede realizarse a través de los balances de carbono y grado de reducción. Se plantean ambos balances de tal forma que queden igualados a 0:

$$-q_s + q_{CO_2} + 0.9 \cdot m = 0$$

$$-q_s \cdot g_s + 4 \cdot b + m \cdot 4.2 = 0$$

El valor de 0.9 que acompaña a  $\mu$  en el BC surge de considerar al carbono proveniente de la urea.

Si se ordenan las velocidades medidas en un vector Q y se define una matriz B dada por:

$$\begin{array}{cccc}
 & S & O_2 & CO_2 & X \\
 Q = & \begin{bmatrix} q_s \\ q_{O_2} \\ q_{CO_2} \\ m \end{bmatrix} & & & \\
 B = & & \begin{pmatrix} -1 & 0 & 1 & 0.9 \\ -4 & 4 & 0 & 4.2 \end{pmatrix} & & 
 \end{array}$$

los balances pueden representarse por el producto  $B \cdot Q = 0$ . La matriz B sería equivalente a Rr en el modelo anterior pero ahora tiene un significado químico directo.

A partir de aquí el formalismo es exactamente el mismo con la única diferencia de que ahora hay que encontrar un vector  $\delta$  tal que se minimice el producto  $Q_e \cdot B$ , donde  $Q_e$  es el vector de las velocidades estimadas  $Q - \delta$ .

Tomando nuevamente el ejemplo anterior quedan las siguientes matrices:

$$Q = \begin{pmatrix} 0.366 \\ 0.180 \\ 0.184 \\ 0.207 \end{pmatrix} \quad B = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 1 & 0.9 \\ -4 & 4 & 0 & 4.2 \end{pmatrix} \quad B \cdot Q = \begin{pmatrix} 0.0043 \\ 0.1254 \end{pmatrix}$$

Por convención en este modelo se toman  $q_s$  y  $q_{O_2}$  como positivos (en Q) ya que tienen coeficientes negativos en B.

Como puede verse, el balance de grado de reducción presenta, con los datos experimentales crudos, un error bastante grande. Si se asume el mismo vector E de los errores experimentales del ejemplo anterior y se reemplaza Rr por B, quedan definidos el vector  $P = B \cdot F \cdot B^T$  y  $\delta = F \cdot B^T \cdot P^{-1} \cdot B \cdot Q$ .

Resolviendo el sistema de ecuaciones, quedan definidas las siguientes matrices:

$$E = 10^{-4} \cdot \begin{pmatrix} 2.143 \\ 3.24 \\ 1.219 \\ 0.386 \end{pmatrix} \quad P = \begin{pmatrix} 3.67 \cdot 10^{-4} & 0.001 \\ 0.001 & 0.0093 \end{pmatrix} \quad d = \begin{pmatrix} -0.0072 \\ 0.0225 \\ -0.0043 \\ 0.0016 \end{pmatrix}$$

Con las cuales puede calcularse el valor estimado de las velocidades experimentales y con ellos, calcular  $B \cdot Q_e$  y el vector de los residuos ( $\epsilon$ ).

$$Qe = \begin{pmatrix} 0.3732 \\ 0.1575 \\ 0.1883 \\ 0.2054 \end{pmatrix} \quad B \cdot Qe = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad e = \begin{pmatrix} 0.0043 \\ 0.1254 \end{pmatrix}$$

Con estos valores se obtiene un valor de  $h$  de 2.0211. Puede verse que se llega a valores muy similares a los estimados con los cálculos en base a los balances elementales.

## 4.5 Referencia bibliográfica

1. **Roels, J. A.** 1983. Energetics and kinetics in biotechnology. Amsterdam.
2. **Babel, W. and R. H. Müller.** 1985. Correlation between cell composition and carbon conversion efficiency in microbial growth: a theoretical study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**:201-207.
3. **Erickson, L. E., I. G. Minkevich, and V. K. Eroshin.** 1978. Application of mass and energy balance regularities in fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* **20**:1595-1621.
4. **Pirt, S. J.** 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Oxford.
5. **Atkinson, B. and F. Mavituna.** 1991. Biochemical engineering and biotechnology handbook.
6. **Dekkers, J. G. J., H. E. de Kok, and J. A. Roels.** 1981. Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 426: Comparison of anaerobic and aerobic glucose limitation. *Biotechnology and Bioengineering* **23**:1023-1035.
7. **Sakai, T. and M. Okushima.** 1982. Purification and crystallization of protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agriculture, Biology and Chemistry* **46**:667-676.
8. **Fiechter, A.** 1984. Physical and chemical parameters of microbial growth. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **30**:7-60.
9. **García-Garibay, M., L. Gomez-Ruiz, and E. Bárzana.** 1987. Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotech. Lett.* **9**:411-416.
10. **Bergmeyer, H. U. and E. Bernt.** 1977. Methods of enzymatic analysis. Academic press, New York.
11. **Neijssel, O., M. J. Teixeira de Mattos, and D. Tempest.** 1993. Overproduction of metabolites., p. 163-187. *In* H. Rehm, G. Reed, A. Pühler, and P. Stadler (eds.), *Biotechnology*.
12. **Fiechter, A., O. Käppeli, and F. Meusdoerffer.** 1987. Batch and continuous culture, p. 99-130. *In* A. H. Rose and J. S. Harrison (eds.), *The yeast*. London.
13. **Pastore, G. M., H. H. Sato, and T. Yang.** 1994. Production of fruity aroma by newly isolated yeast. *Biotech. Lett.* **16**:389-392.
14. **Neijssel, O. and D. Tempest.** 1987. Relationship between nutrient status of the environmental and metabolic fluxes in micro-organisms., p. 29-42. *In* Alberghina L (ed.), *Physiological and genetic modulation of product formation. Microbial physiology for biotechnological innovation*. Frankfurt.
15. **Fiechter, A. and W. Seghezzi.** 1992. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Journal of Biotechnology* **27**:27-45.
16. **Soumalainen, H. and E. Oora.** 1971., p. 2. *In* A. H. Rose and J. S. Harrison (eds.), *The yeast*. Academic Press., New York.
17. **Uyeda, K. and E. Racker.** 1965. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **240**:4689-4693.
18. **Markham, E. and J. Byrne.** 1967. Uptake, storage and utilization of phosphate by yeast II. Limiting factors of yeast growth. *J. Inst. Brew.* **73**:271-273.

19. **Markham, E. and J. Byrne.** 1968. Uptake, storage and utilization of phosphate by yeast III. The behaviour of phosphate-starved yeast. *J. Inst. Brew.* **74**:374-378.
20. **Stephanopoulos, G., A. Aristidou, and J. Nielsen** 1998. *Metabolic Engineering. Principles and Methodologies.*
21. **Eagon, R. G.** 1963. Rate limiting effects of pyridine nucleotides on carbohydrate catabolic pethways in microorganisms. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* **12**:274-279.
22. **Lagunas, R. and J. M. Gancedo.** 1973. Reduced pyridine-nucleotides balance in glucose-growing *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **37**:90-94.
23. **Bruinenberg, P. M., R. Jonker, J. van Dijken, and W. A. Scheffers .** 1985. Utilization of formate as an additional energy source by glucose limited chemostat cultures of *Candida utilis* CBS621 and *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066. Evidence for the absence of tranhydrogenase activity in yeast. *Archives of Mikrobiology* **142**:302-306.
24. **Watson, K.** 1976. The biochemistry and biogenesis of mitochondria, p. 92-120. *In* J. E. Smith and D. R. Berry (eds.), *The filamentous fungi.* Edward Arnold, London.
25. **Bruinenberg, P. M., J. van Dijken, and W. A. Scheffers .** 1983. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeast. *Journal of General Microbiology* **129**:953-964.
26. **Calhoun, M. W., K. L. Oden, R. B. Gennis, M. J. Teixeira de Mattos, and O. Neijssel** 1993. Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *J. Bacteriol.* **175**:3020-3025.
27. **van der Heijden, R. T., J. J. Heijnen, C. Hellinga, B. Romein, and K. Luyben** 1994. Linear constraint relations in biochemical reaction system: I classification of the calculability and the balanceability of conversion rates. *Biotechnology and Bioengineering* **43**:3-10.
28. **Wang, N. S. and G. Stephanopoulos.** 1983. Aplication of macroscopic balances to the identification of gross measurement errors. *Biotechnology and Bioengineering* **25**:2177-2208.

## CAPITULO 5

### Estudio de la expresión de PGasa por *G. klebahnii* en cultivos en sistema batch.

#### 5.1 Introducción.

Una vez determinados los parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de *G. klebahnii*, se procedió a estudiar el efecto de distintas variables de cultivo, en batch, sobre la expresión de la poligalacturonasa. La casi totalidad de los estudios se realizaron en erlenmeyer agitado ya que este sistema posee una simplicidad que permite realizar múltiples ensayos al mismo tiempo.

#### 5.2 Materiales y métodos

##### 5.2.1 Cepa.

En todos los ensayos realizados se utilizó el *Geotrichum klebahnii* ATCC 42397

##### 5.2.2 Mantenimiento de la cepa.

Los medios y protocolos de mantenimiento de la cepa son los mismos que los vistos en capítulo anterior.

##### 5.2.3 Medios de cultivo.

Medio de referencia (MR): Se utilizó como referencia el mismo medio que en el capítulo utilizado en el capítulo anterior y sobre él se realizaron las variaciones pertinentes.

##### 5.2.4 Estudio de diferentes fuentes de carbono y energía.

El protocolo de los cultivos fue el siguiente. En el momento de comenzar una experiencia, se realiza un repique en dos tubos conteniendo el medio de mantenimiento en pico de flauta. Luego de 36-48 Hs, se resuspenden los microorganismos en 10 ml de agua destilada estéril y se siembran los frascos erlenmeyer de 1000 mL con 100 mL de medio de cultivo a razón de 1 ml de suspensión por cultivo. En todos los casos, salvo aclaración, la densidad óptica (DO 625 nm) inicial fue de alrededor de 0,2.

Los cultivos se realizaron en un agitador rotatorio termostatzado New Brunswick a 30°C y 200 RPM, el crecimiento microbiano se siguió por medidas de DO y se tomaron muestras para medida de actividad enzimática cuando se alcanzó la fase estacionario (dos medidas sucesivas con la misma DO) antes de que el pH alcance valores superiores

a 7 ya que la enzima es inestable a pH superiores. La inestabilidad de la PGasa de *G. klebahnii* a valores elevados de pH ha sido reportada por Iguchi y col.<sup>1</sup> y es una propiedad compartida por PGasas de otro origen<sup>2, 3</sup>.

Todos los cultivos se dieron por terminados cuando el testigo hubo llegado a fase estacionaria. Al final del cultivo, se midió el nivel de glucosa remanente. Para dicha medida en el medio testigo se utilizó el método enzimático colorimétrico de glucosa oxidasa<sup>4</sup>.

Se ensayaron las siguientes fuentes de carbono y energía: Glucosa (testigo), xilosa, galactosa, fructosa, lactosa, maltosa, sacarosa, glicerol, manitol, sorbitol, acetato de sodio (NaAc), lactato de sodio (NaLac), y GALA. En cada caso, se puso la cantidad equivalente en carbono a 5.0 g/l de glucosa.

Para la recolección de muestras para determinación enzimática se centrifugó una alícuota de cultivo en tubos de polipropileno a 10000 RPM por 10 minutos y el sobrenadante se guardó en tubos de vidrio a -18 °C hasta su análisis.

### 5.2.5 Estudio de la fuente de nitrógeno.

Para el estudio de los cultivos con diferentes fuentes de nitrógeno complejas, se utilizó el mismo medio de cultivo que el testigo en los que la urea fue reemplazada por una cantidad equivalente en nitrógeno de cada una de ellas. Las fuentes ensayadas fueron, peptona (Merck), bacto peptona (Difco), triptona de caseína (Oxoid), tryptona de soja (Oxoid), extracto de levadura (Merck). Como en los demás ensayos, se utilizó como testigo el medio con urea

Para poder estudiar el efecto de amonio y nitrato como fuentes de nitrógeno se utilizó el MR con la urea cambiada por cantidades equivalentes (en nitrógeno) de  $\text{NaNO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . En este caso los cultivos no se realizaron en erlenmeyer sino en un biorreactor ya que en estos casos debe controlarse el pH en forma activa porque estas fuentes de nitrógeno modifican el pH del medio durante su metabolismo.

### 5.2.6 Efecto de los microelementos.

Para estudiar el efecto de los microelementos se realizaron cultivos en erlenmeyer. En este caso los medios de cultivo fueron diseñados para cada experiencia mediante el uso de diseños estadísticos, Plackett-Burman en un caso y Doehlert en el otro.

Para evitar las interferencias debidas a posibles contaminantes metálicos presentes en el agua destilada, los medios de cultivo utilizados en este estudio se realizaron con agua desionizada (Nanopure) de 18,3  $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$  de resistividad específica.

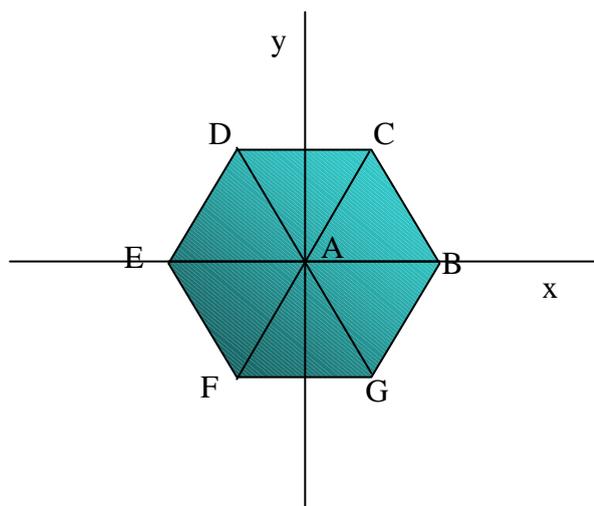
El diseño de Plackett-Burman<sup>5</sup> es un diseño factorial fraccionario. Al igual que los demás diseños fraccionarios, este diseño permite discernir que variables influyen sobre el resultado experimental pero no permite estudiar la existencia de interacciones entre ellas. Es de gran utilidad para estudios preliminares en donde se debe investigar gran número de variables y en los cuales la utilización de un modelo factorial completo se hace impracticable debido a la gran cantidad de ensayos requeridos.

Este tipo de experimento deja de lado las interacciones entre variables en aras de la sencillez. Según el diseño de Plackett, el número de experiencias debe ser múltiplo de cuatro, en este caso se realizó un ensayo de 11 variables y 12 cultivos.

Una vez obtenidas las variables que poseen algún efecto principal sobre la actividad enzimática se realizó un diseño factorial completo, el cual permite determinar las interacciones que los diversos factores poseen juntos sobre la expresión de la actividad enzimática.

El método de Doehlert <sup>6</sup> es un diseño de superficie de respuesta que permite encontrar máximos o mínimos en la zona del ensayo. El método permite manejar un numero apreciable de variables a la vez sin que el número de ensayos se haga operativamente inmanejable. Para la realización de este método los valores que se le asignan a las variables se distribuyen uniformemente alrededor de un valor central, por ejemplo, en el caso de investigar dos variables se distribuyen alrededor de un hexágono.

A diferencia de otros diseños de superficie de respuesta, el de Doehlert tiene la ventaja que puede ser ampliado cambiando el centro del hexágono de un nuevo ensayo.



A fin de determinar el valor en todos los puntos de las variables  $x$  e  $y$ , y para asegurar que estén equidistantes se toma como imagen generatriz al triángulo equilátero ABC de lado unitario y se determina la posición de cada punto tomando arbitrariamente al punto A como  $x = 0, y = 0$ .

Teniendo en cuenta este valor, los extremos del triángulo quedan situados en

A (0.000,	0.000)
B (1.000,	0.000)
C (0.500,	0.866)

El resto de los extremos del hexágono se ubican en los siguientes puntos.

D (-0.500	0.866)	E (-1.000	0.000)
F (-0.500	-0.866)	G..(0.500	-0.866)

A fin de generalizar las coordenadas de los vértices de la figura característica del modelo (en este caso el hexágono) se aprovecha la propiedad de que cada punto surge de la sustracción de dos puntos cualesquiera de la figura generatriz (en este caso el triángulo ABC). Por ejemplo, el punto D resulta de  $C - B$ , E resulta de  $A - B$ , etc.

Este calculo no resulta muy útil en dos dimensiones pero es muy práctico cuando el modelo se complica y se usan tres variable o más.

En el caso de trabajar con tres variables, la figura generatriz es un tetraedro de arista unitaria cuyos vértices se encuentran en  $(0,0,0), (1,0,0), (0.5, 0.866, 0), (0.5, 0.289, 0.816)$ .

En general, para  $d$  factores, la figura generatriz se arma agregando a la figura  $d-1$  el punto:

$$\left[ \frac{1}{2}, \frac{1}{2\sqrt{3}}, \frac{1}{2\sqrt{6}}, \dots, \frac{1}{\sqrt{2(d-1)(d-2)}}, \frac{1}{\sqrt{2d(d-1)}}, \frac{\sqrt{(d+1)}}{\sqrt{2d}} \right]$$

y completando los puntos anteriores con ceros para la nueva coordenada. En el apéndice II se presenta la tabla generatriz para el diseño <sup>6</sup>. Obsérvese que los valores codificados para el modelo de dos dimensiones resulta de tomar los valores comprendidos a la izquierda y por encima de la primera línea divisoria (valores marcados en rojo) y sus opuestos. Para el modelo de tres variables se utilizan los valores comprendidos por la segunda línea divisoria (valores en azul agregados a los valores en rojo) y sus opuestos. Por cada nueva variable agregada se amplía el rango de datos hasta la siguiente línea divisoria).

Estos valores corresponden a las variables codificadas y a partir de ellos se calculan los valores reales de las variables  $x$  e  $y$ .

Por ejemplo, si  $x$  es concentración de hierro e  $y$  es pH y se quiere barrer valores entre 10 y 100 mM de Fe y entre 3.0 y 7.0 de pH, se determina la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de las variables codificadas y las reales, en este caso tenemos que  $\Delta x_{\text{cod}} = 2$ ,  $\Delta y_{\text{cod}} = 1.732$ ,  $\Delta x_{\text{real}} = 90$ ,  $\Delta y_{\text{real}} = 4$ . Para calcular los valores de Fe y pH a utilizar se determina el valor medio de las dos variables, 55 y 5.0 y sobre estos valores se determina el resto mediante la ecuación:

$$x_{\text{real}} = x_{\text{codif}} \times \frac{\Delta x_{\text{real}}}{\Delta x_{\text{codif}}} + x_0$$

donde  $x_0$  es el valor de la variable  $x$  en el punto central. El mismo tratamiento se sigue para las demás variables.

Del punto central se realiza un triplicado, el cual se utiliza para determinar la varianza propia del experimento. Junto con los valores centrales quedan en total 9 experimentos a realizar.

Una gran ventaja que posee este método es que si se desea aumentar el rango de estudio en alguna de las variables, simplemente se corre el punto central y se recalculan los nuevos valores de las variables  $x$  e  $y$ .

En el caso de estudiar tres variables el número de experimentos a realizar es 15 (12 puntas y 3 centrales).

Para dos factores, se estudian 3 valores del primero y 5 del segundo, si el estudio es de 3 variables, se estudian 3 valores de la primera, 5 de la segunda y 7 de la tercera.

Una vez realizada la experiencia y medida la variable dependiente (en nuestro caso actividad PGasa) se determinan los coeficientes de un polinomio del tipo  $z = b_0 + b_1x + b_2y + b_3x^2 + b_4y^2 + b_5xy$ . Los coeficientes se determinan por el método de cuadrados mínimos. La forma más sencilla de manejar este número de datos es mediante el cálculo matricial.

Si se definen las siguientes matrices.

$$X = \begin{pmatrix} 1 & x_1 & y_1 & x_1^2 & y_1^2 & x_1 y_1 \\ 1 & x_2 & y_2 & x_2^2 & y_2^2 & x_2 y_2 \\ 1 & x_3 & y_3 & x_3^2 & y_3^2 & x_3 y_3 \\ 1 & x_4 & y_4 & x_4^2 & y_4^2 & x_4 y_4 \\ 1 & x_5 & y_5 & x_5^2 & y_5^2 & x_5 y_5 \\ 1 & x_6 & y_6 & x_6^2 & y_6^2 & x_6 y_6 \\ 1 & x_7 & y_7 & x_7^2 & y_7^2 & x_7 y_7 \\ 1 & x_8 & y_8 & x_8^2 & y_8^2 & x_8 y_8 \\ 1 & x_9 & y_9 & x_9^2 & y_9^2 & x_9 y_9 \end{pmatrix} \quad B = \begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \\ b_5 \end{pmatrix} \quad Y = \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \\ y_4 \\ y_5 \\ y_6 \\ y_7 \\ y_8 \\ y_9 \end{pmatrix}$$

donde los  $x_i$  e  $y_i$  son los valores codificados de  $x$  e  $y$  para cada experiencia,  $B$  es el vector de los coeficientes a determinar e  $Y$  es el vector de los resultados experimentales de cada ensayo, se observa que  $X \cdot B = Y$ . Este es un sistema de ecuaciones redundantes, con más ecuaciones que incógnitas, así que no puede despejarse directamente  $B$  del producto anterior. Para resolverse este sistema se debe obtener la matriz seudo inversa de  $X$  a partir de  $(X^T X)^{-1} \cdot X^T$  donde  $X^T$  es la matriz transpuesta de  $X$  (los cálculos matriciales se realizaron por computadora utilizando el programa Mathcad).

Como hay más ecuaciones que incógnitas los valores obtenidos para los parámetros son estimadores que minimizan la distancia entre las variables reales y las obtenidas.

Realizando el análisis de varianza de los resultados obtenidos para cada parámetro del polinomio se decide cuales de ellos son significativos y cuales no. Con aquellos que son significativos se vuelven a calcular los parámetros del polinomio y con ellos puede realizarse el grafico de la superficie de respuesta o bien calcular en forma analítica la existencia de máximos o mínimos en la zona del estudio.

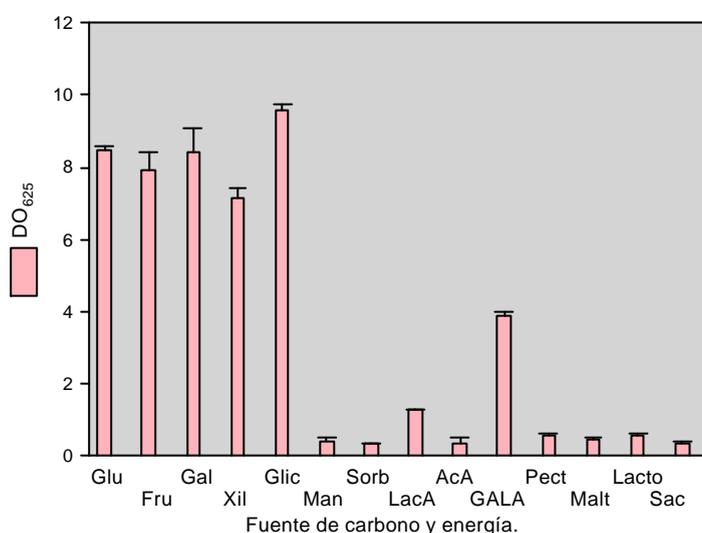
### 5.2.7 Cultivos en sistema batch en biorreactor.

Las condiciones de cultivo para la expresión de PGasa en biorreactor fueron las mismas que para los estudios sobre cinética y estequiometría del crecimiento (ver capítulo 4).

## 5.3 Resultados y discusión

### 5.3.1 Efecto de la fuente de carbono y energía.

La primera variable estudiada fue la capacidad de *G. klebahnii* de crecer con diferentes fuentes de carbono y energía (FCE). Los ensayos de crecimiento muestran (Figura 1.5) que el microorganismo puede crecer con cualquiera de los monosacáridos utilizados, glucosa (testigo), xilosa, galactosa y fructosa y con glicerol, pero sólo llega a la mitad de la DO final con GALA, aproximadamente un 20 % con lactato de sodio y prácticamente no presenta crecimiento con los demás, incluyendo todos los disacáridos y polioles ensayados.



**Figura 1.5:** crecimiento comparativo de *G. klebahnii* con diferentes fuentes de carbono. Glu: glucosa, Fru: fructosa, Gal: galactosa, Xil: xilosa, Glic: glicerol, Man: manitol, Sorb: sorbitol, Lac: lactato, AcA: acetato, GALA: Ac. galacturónico, Pect: pectina, Malt: maltosa, Lacto: lactosa, Sac: sacarosa.

En aquellos cultivos en los que hubo crecimiento, en el momento en que se agotó la fuente de carbono, el pH del cultivo comenzó a aumentar en forma muy apreciable, llegando rápidamente a valores cercanos a 8. Esto puede deberse a que la ureasa sigue funcionando activamente aún después de haberse agotado la fuente de carbono. Al no haber incorporación de nitrógeno a la biomasa, el  $\text{NH}_3$  se acumula en el medio ocasionando un incremento muy pronunciado en el pH.

De aquellas muestras en las que se observó un crecimiento apreciable, se determinó la actividad enzimática (como PGasa). Los valores encontrados pueden verse en la tabla I.5. Puede observarse que los monosacáridos glucosa, fructosa y xilosa producen valores semejantes de actividad enzimática.

En cambio, la galactosa y el glicerol producen poca cantidad de enzima a pesar de ser muy buenos como fuente de carbono. El lactato apenas puede soportar el crecimiento de *G. klebahnii*.

Fuente de carbono	Actividad media (U . mL <sup>-1</sup> )
Glucosa	11.8 ± 0.8
Fructosa	12.3 ± 0.6
Galactosa	3.6 ± 1.1
Xilosa	12.6 ± 0.6
Glicerol	5.7 ± 0.2
Lactato	1.0 ± 0.1
GALA	0.6 ± 0.1

**Tabla I.5:** Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de la actividad PGasa en cultivos batch limitados en carbono.

Un caso muy particular es el del GALA, el cual sirve muy efectivamente como fuente de carbono pero ejerce una inhibición casi completa en la producción de enzima.

El efecto encontrado para *G. klebahnii* para la galactosa, el GALA y la glucosa como fuentes de carbono han sido reportados con resultados muy variados. Por un lado, Blanco y col<sup>3</sup> reportan que la expresión de una endopoligalacturonasa de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa 1398) se induce por la presencia de GALA en el medio de cultivo y es mayor cuando se utiliza galactosa como FCE en vez de glucosa. Por otro lado, Schwan & Rose<sup>7</sup>, reportan que la síntesis de poligalacturonasa por *Kluyveromyces marxianus* es mayor con glucosa como FCE que con galactosa y en este caso la GALA ni siquiera puede soportar el crecimiento celular.

Ya que el microorganismo fue aislado de cáscara de mandarina (Sakai T. Comunicación personal) se probó si el microorganismo es capaz de crecer en cáscara de cítrico así como en una serie más extensa de pectinas. Las pectinas estudiadas fueron las siguientes: pectina de lima de alto grado de esterificación, pectina de lima de bajo grado de esterificación, pectina cítrica (Sigma), pectina de remolacha, pectina de caqui y pectina de manzana. Además se ensayó el crecimiento sobre PGA y sobre PGA hidrolizado con PGasa SE comercial (grado de polimerización promedio 4). En cuanto a la cáscara cítrica, se analizó el crecimiento sobre cáscara picada, sobre cáscara picada y lavada hasta reacción negativa al Somogyi-Nelson (libre de azúcares reductores) y sobre el sobrenadante del lavado de la cáscara. Como control positivo se utilizó el medio de referencia. Los cultivos se realizaron en erlenmeyers agitados. En todos los casos se adicionó la FCE en cantidad equivalente a 5 g/L de glucosa y se comenzaron todos los ensayos a pH 5.

*G. klebahnii* fue incapaz de crecer en las pectinas ensayadas, independientemente del grado de su metilación, así como sobre PGA (hidrolizado y sin hidrolizar). Tampoco se observó crecimiento sobre la cáscara cítrica lavada pero si sobre la cáscara sin lavar así como en el sobrenadante del lavado.

El hecho de que *G. klebahnii* no crezca en pectina y la actividad enzimática no sea inducida por dicho polisacárido ni por PGA coincide con los resultados observados para otras levaduras. La actividad pectolítica en levaduras es habitualmente constitutiva por lo que su síntesis no es inducida por pectina o PGA<sup>8</sup>. Sin embargo no existe un comportamiento uniforme con relación al efecto de estas sustancias sobre la síntesis de PGasa. En la tabla II.5 se muestran algunos ejemplos del efecto de distintas sustancias sobre la expresión de PGasa.

La acción citada en dicha tabla para el O<sub>2</sub> disuelto se refiere al efecto que se observa sobre la expresión de la enzima cuando el O<sub>2</sub> disuelto es mayor del 60 % de saturación. La solubilidad del O<sub>2</sub> en los medios de cultivo a 30 °C es aproximadamente 7.5 mg/L así ese límite es de aproximadamente 4,5 mg/L.

Microorganismo	Pectina	PGA	GALA	Glucosa	O <sub>2</sub> disuelto (>60 %Sat)	Referencia
<i>Cryptococcus albidus</i>	↑	↑	↑	↓	⊥	9
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	↑	NR	NR	⊥	↓	10
<i>Geotrichum lactis</i>	↑	↑	↑	↓	⊥	2
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	⊥	⊥	⊥	↑	↓	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		↑	↑	⊥	↓	3
<i>Geotrichum klebahnii</i>	⊥	⊥	↓	⊥	⊥	Este trabajo

**Tabla II.5:** Efecto del agregado pectina o algunos de sus derivados sobre la expresión de PGasa por *G. klebahnii*.

En cultivos realizados con el medio de referencia en biorreactor manteniendo el O<sub>2</sub> disuelto en valores cercanos a cero (valor medido on line con un electrodo polarográfico) se observó que la actividad PGasa final no es significativamente distinta a la encontrada en aquellos cultivos realizados sin limitación por este elemento.

Como puede observarse no existe un comportamiento general con relación al efecto de estos moduladores comunes para PGasas (Tabla II.5).

Otro efecto comúnmente reportado (Tabla II.5) es la inhibición de la síntesis de la actividad enzimática por la glucosa y otros azúcares fácilmente fermentables, en nuestro caso este efecto no se encuentra ya que como puede verse en la tabla I.5 la actividad máxima se obtiene justamente con glucosa, xilosa y fructosa.

De estos resultados, es particularmente llamativo que *G. klebahnii* no pueda utilizar pectina como fuente de carbono a pesar de poseer una enzima que es capaz de degradarla.

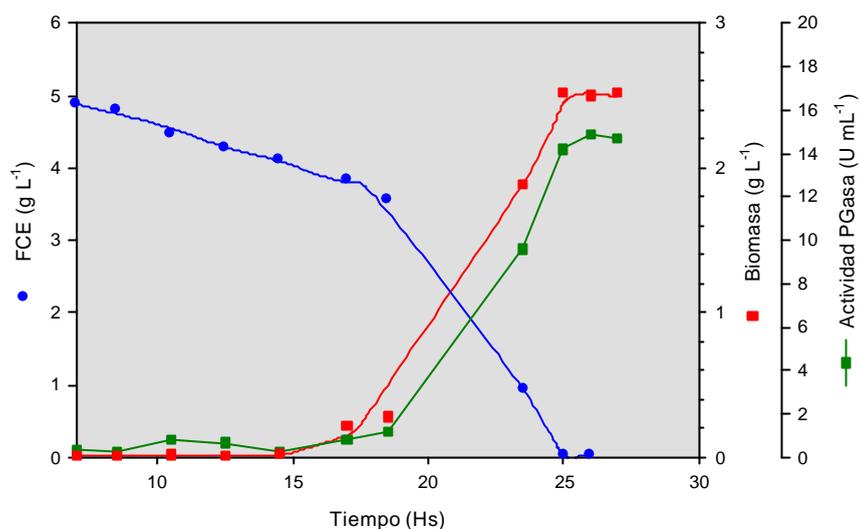
Una vez realizada la búsqueda de las fuentes de carbono que soportaran el crecimiento de *G. klebahnii* y produjeran buenos niveles de enzima, y dado que con glucosa se obtienen los mejores resultados en ambos sentidos, se volvió al medio de referencia y sobre él se realizaron todas los demás estudios.

La producción de enzimas extracelulares puede estar o no asociada al crecimiento celular. Por ejemplo, la producción de poligalacturonasa por *Cryptococcus albidus* se retrasa al crecimiento<sup>9</sup> y la de proteasa y amilasa en *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens* se produce mayormente luego de finalizada la fase exponencial<sup>11</sup>. En este caso, para la producción de enzimas se buscan condiciones de cultivo que produzcan cultivos con una fase exponencial relativamente corta seguida de una fase estacionaria. Por otro lado, la producción de amilasa por *B. lincheniformis* y *Aspergillus oryzae* se produce durante la fase de crecimiento<sup>12 10 13;14</sup>.

La figura 2.5 muestra la curva de crecimiento y producción de enzima típicas de *G. klebahnii* en medio MR.

Como puede observarse, la expresión de la enzima acompaña continuamente al crecimiento microbiano. Este patrón de producción de enzima es similar al segundo caso de los vistos anteriormente. Según Priest<sup>15</sup> que una enzima obedezca a uno u otro patrón resulta de que sufra o no represión catabólica. En el caso de enzimas reprimibles por algún sustrato del medio de cultivo, recién al final de la fase de crecimiento, cuando la concentración de los nutrientes disminuye, puede observarse la expresión de la misma.

Otros ejemplos de este comportamiento son la proteasa, amilasa y xilanasas de *Bacillus polymyxa*<sup>15</sup>, la exo pectinasa de *Aspergillus* sp<sup>14</sup> y la poligalacturonasa de *Kluyveromyces fragilis*<sup>10</sup> que crecen asociadas a la fase exponencial y el caso de la poligalacturonasa de *Cryptococcus albidus*, que se reprime por glucosa, y en la que la síntesis de enzima comienza casi al final de la fase exponencial<sup>9</sup>.



**Figura 2.5:** Curva de crecimiento de *G. klebahnii* y producción de enzima en MR.

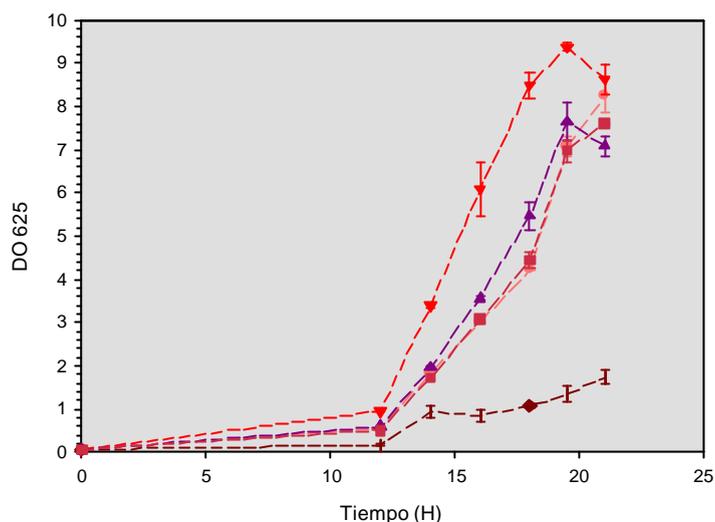
### 5.3.2 Crecimiento en función del pH.

Para verificar la capacidad de *G. klebahnii* de crecer y producir enzima a diferentes pHs se realizó una serie de cultivos en los que se mantuvo constante la composición del medio de cultivo excepto la relación entre el ácido cítrico y el  $K_2HPO_4$ ,<sup>16</sup> los cuales forman la pareja buffer que controla el pH del medio. El buffer se prepara en base a distintos volúmenes de soluciones stock 0,1 M de ácido cítrico y 0,2 M de  $K_2PO_4$ . Los pHs elegidos y la composición del buffer del medio (volúmenes de sc stock) puede observarse en la tabla III.5, el resto de los componentes del medio de cultivo se mantuvo igual al del medio de referencia.

pH	Acido cítrico	$K_2PO_4$
2,6	4,46	0,54
4,0	3,07	1,93
5,0	2,43	2,57
6,0	1,79	3,21
7,0	0,65	4,36

**Tabla III.5:** pH y composición de la pareja buffer del medio de cultivo para verificar el crecimiento de *G. klebahnii* en función del pH.

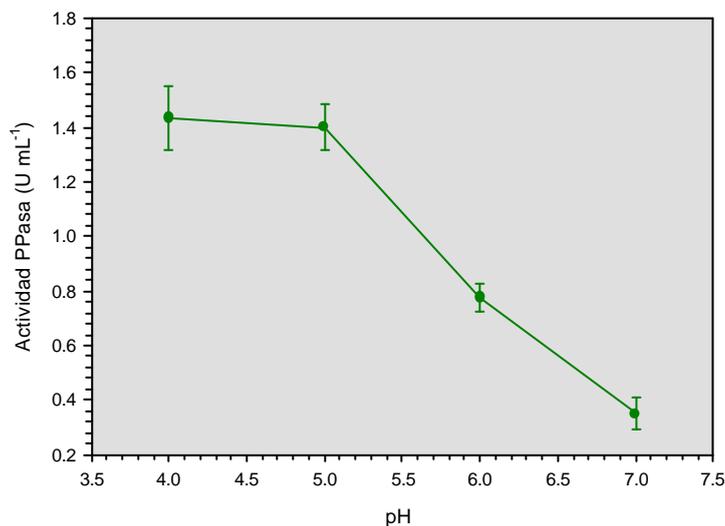
Los resultados obtenidos se observan en la figura 3.5.



**Figura 3.5:** DO<sub>625</sub> en función del tiempo de cultivos batch con el medio de referencia a diferentes pHs iniciales. pH inicial: 2,6 ◆, 4,0 ▼, 5,0 ▲, 6,0 ■ y 7,0 ●.

Como puede observarse, *G. klebahnii* prácticamente no crece a pH 2,6 pero desde 4,0 a 7,0 no se observan mayores diferencias en cuanto a la velocidad de crecimiento y al rendimiento obtenido. A pH 4 se observa una velocidad específica del crecimiento un poco más elevada así como un rendimiento un poco mayor que al resto.

Los resultados obtenidos en relación a la actividad enzimática pueden observarse en la figura 4.5.



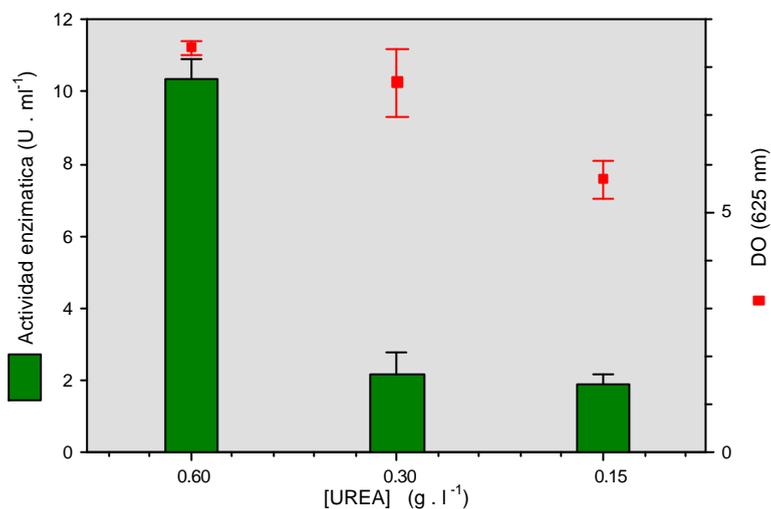
**Figura 4.5:** Actividad enzimática (como PPasa) en función del pH inicial del cultivo.

Se ve que la actividad tiene un valor máximo entre 4 y 5 y que con el aumento del pH se ve fuertemente deprimida. A pH 2,6 la actividad no se determinó ya que el crecimiento fue prácticamente nulo. Este comportamiento volvió a encontrarse cuando se estudió el efecto de los microelementos y el pH sobre la actividad enzimática (ver

más adelante). Un efecto similar con un máximo de síntesis de enzima un poco antes del comienzo de una zona de inhibición del crecimiento fue encontrado por Aguilar y col<sup>17</sup> en la producción de una exopoligalacturonasa de *Aspergillus* en el que el máximo de actividad enzimática se obtiene comenzando el cultivo a pH 3.5, cuando comienza a pH 2.5 no puede crecer más allá de las 24 Hs ya que el pH del medio desciende normalmente durante el crecimiento y en ese tiempo alcanza un valor de 2.0, que es incompatible con el crecimiento.

### 5.3.3 Efecto de la fuente de nitrógeno.

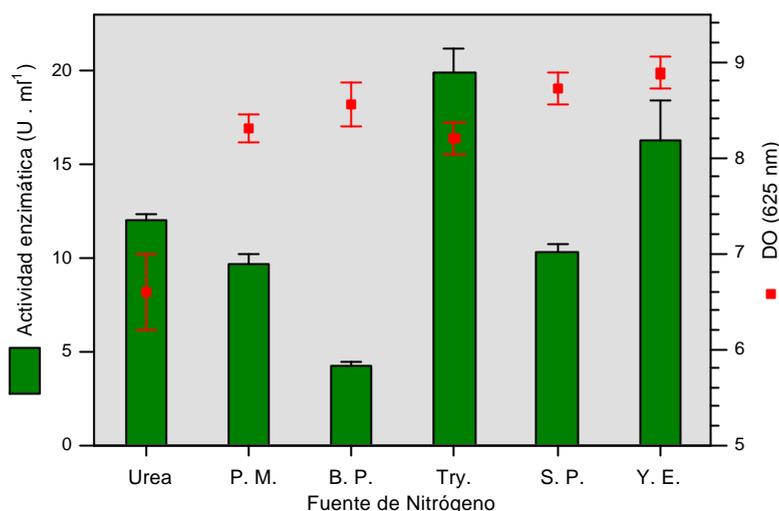
Cuando los cultivos se limitaron en urea el pH del medio se mantuvo constante alrededor de 5 durante todo el cultivo y no pudo detectarse amoníaco en el sobrenadante. La disminución en el crecimiento no fue proporcional a la disminución de la fuente de nitrógeno pero la síntesis de la enzima se vio muy disminuida, obteniéndose valores de sólo un 20 % de la del testigo (Figura 5.5). Esto demuestra claramente que se requiere de un exceso de nitrógeno para favorecer la síntesis de la enzima.



**Figura 5.5:** Crecimiento y actividad enzimática en cultivos con diferente cantidad de nitrógeno (0.6 g L<sup>-1</sup> es la cantidad estequiométrica).

A pesar de ser muy conveniente el uso de fuentes de nitrógeno sencillas en medios de cultivo definidos, se investigó el efecto de fuentes de nitrógeno complejas sobre el crecimiento y la producción de PGasa ya que éstas suelen ser muy utilizadas a nivel industrial para la producción de metabolitos. En cada caso, la urea fue reemplazada por una cantidad equivalente de nitrógeno. Los resultados obtenidos se observan en la figura 6.5.

Puede observarse que el rendimiento en cuanto al crecimiento fue siempre mayor que el testigo. Este resultado es esperable ya que las fuentes de nitrógeno complejas aportan no sólo un exceso de carbono con respecto a la glucosa sino que además tienen factores nutricionales prearmados que hacen que el microorganismo deba gastar menos energía en las rutas anabólicas. En estos cultivos sólo se alcalinizó al agotarse la fuente de carbono aquel que poseía urea como fuente de nitrógeno.



**Figura 6.5:** Crecimiento y actividad enzimática utilizando diferentes fuentes de nitrógeno complejas. P.M. Peptona de carne (Merck), B.P. Bacto peptona (DIFCO), Try, Tryptona de caseína (DIFCO), S.P., Peptona de Soja (OXOID), Y.E., Extracto de levadura (Merck).

El análisis de estas muestras indica que las mayores actividades se encuentran en los cultivos con triptona y extracto de levadura y que las peptonas producen una represión en la síntesis de la enzima, en particular la bacto peptona. En principio no es sencillo relacionar la productividad enzimática con estos componentes del medio de cultivo sobre todo porque no hay una relación directa entre el crecimiento y la síntesis de la enzima con lo que no puede justificarse la variación en la actividad enzimática recuperada con la cantidad de carbono que haya en la fuente de nitrógeno ni en la existencia de metabolitos preformados.

Una posible explicación a este comportamiento es que la fuente de nitrógeno utilizada (alguno de sus componentes) interactúe con algún componente del medio de cultivo de tal forma que la expresión de la enzima se modifique con respecto a la que se obtiene con el MR. Dada la simpleza del medio de cultivo de referencia y la existencia en bibliografía de citas con respecto al efecto de los micronutrientes sobre la expresión enzimática<sup>18, 19, 20</sup>, se investigó la posible interacción entre los hidrolizados utilizados y esta fracción del medio de cultivo.

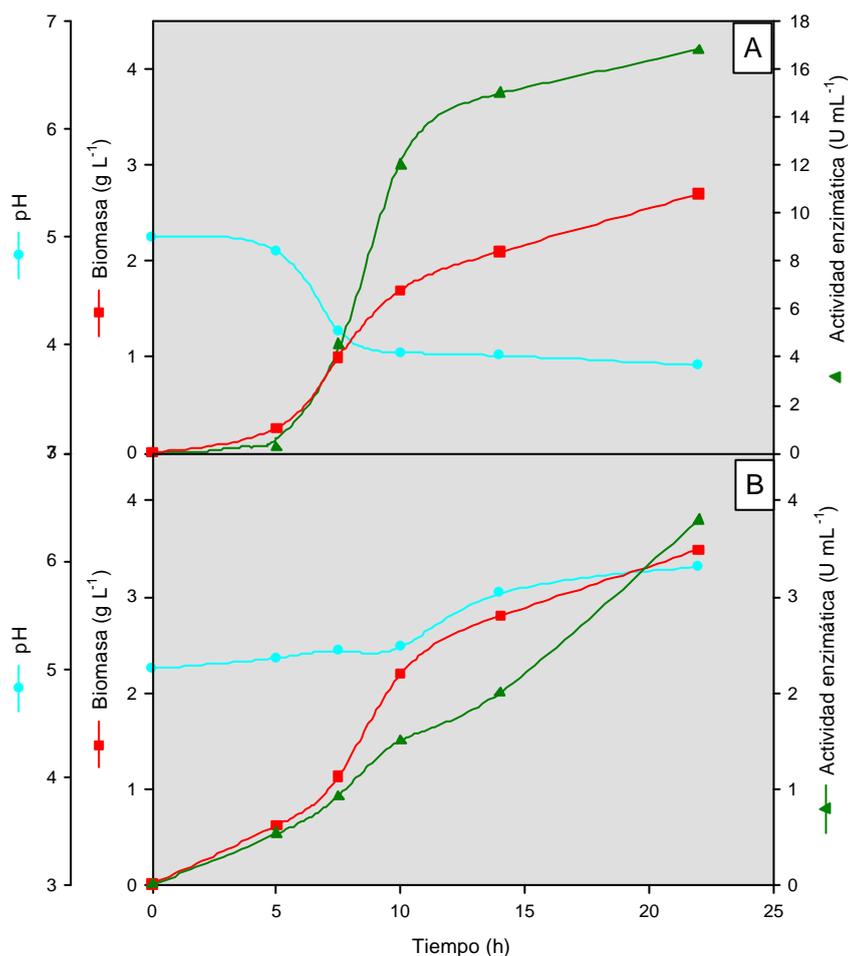
A fin de probar si esta hipótesis es correcta, se repitieron los cultivos con extracto de levadura en los cuales se omitieron alternativamente la solución de vitaminas y la de los micronutrientes inorgánicos en un caso y la solución de micronutrientes inorgánicos en el otro (tabla IV.5).

Medio de cultivo	Biomasa final (g L <sup>-1</sup> )	Actividad PGasa (U mL <sup>-1</sup> )
Urea (MR)	2.70	10.5
Y.E.	3.70	19.5
Y.E. sin micronutrientes ni vitaminas	3.80	32.0
YE sin micronutrientes	3.75	30.2

**Tabla IV.5:** efecto de la combinación de extracto de levadura y microelementos sobre la producción de enzima.

Puede verse que nuevamente la biomasa producida es mayor en todos los medios YE y que la actividad se incrementa de una forma muy importante al retirarle los micronutrientes. Este comportamiento hace suponer que hay algún componente del pool de micronutrientes, al menos en la concentración utilizada, que posee un efecto deletéreo sobre la producción enzimática. El extracto de levadura contiene una importante cantidad de sustancias complejantes y es posible que su utilización en el medio de cultivo disminuya la disponibilidad de los metales y produzca el incremento observado en el medio YE. El caso de la bactopectona es un poco más difícil de explicar. La causa más probable quizá sea que contiene como impureza 1.2 µg /g de cadmio, el cual tiene un efecto tóxico bastante importante. Gadd<sup>20</sup> ha sugerido que a pH cercano a 5, al que transcurre el cultivo, el Cd se encuentra como Cd(OH)<sup>+</sup> y este complejo puede ingresar a la células mucho más fácilmente que el Cd<sup>2+</sup>. Al efecto del Cd mismo debe agregarse el efecto de los cationes presentes entre los microelementos. Entre éstos es de particular importancia el Cu<sup>2+</sup> ya que éste posee un efecto tóxico sinérgico con el Cd<sup>2+</sup> lo que explicaría la disminución tan pronunciada que se observa en la síntesis de la enzima<sup>21</sup>.

A fin de verificar si existe un efecto adverso de los microelementos sobre la producción de enzima, se realizó un cultivo para comparar el medio BP completo con uno en el que se retiraron los microelementos pero no las vitaminas.



**Figura 7.5:** Efecto de los microelementos sobre el crecimiento celular y la producción de PGasa en un cultivo con bactopectona como fuente de nitrógeno sin microelementos (A) y con microelementos (B).

Los resultados pueden verse en la figura 7.5. Como puede observarse, esta experiencia demuestra que los microelementos (al menos alguno de ellos) ejercen una profunda represión en la síntesis de la enzima a pesar de ser indispensables para un correcto crecimiento lo cual se demuestra en el hecho de que el 25 % de la fuente de carbono no fue consumida en el cultivo sin microelementos (dato no graficado).

### 5.3.4 Efecto de los microelementos

Como se ha demostrado en la sección anterior, los microelementos en su conjunto o alguno de sus componentes posee una influencia muy marcada en el crecimiento microbiano y en la expresión de la PGasa.

El efecto de los microelementos sobre la expresión de distintas enzimas ha sido reportado por varios autores. Mandels y Reese <sup>22</sup> reportan que para la expresión de celulasas por *Trichoderma viridae* es necesaria la adición a medio de cultivo de 1.0 mg/L de Fe, 0.8 mg/L de Zn, 0.5 mg/L de Mn y 0.5 mg/L de Co. En este trabajo, los autores proponen la posibilidad de que la acción de los cationes sea a nivel de la excreción de la enzima por la célula más que a nivel de la producción. Esta hipótesis no se ajustaría a nuestro caso ya que la PGasa de *G. klebahnii* no se acumula intracelularmente. Mizusawa y col <sup>19</sup> estudiaron el efecto de los metales sobre la producción de proteasas por *Streptomyces* sp. y encontraron que la adición al medio de Mn y Co en concentración 0.1 mM incrementa notablemente la formación de enzima. Ellos sugieren la hipótesis de que el efecto de los cationes (particularmente el Mn) es a nivel de la maduración intracitoplasmática de la enzima.

Otros casos reportados acerca de la necesidad de ciertos elementos trazas para la expresión de celulasas <sup>22</sup>, xilanasas y beta glucosidasas <sup>23</sup>, pectinasas <sup>24</sup> y amilasa <sup>25</sup> simplemente mencionan las concentraciones más apropiadas para la producción enzimática.

Dado que para *G. klebahnii* se observó previamente que los elementos traza ejercen una acción negativa sobre la producción enzimática se comenzó la investigación de este efecto simplemente diluyendo las soluciones de microelementos pero manteniendo constante la composición relativa. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla V.5.

Dilución de las soluciones madres de microelementos	Tiempo de cultivo	Actividad enzimática (U mL <sup>-1</sup> )
1:1	20	10.0
1:10	20.5	12.2
1:30	20	34.6
1:50	20	26.9
1:70	21.5	76.5
1:85	22.5	89.8
1:100	23.5	79.2

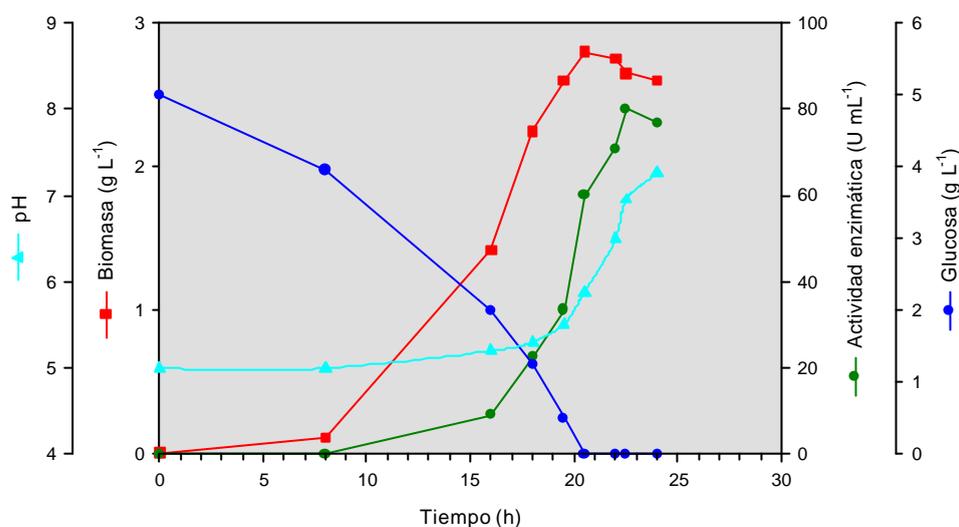
**Tabla V.5:** Influencia de la dilución de las soluciones de elementos traza sobre la producción de PGasa con el MR.

Puede verse claramente que la actividad enzimática final se incrementa enormemente cuando la solución de diluye hasta 1:85. Vale aclarar que el rendimiento celular no se modifica mayormente por estos cambios en la composición del medio y que la biomasa final en todos los casos fue de 2.7-2.8 g L<sup>-1</sup>. Sin embargo los cultivos se alargan cuando los microelementos se diluyen más allá de 1:50. El tiempo indicado en la tabla es aquel en el que se encuentra el máximo de actividad enzimática. Más allá de

ese tiempo, el pH del medio hace que la actividad enzimática disminuya (ver más adelante).

Al medio de cultivo con los microelementos diluidos 1:85 se le llamó MRD (medio de referencia diluido) y sobre él se siguió con la investigación acerca del efecto de los diferentes microelementos. La concentración final de microelementos en el medio de cultivo del MRD es la siguiente (en  $\mu\text{M}$ ): Mo, 0.0316; Co, 0.0074; Mn, 0.209; Fe, 0.635, Cu, 0.0353 y Zn, 0.205.

En la figura 8.5 se observa la curva de crecimiento del *G. klebahnii* en el MRD. Puede observarse que el comportamiento cinético del crecimiento y de la producción de enzima es similar al que se observa en el MR (Figura 2.5) sólo que la cantidad final de enzima es mayor.



**Figura 8.5:** Curva de crecimiento de *G. klebahnii* en el MRD.

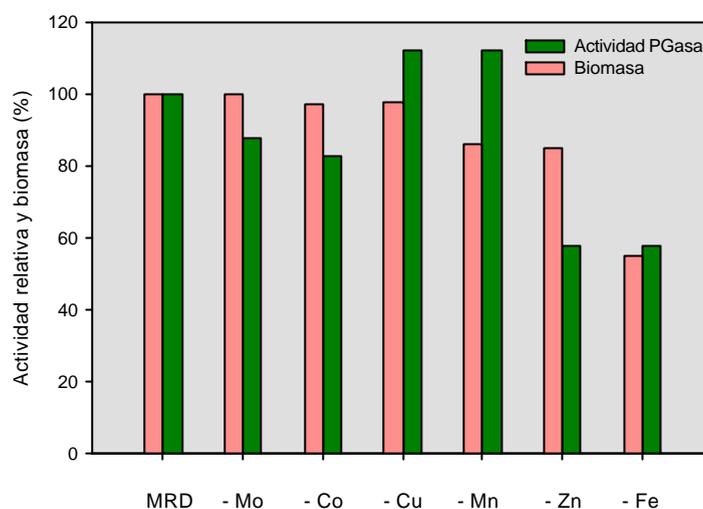
Puede observarse que tanto en este caso como en el MR la síntesis de enzima está directamente asociada al crecimiento y que el máximo de actividad se obtiene inmediatamente después de alcanzar la fase estacionaria. Este comportamiento de las enzimas hidrolíticas extracelulares con respecto al crecimiento microbiano es muy frecuente <sup>26, 13, 27, 28, 10</sup>.

Para determinar cual o cuales de los microelementos son responsables se llevaron a cabo dos series de experiencias en paralelo.

En la primera experiencia se realizó una serie de cultivos en los que al MRD le fue extraído alternativamente cada uno de los metales. El resultado puede verse en la figura 9.5 en la que se ha graficado la actividad enzimática como porcentaje de la obtenida en el MRD.

Puede verse claramente que tanto el Cu como el Mn poseen un efecto negativo ya que su omisión en el MRD produce un incremento de 12 % aproximadamente. En contraposición, la falta de Co o Mo produce un decaimiento de 17 % aproximadamente. Finalmente se ve que la falta de Fe o Zn produce un efecto mucho más drástico sobre la producción de PGasa ya que se ve disminuida en un 40%. En el caso del Fe también el crecimiento microbiano se ve fuertemente disminuido lo que indica que este metal es de vital importancia para *G. klebahnii*. Este dato es similar al encontrado por Morita y

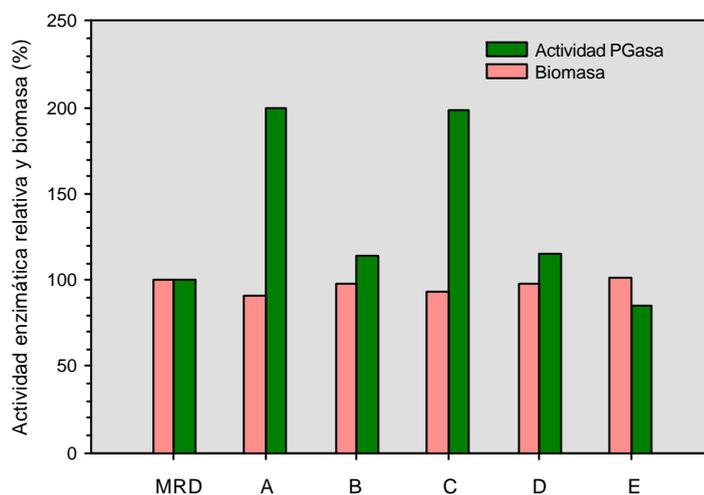
Fujio <sup>29</sup> acerca del efecto de Fe y Zn sobre el crecimiento y la actividad PGasa de *Rhizopus* creciendo sobre un medio mineral.



**Figura 9.5:** Actividad PGasa y biomasa (relativas) luego de retirar los metales de a uno en el MRD.

En base a estos resultados se realizó una nueva experiencia en la que se utilizó como base un medio que sólo contenía Fe y Zn en las concentraciones correspondientes al MRD y a ese medio se le fueron adicionando los otros elementos traza también en las concentraciones del MRD.

Los resultados pueden verse en la figura 10.5.



**Figura 10.5:** Actividad PGasa en relación a la composición del pool mineral **A:** Medio base con Fe + Zn, **B:** Fe + Zn + Mn, **C:** Fe + Zn + Co, **D:** Fe + Zn + Co + Mn, **E:** Fe + Zn + Co + Mn + Cu.

Puede verse que la actividad es máxima en el caso del medio con Fe y Zn y que el agregado de Co no produce ningún efecto sobre la producción enzimática aunque provoca un ligero incremento de la biomasa. El agregado de Mn produce una disminución importante de la actividad enzimática y el agregado de Cu hace que la actividad enzimática obtenida sea mínima. Estos resultados confirman los obtenidos en la experiencia anterior (figura 9.5) pero en este caso es más claro el efecto beneficioso del Fe y Zn. El efecto negativo encontrado en estos experimentos para el Mn parece contradecir la gran importancia que a este catión se le asigna en la síntesis de otras enzimas tal como ha sido reportado en las referencias ya citadas<sup>22, 19, 25, 24</sup>.

Esta diferencia no es fácil de explicar pero quizás haya que tener en cuenta que muchas veces la acción de los elementos traza no depende sólo de su concentración sino que además depende de la presencia de otros elementos traza y de la interacción con ellos.

Para discriminar cuál o cuales de los micronutrientes es/son los responsable/s de los cambios encontrados en la actividad enzimática se realizó un estudio factorial fraccionario<sup>30-32</sup> en base a una matriz de Plackett-Burman<sup>5</sup> de 11 variables y 12 experimentos. En este caso se ensayaron los microelementos del medio MR a los que se agregaron el Ca, el Mg y el pH. El pH se incorporó en este estudio debido a que la disponibilidad de los cationes en el medio de cultivo depende mucho de esta variable a causa de la formación de complejos con grupos OH<sup>-</sup> de composición variable<sup>20</sup>.

Para realizar el diseño factorial se tomó como nivel basal de concentración de microelementos al del MRD y sobre él se aumentaron (+) y disminuyeron (-) las concentraciones. Las concentraciones basales, aumentadas y disminuidas de cada variable se indican en la tabla VI.5 (las concentraciones están en µg de sal / L).

Variable	Nivel basal	(+)	(-)
pH	3.3	3.6	3.0
CaCl <sub>2</sub>	0.125	0.2	0.05
MgSO <sub>4</sub>	1.05	1.2	0.9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	9.08	12.7	5.46
KI	1.4	1.96	0.84
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	1.4	1.96	0.84
CoCl <sub>2</sub>	2.1	2.94	1.26
MnSO <sub>4</sub>	45.015	58.82	25.21
ZnSO <sub>4</sub>	70.025	98.03	42.02
FeSO <sub>4</sub>	210.025	294	126.05
CuSO <sub>4</sub>	10.5	14.7	6.3

**Tabla VI.5:** valores de las 11 variables en el diseño de Plackett Burman

Junto con estos experimentos se realizaron cuatro repeticiones del cultivo en las condiciones basales para calcular el error estándar del estudio.

Los datos se analizan estadísticamente para identificar que variables tienen un efecto significativo sobre la expresión de PGasa. Inicialmente, el efecto de cada variable (i) respecto a su respuesta (E<sub>i</sub>) fue determinado restando el promedio de las respuestas de nivel bajo (-) del promedio de las respuestas de nivel alto (+) para cada parámetro. La forma más sencilla para calcular el efecto de las interacciones es a través del algoritmo de Yates<sup>33</sup> (Ver apéndice I)

Luego fue estimado el valor de t de Student para cada variable (E<sub>i</sub>)/S. Por último, el nivel de significancia del efecto de cada variable fue determinada empleando la

distribución t de Student (95% de confianza). Valores con significancia mayor de 80% fueron considerados como efectos significativos sobre la expresión de PGasa.

Exp.	pH	Ca	Mg	Mo	I	B	Co	Mn	Zn	Fe	Cu	Act PGasa
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	142.6
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	217.8
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	146.0
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	230.1
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	171.7
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	163.9
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	120.9
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	145.9
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	143.7
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	187.2
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	161.9
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	203.6
13	b*	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	220.8
14	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	202.0
15	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	219.0
16	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	213.0
Efecto	-52	16.5	3.57	4.7	9.1	-10	1.5	-5.3	-0.13	-29.4	-6.75	
t	-6.14	1.95	0.42	0.55	1.07	1.18	0.17	0.62	-0.02	-3.47	0.73	
Sign.	99%	80%	--	--	--	--	--	--	--	95%	--	

\* b = Nivel basal

**Tabla VII.5:** Diseño estadístico de Plackett Burman para el estudio de los microelementos.

La tabla VII.5 muestra los resultados de cada experimento, así como el efecto de cada variable, su valor de t y su valor de significancia. Por concisión sólo se pusieron como encabezado los elementos de interés y no las sales completas.

Teniendo en cuenta estos resultados, se realizó un diseño factorial completo de cuatro variables a dos niveles en el que se utilizaron como variables el pH, Fe, Ca y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Como cuarta variable se incluyó al K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ya que en estudios previos pareció tener cierta influencia sobre la expresión enzimática.

Exp N°	pH	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	FeSO <sub>4</sub>	Act
1	-	-	-	-	205
2	+	-	-	-	133.9
3	-	+	-	-	195.7
4	+	+	-	-	138.5
5	-	-	+	-	199.7
6	+	-	+	-	140.8
7	-	+	+	-	200.6
8	+	+	+	-	135
9	-	-	-	+	180.6
10	+	-	-	+	124.2
11	-	+	-	+	194.7
12	+	+	-	+	120
13	-	-	+	+	189.6
14	+	-	+	+	124
15	-	+	+	+	189.6
16	+	+	+	+	124.1

**Tabla VIII.5:** Diseño factorial completo de con los resultados de cada experiencia.

Los diseños factoriales completos permiten determinar interacciones entre variables además de efectos directos. La cantidad de experiencias a realizar en este caso es de  $2^4=16$ .

El diseño completo así como la actividad recuperada en cada caso se indica en la tabla VIII.5.

Los valores de cada variable fueron los siguientes: pH: +3.5, - 2.5;  $K_2HPO_4$ : + 1 g/L, - 0.5 g/L;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ : + 0.2 g/L, - 0.1 g/L;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ : + 210  $\mu$ g/L, - 105  $\mu$ g/L.

Para calcular el efecto sobre la expresión de PGasa de cada una de las variables así como de las interacciones entre ellas se procede de igual forma que con el diseño de Plackett Burman. En este caso fueron calculados utilizando el algoritmo de Yates. Las interacciones se indican en la tabla juntando los números de los factores individuales (p.e. la interacción entre pH y  $CaCl_2$  se indica como 13)

Factor	1	2	3	4	12	13	14	23	24	34	123	124	134	234	1234
Efecto	-64.38	0.05	1.35	-12.8	-1.38	0.48	-1.18	-1.25	2.45	0.6	-0.28	-3.18	-0.48	-1.2	4.88

**Tabla IX.5:** Efecto de las variables principales así como de las interacciones del diseño factorial completo (calculadas según el algoritmo de Yates).

Como en este tipo de ensayo no se utilizan replicados, no puede calcularse directamente la desviación estándar. Para resolver este problema, cuando se utiliza el algoritmo de Yates, se calcula la desviación estándar en base a los datos de las interacciones de tres o más componentes, bajo la suposición de que no son estadísticamente importantes. Con ese valor se calcula el valor de t de Student y con el la significancia de los datos.

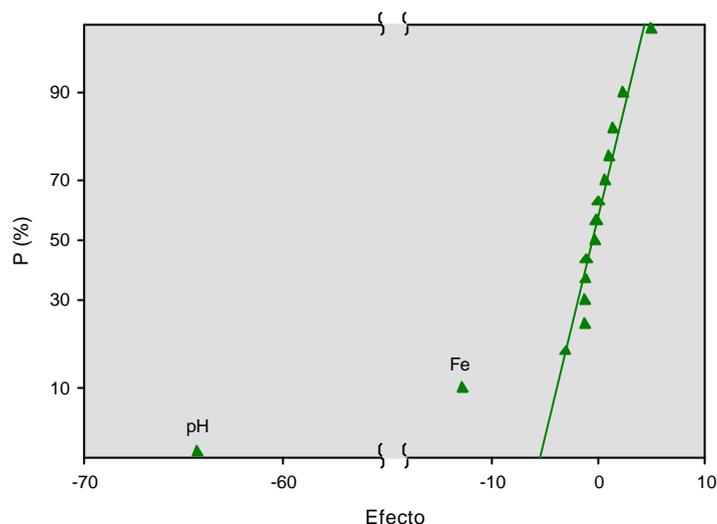
En algunos casos pueden encontrarse interacciones de orden mayor que dos, sobre todo en el caso de metales y pH por lo que en lugar de calcular la significancia por el método anteriormente descrito, se calculó realizando un gráfico de los efectos calculados por Yates sobre papel probabilístico normal<sup>33</sup>.

Para realizar un grafico en este tipo de escala se debe considerar a los 15 efectos, primarios y las interacciones, como pertenecientes a una distribución normal, se los ordena en forma creciente y a cada uno se le asigna un valor de probabilidad *p* (%) de la siguiente forma: se divide a la escala de ordenadas en 15 fracciones iguales y a cada unos de los efectos se lo ubica en el medio de dicha fracción, 3.3% para el primero, 10% para el segundo, etc. Luego se grafica *p* % en función del valor de cada efecto. Si los datos se han producido únicamente debido a una variación aleatoria (aproximadamente normal) y los cambios en el nivel de las variables no tuvieron ningún efecto sobre la expresión de PGasa, el grafico de *p* % en función de los efectos ordenados en forma creciente será, en papel probabilístico normal, una línea recta.

Si alguno de los puntos no cae dentro de dicha recta, significa que el efecto de esa variable es significativo. En la figura 11.5 se muestra la representación de los datos del diseño factorial.

Puede verse que sólo el pH y el Fe tienen un efecto significativo sobre la actividad enzimática. El resto de los efectos, tanto primarios como superiores, se ajustan muy bien a una línea recta, lo que indica que sus valores pueden ser explicados simplemente por una dispersión estadística.

Teniendo en cuenta estos resultados, se realizó un estudio de superficie de respuesta a fin de seleccionar una composición de microelementos que optimizara la producción de enzima. Para tal fin se utilizó el diseño realizado por Doehlert<sup>6</sup>.



**Figura 11.5:** Efecto de las diferentes variables e interacciones sobre la actividad PGasa. Las medidas que caen sobre la línea recta no poseen significancia estadística ya que no pueden ser separadas del “ruido”.

Los métodos de superficie de respuesta permiten encontrar con pocos experimentos la zona en la que se magnifica la expresión de la enzima que se busca. Si el ensayo se realiza en una zona alejada del máximo la superficie suele ser plana y puede ser representada por un polinomio lineal. La dirección que marca la máxima pendiente de dicha superficie indica cual es la zona en la que hay que realizar el próximo ensayo.

Teniendo en cuenta los resultados del diseño factorial y considerando que el  $Zn^{+2}$  resultó de importancia en ensayos anteriores, el primer diseño de Doehlert se realizó teniendo al pH, el  $Fe^{+2}$  y  $Zn^{+2}$  como variables. En este caso se tomaron los siguientes valores para centrar el polígono de Doehlert: pH 3.5, Fe 0.5 mg/L (como sal) y Zn 60  $\mu$ g/L (como sal). Los valores del resto de los ensayos, así como los valores de actividad enzimática se muestran en la tabla X.5.

Ensayo	pH	Fe	Zn	pH	Fe	Zn	Actividad PGasa (U/mL)
	Codificado	Codificado	Codificado		mg/L	$\mu$ g/L	
1	-0.816	-0.5	-0.289	2.5	0.35	43.31	187.7
2	-0.816	0	0.577	2.5	0.50	93.31	165.4
3	-0.816	0.5	-0.289	2.5	0.65	43.31	164.3
4	0	-1	0	3.5	0.20	60.00	156.3
5	0	-0.5	-0.866	3.5	0.35	10.00	80.9
6	0	-0.5	0.866	3.5	0.35	110.00	162.6
7	0	0.5	0.866	3.5	0.65	110.00	132.9
8	0	0.5	-0.866	3.5	0.65	10.00	143.5
9	0	1	0	3.5	0.80	60.00	157.5
10	0.816	-0.5	0.289	4.5	0.35	76.69	116.2
11	0.816	0	-0.577	4.5	0.50	26.69	86.4
12	0.816	0.5	0.289	4.5	0.65	76.69	112.5
13	0	0	0	3.5	0.50	60.00	149.3
14	0	0	0	3.5	0.50	60.00	156.7
15	0	0	0	3.5	0.50	60.00	156.4

**Tabla X.5:** Diseño de Doehlert para tres variables, pH, Fe y Zn.

Los valores de los coeficientes para el polinomio obtenido con estos datos así como los valores del análisis de variancia se observan en la tabla XI.5.

	Valor	P
Constante	154.13	
A (pH)	-41.32	0.0026
B (Fe)	1.025	0.6729
C (Zn)	17.89	0.0134
AA	-15.51	0.0507
AB	30.94	0.0292
AC	14.60	0.1142
BB	2.77	0.5445
BC	-53.29	0.0081
CC	-33.14	0.0131
Falta de ajuste		0.0911

$$R^2 = 0.95$$

**Tabla XI.5:** Análisis de variancia de la experiencia de superficie de respuesta según Doehlert para tres variables.

En la tabla puede observarse que hay 5 términos (6 si consideramos AA) con valores de P menor que 0.05 lo que indica que poseen valores significativos con una confianza del 95 %.

Puede verse que el Fe no posee un efecto significativo aunque si es significativo su efecto combinado con el pH (AB) y con el Zn (BC). El Zn en cambio si posee un efecto significativo siendo éste positivo. Este resultado concuerda con el encontrado cuando se quitaron los metales de a uno en el medio de referencia diluido (Fig. 10.5). El modelo posee un ajuste aceptable ya que la falta de ajuste (lack off fit) no es representativa ( $p > 0.05$ ). El polinomio resultante es:

$$PGasa = 154.13 - 41.32 \cdot pH + 17.89 \cdot Zn - 15.51 \cdot pH^2 + 30.94 \cdot pH \cdot Fe - 53.29 \cdot Fe \cdot Zn - 33.14 \cdot Zn^2$$

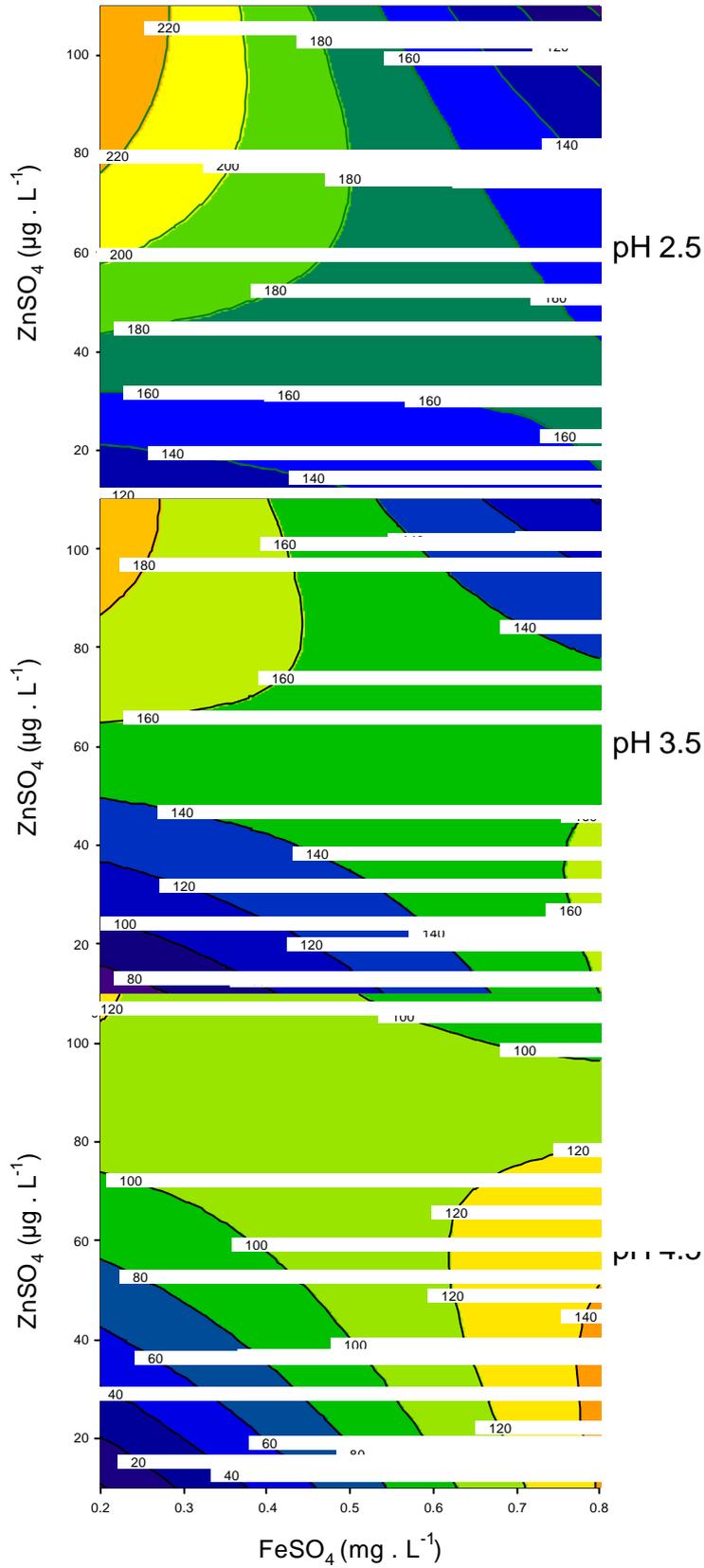
A partir de este polinomio se calculó la actividad resultante para tres valores de pH, 2.5, 3.5 y 4.5, y con esos valores se realizaron gráficos de actividad en función del Fe y Zn (figura 12.5).

Puede verse claramente que a medida que el pH disminuye, todas las curvas dan valores más altos de actividad enzimática. A pH 4.5 la actividad depende más del Fe que a pH más ácidos y la relación entre actividad y Fe se invierte siendo directamente proporcionales a pH 4.5. Este comportamiento es esperable dado que, mientras menos ácido es el medio, menor es la disponibilidad de Fe debido a la hidrólisis.

A valores bajos de pH, el efecto del  $Zn^{+2}$  sobre la expresión de PGasa disminuye y los mayores cambios en la actividad enzimática se observan con la disminución de la concentración de  $Fe^{+2}$ .

Teniendo en cuenta estos datos, se realizó un nuevo diseño manteniendo constante la concentración de  $Zn^{+2}$  en 60  $\mu g / L$  y tomando como variables pH y [Fe]. Como la actividad enzimática fue mayor a valores bajos de pH y de [Fe], se realizó el diseño centrado el hexágono a valores de pH inicial y  $[Fe^{+2}]$  de 3.3 y 0.2 mg/L (como sal) respectivamente a fin de barrer los valores cercanos al máximo de la experiencia anterior. Se tomaron tres valores de Fe y cinco de pH.

Los valores utilizados en dicho ensayo así como los valores de actividad enzimática encontrados se muestran en la tabla XII.5.



**Figura 12.5:** Efecto del pH y la concentración de Fe y Zn sobre la actividad PGasa calculado en base al diseño de Doehlert.

El valor de la muestra 7 resulta extremadamente baja en comparación con el resto pero esto es debido a que *G. klebahnii* no puede crecer a ese valor de pH. A pesar de no tener todos los datos del modelo se puede observar claramente que dentro del rango de concentraciones de Fe analizadas, no hay efecto observable de esta variable sobre la actividad enzimática. Las muestras 5 y 9 y las 6 y 8, que tienen igual pH entre si y diferente concentración de Fe poseen prácticamente la misma actividad. Evidentemente en estas condiciones de crecimiento, sólo el pH tiene efecto sobre la actividad enzimática.

Muestra	pH	Fe mg / L	pH	Fe mg / L	Dilución del Fe*	Actividad PGasa U / mL
	Codificado	Codificado	Real	Real		
1	0	0	3.3	0.2	1:75	181.8
2	0	0	3.3	0.2	1:75	174.4
3	0	0	3.3	0.2	1:75	174.8
4	1	0	4.3	0.2	1:75	95.3
5	0.5	0.866	3.8	0.25	1:60	110.6
6	-0.5	0.866	2.8	0.25	1:60	219.0
7	-1	0	2.3	0.2	1:75	38.1
8	-0.5	-0.866	2.8	0.15	1:100	236.0
9	0.5	-0.866	3.8	0.15	1:100	112.6

\*Con respecto a la concentración en el MR

**Tabla XII.5:** Condiciones de cultivo y actividad PGasa recuperada en el primer ensayo de dos variables según el diseño de Doehlert.

Esta dependencia con una sola de las variables es muy común encontrarla en zonas alejadas del máximo, en este caso una superficie plana se ajusta bien a la realidad <sup>33</sup>. Para centrar la nueva superficie de respuesta, el paso siguiente es moverse hacia una zona en la que la segunda variable posea algún efecto. Esto se hace generalmente siguiendo la línea que marca la mayor pendiente de la superficie pero en este caso en particular no se puede hacer eso ya que esa técnica nos llevaría hacia zonas más ácidas que las de esta experiencia y eso no permitiría el crecimiento microbiano.

Muestra	pH	Fe mg / L	pH	Fe mg / L	Actividad PGasa U / mL
	Codificado	Codificado			
1	0	0	3.5	0.5	103.0
2	0	0	3.5	0.5	101.5
3	0	0	3.5	0.5	107.8
4	1	0	4.5	0.5	71.0
5	0.5	0.866	4.0	0.75	81.4
6	-0.5	0.866	3.0	0.75	158.5
7	-1	0	2.5	0.5	156.8
8	-0.5	-0.866	3.0	0.25	171.7
9	0.5	-0.866	4.0	0.25	91.3

**Tabla XIII.5:** Condiciones de cultivo y actividad PGasa recuperada en el segundo ensayo a dos variables según el diseño de Doehlert.

Dado que no se encontró ningún efecto del Fe sobre la actividad en este rango de concentraciones y experimentos anteriores mostraron que dicho elemento es importante para la expresión de la enzima (Figuras 9.5, 10.5 y 12.5) se realizó el siguiente

experimento ubicando el hexágono en concentraciones mayores de Fe y además se elevó un poco el valor central del pH para que la muestra del extremo más ácido del hexágono no sufra inhibición del crecimiento. Los valores centrales elegidos fueron pH 3.5 y  $[Fe] = 0.5 \text{ mg/L}$ . Los valores de los siete puntos experimentales, así como la actividad PGasa obtenida en cada caso se muestran en la tabla XIII.5.

Este ligero incremento en el pH hace que el *G. klebahnii* pueda crecer en todas las condiciones de cultivo. Puede verse que en este rango de Fe y pH las dos variables influyen sobre el valor de la actividad enzimática recuperada aunque se observa que el incremento en función de la disminución del pH es mucho más importante que en función del Fe.

El análisis de varianza para este conjunto de datos se muestra en la tabla XIV.5.

	Coefficiente de regresión	P
Constante	104.4	
<b>A : pH</b>	<b>-54.9</b>	<b>0.0011</b>
B : Fe	-6.71	0.0685
AA	9.5	0.0819
AB	1.9	0.6563
<b>BB</b>	25.6	<b>0.0130</b>
Falta de ajuste		0.0117
$R^2 = 0.919$		

**Tabla XIV.5:** Análisis de varianza de la superficie de respuesta según el diseño de Doehlert para dos variables.

Puede observarse que sólo el pH y el Fe al cuadrado tienen peso como variable ya que sus valores de P son los únicos menores de 0.05. El modelo tiene una falta de ajuste (Lack-off-fit) significativa ( $P < 0.05$ ), a pesar de ello, puede aceptarse ya que  $r^2 = 0.91$ , lo que indica que la superficie estima bien los valores de actividad enzimática<sup>34</sup>. Box y Draper<sup>35</sup> indican que si la cantidad de datos incluidos en el análisis es elevada, un modelo con una falta de ajuste significativa pero con un  $R^2$  elevado puede ser usado. En estas condiciones de cultivo no puede encontrarse un máximo absoluto ya que la tendencia indica un aumento de actividad cuando *G. klebahnii* crece a valores de pH menores pero cuando el pH inicial disminuye de 2.5, el crecimiento se detiene.

El polinomio resultante queda:

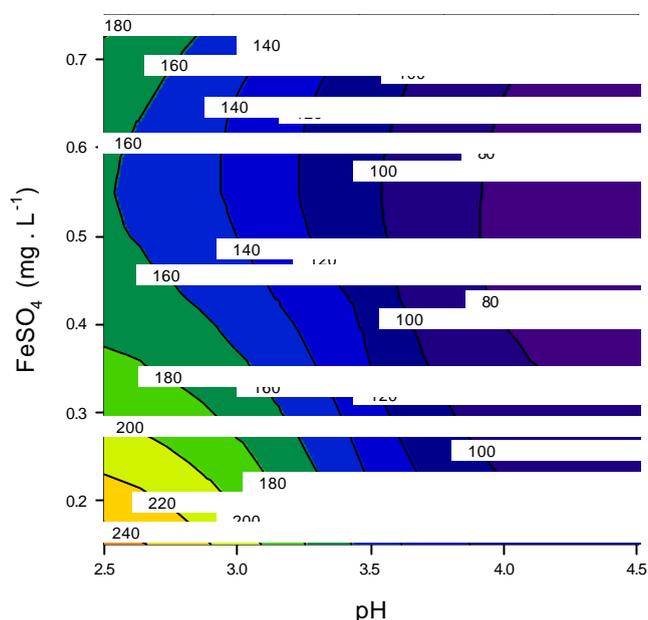
$$\text{Act PGasa} = 104.4 - 54.9 \times \text{pH} + 25.6 \times \text{Fe}^2.$$

Los datos obtenidos en los dos experimentos son coherentes uno con otro por lo que se pueden usar juntos en una gráfica de contorno de actividad enzimática en función de la concentración de Fe y del pH (figura 13.5).

En la figura se observa que la actividad enzimática aumenta cuando el pH disminuye pero el cambio es mucho menor cuando varía la concentración de Fe. Lo mismo se observa en los datos del análisis de varianza, sólo el pH es significativo en estas condiciones.

Cabe observar que en la figura 12.5, a valores de  $[Zn^{+2}]$  de  $60 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , las actividades enzimáticas son muy semejantes a las encontradas en la figura anterior para iguales valores de pH y Fe. Dado que son experimentos completamente independientes,

este resultado permite pensar que los polinomios obtenidos en cada caso son representativos de la realidad.



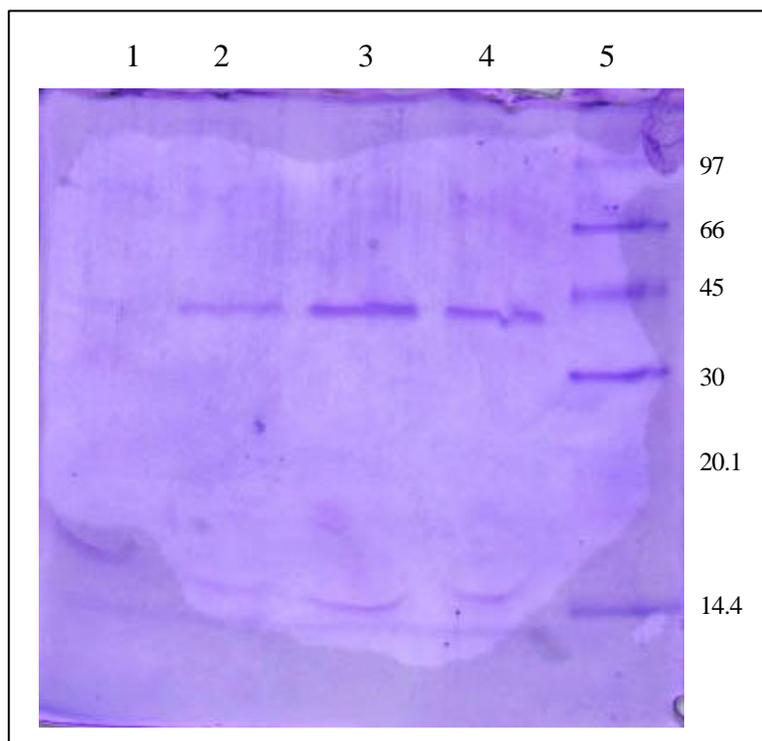
**Figura 13.5:** Efecto del pH y de la concentración de  $\text{Fe}^{+2}$  sobre la actividad PGasa.

Por medio de ensayos sencillos llevados a cabo en batch, se pudo incrementar la expresión de la enzima en un factor de 20, desde las 10 U/mL encontradas en el medio de referencia hasta obtener más de 200 U/mL en las condiciones optimizadas.

Para verificar que el efecto de los cambios en el medio de cultivo fueran sobre la expresión de PGasa y no sobre su actividad o sobre la expresión de una segunda enzima pectolítica que resultara en un artefacto de medida se realizó un SDS-PAGE del sobrenadante de algunas de las muestras obtenidas en estos ensayos. Para tal fin se realizó una centrifugación del cultivo al final de la fase de crecimiento y se sembraron 40  $\mu\text{L}$  del sobrenadante sin dilución. Los resultados obtenidos pueden verse en la figura 14.5.

En las calles 1 y 2 se sembraron muestras de sobrenadantes de un cultivo en MR. La calle 1 corresponde a una muestra tomada a mitad del cultivo ( $6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) y en la 2 la muestra se tomó al finalizar el cultivo ( $15 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). En las calles 3 y 4 se sembraron sobrenadantes de los cultivos 7 y 9 de la tabla XIII.5 ( $156$  y  $91 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  respectivamente). En la calle 5 se sembraron los patrones de PM.

Como puede verse el sobrenadante de cultivos de *G. klebahnii* presenta una única banda proteica que se corresponde por el PM con la PGasa-SE (43 KD) <sup>36</sup>. En la figura se ve claramente que la actividad enzimática es proporcional a la cantidad de proteína encontradas en el sobrenadante.



**Figura 14.5:** SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivos de *G. klebahnii* con diferente actividad enzimática. En las calles 1 a 4 se sembraron muestras sin diluir con actividades de 6, 15, 156 y 91 U · mL<sup>-1</sup> respectivamente.

Debido a estos resultados, puede asegurarse que las variaciones encontradas en la actividad enzimática frente a las diferentes variables ensayadas se debe a la acción de los cambios realizados sobre la expresión de PGasa.

Teniendo en cuenta el incremento en la producción de enzima conseguido durante la investigación reportada, se propone el siguiente medio de cultivo para maximizar la producción de PGasa:

Componente	Concentración
Glucosa	5 g/L
Urea	0.6 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/L
Cítrico	0.45 g/L
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1 g/L
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.6 g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> ·	60 µg/L
Vitaminas	1 mL/L (del stock)
pH inicial	2.5

**Tabla XV.5:** Medio de cultivo optimizado para la obtención de PGasa.

Al medio no se le incorpora la solución de aniones ni Co (ya que no tienen ningún efecto), Mn y Cu (que son deletéreos para la expresión de la enzima).

## 5.4 Apéndice I

### **Cálculo de los efectos primarios y secundarios en un diseño factorial mediante el algoritmo de Yates.**

En esta parte del capítulo se explica como calcular los efectos causados por ciertas variables sobre algún parámetro medible de un proceso. Para mayor información se recomienda el capítulo 10 de “Estadística para investigadores” de Box, Hunter y Hunter <sup>33</sup>.

Un diseño factorial permite estudiar el efecto positivo o negativo que cierto número de variables tienen sobre una determinada propiedad de un sistema experimental. Para ello, las distintas variables a estudiar se fijan en dos valores arbitrarios, uno alto (+) y uno bajo (-). Los diseños factoriales se dividen en dos categorías, completos y fraccionarios. En los primeros, las variables (+) y (-) deben combinarse en todas las formas posibles y por lo que el número de ensayos que son requeridos es  $2^n$  donde n es el número de variables estudiadas. Este tipo de estudios tiene la ventaja que permite estudiar directamente el efecto de las diferentes variables en forma independiente así como de todas las combinaciones posibles. El inconveniente que tienen es que requieren un número muy alto de ensayos independientes, esto los hace muy difíciles de realizar para más de 5 variables.

A diferencia de estos, en los diseños factoriales fraccionarios sólo se toman algunas combinaciones de valores decrecidos e incrementados de todas las variables. Esto hace que sea muy sencillos de realizar pero no permiten, en general, calcular las interacciones superiores entre los diferentes efectos estudiados. Qué combinaciones de variables se utilizan depende del diseño utilizado pero en todos los casos los efectos resultantes se calculan de la misma forma. En todos los casos se realizan una suma algebraica de los efectos positivos y los negativos y estas sumas, divididas por la varianza del método se comparan con el valor de t deseado <sup>33</sup>.

El algoritmo de Yates es un procesamiento matemático que permite calcular dichos efectos primarios y secundarios de una forma muy sencilla.

La utilización del algoritmo en un diseño factorial completo se explica tomando como ejemplo el experimento citado en la tabla IX de este capítulo en el que se estudia el efecto de pH,  $K_2HPO_4$ ,  $CaCl_2$  y  $FeSO_4$  sobre la actividad de PGasa. Para facilitar el seguimiento de los números, se transcribe la tabla IX como tabla I del apéndice.

Para poder utilizar el algoritmo de Yates las observaciones deben ser ordenadas de forma estándar. Un diseño factorial está en orden estándar cuando, como en la tabla XVI.5 la primera columna de la matriz del diseño consta de signos + y - alternados; la segunda, alternados de dos en dos; la tercera de cuatro en cuatro y así sucesivamente.

En general, la columna k-esima consta de  $2^{k-1}$  signos menos seguidos de  $2^{k-1}$  signos más. En la tabla también se indica el valor obtenido en cada experimento independiente.

Para calcular los efectos producidos por las diferentes variables y sus interacciones se debe realizar la suma algebraica del valor de cada experimento con el signo que le corresponde según la tabla de diseño. A fin de saber que signo le corresponde a las diferentes interacciones se multiplican las columnas de las distintas variables según sea la combinación (Tabla XVII.5).

Una vez que se calcula el signo correspondiente para cada celda (experimento / interacción) el efecto de cada interacción se calcula multiplicando cada columna por la columna de los resultados (para obtener cada valor con el signo que le corresponde en

cada caso) y luego realizando la suma algebraica para cada columna y dividiendo el resultado de la suma por el factor que le corresponda en cada caso. Para un ensayo de  $n$  variables ( $2^n$  experimentos) el divisor en cada columna vale  $2^n$  para la media de los efectos y  $2^{n-1}$  para el resto. En la tabla XVI.5 se observa el resultado de dicha operación.

Exp N°	pH	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	FeSO <sub>4</sub>	Act
1	-	-	-	-	205.0
2	+	-	-	-	133.9
3	-	+	-	-	195.7
4	+	+	-	-	138.5
5	-	-	+	-	199.7
6	+	-	+	-	140.8
7	-	+	+	-	200.6
8	+	+	+	-	135.0
9	-	-	-	+	180.6
10	+	-	-	+	124.2
11	-	+	-	+	194.7
12	+	+	-	+	120.0
13	-	-	+	+	189.6
14	+	-	+	+	124.0
15	-	+	+	+	189.6
16	+	+	+	+	124.1

**Tabla XVI.5:** ordenamiento de los datos en un diseño factorial fraccionario en orden estándar.

Para verificar si los efectos de las diferentes variables son significativos, sus valores deben ser comparados con el valor de la desviación de la medida ( $\sigma$ ) o su estimador muestral  $S$ . Como en este tipo de experimentos es común que no existan duplicados, normalmente no existe un valor de  $S$  verdadero sacado del promedio de las varianzas de las repeticiones de los ensayos independientes. Para solucionar este problema se hace una serie de suposiciones, la más importante de las cuales es que no existen interacciones de orden superior a dos por lo que esos valores medirán diferencias debidas al error experimental.

En el caso del ejemplo los valores de dichos efectos son  $-0.28$ ,  $-3.18$ ,  $-0.48$ ,  $-1.2$  y  $4.88$ .

Una vez seleccionados los valores de los efectos, se calcula la suma de los efectos al cuadrado y se divide por el número de interacciones tomadas en cuenta, en este caso 5 y se le calcula la raíz cuadrada. Este dato representa la desviación típica del experimento. En este caso resulta ser 2.67. Con este número se puede calcular el valor de  $t$  para cada efecto particular como  $t = E_i / S$ . Una vez calculado el valor de  $t$  puede decidirse si un determinado efecto es significativo o no.

Exp.		1	2	3	4	12	13	14	23	24	34	123	124	134	234	1234	Res
1	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	205
2	1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	133.9
3	1	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	195.7
4	1	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	138.5
5	1	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	199.7
6	1	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	140.8
7	1	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	200.6
8	1	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	135
9	1	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	180.6
10	1	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	124.2
11	1	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	194.7
12	1	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	120
13	1	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	189.6
14	1	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	124
15	1	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	189.6
16	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	124.1
Divisor	16	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Efecto		-64.28	0.05	1.35	-12.8	-1.38	0.48	-1.18	1.25	2.45	0.6	-0.28	-3.18	-0.48	-1.2	4.88	
t		-24.7	0.01	0.506	-4.79	-0.517	0.179	-0.442	0.468	0.917	0.225	-0.11	-1.90	-0.18	-0.45	1.82	

**Tabla XVII.5:** Tabla de calculo de efectos según el diseño de Yates para las variables independientes y sus inteacciones.



## 5.6 Referencia bibliográfica

1. **Iguchi, K., M. Kishida, and T. Sakai.** 1996. Purification and characterization of three extracellular protopectinases with polygalacturonase activities from *Trichosporon penicillatum*. *Biosc. Biotech. Biochem* **60**:603-607.
2. **Pardo, C., M. A. Lapeña, and M. Gacto.** 1991. Purification and characterization of an extracellular exopolygalacturonase from *Geotrichum lactis*. *Can. J. Microbiol.* **37**:974-977.
3. **Blanco, P., C. Sierio, A. Diaz, and T. G. Villa.** 1994. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* **40**:974-977.
4. **Bergmeyer, H. U. and E. Bernt.** 1977. *Methods of enzymatic analysis.* Academic press, New York.
5. **Plackett, R. L. and J. P. Burman.** 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* **33**:305.
6. **Doehlert, D. H.** 1970. Uniform shell designs. *Applied Statistics* 231-239.
7. **Schwam, R. F. and A. H. Rose.** 1994. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *J. Appl. Bacteriol.* **76**:62-67.
8. **Blanco, P., C. Sierio, and T. G. Villa.** 1999. Production of pectic enzymes in yeast. *FEMS Microbiology Letters* **175**:1-9.
9. **Federici, F.** 1985. Production, purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var *albidus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **51**:139-150.
10. **García-Garibay, M., L. Gomez-Ruiz, and E. Bárzana.** 1987. Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotech. Lett.* **9**:411-416.
11. **Ponzo, J. and W. Weigand.** 1991. Simple structured model for  $\alpha$ -amylase synthesis by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnology and Bioengineering* **38**:1065-1081.
12. **Zetelaki, K.** 1976. Optimal carbon source concentration for pectolytic enzyme formation of *Aspergilli*. *Process Biotechnology* 11-18.
13. **Contreras Esquivel, J. C., R. A. Hours, C. E. Voget, and C. F. Mignone.** 1999. *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88**:48-52.
14. **Aguilar, G. and C. Huitrón.** 1990. Constitutive exo - pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon source. *Biotech. Lett.* **12**:655-660.
15. **Priest, F. G.** 1985. Extracellular enzymes, p. 587-604. *In* A. Bull and H. Dalton (eds.), *Comprehensive Biotechnology.* Ontario.
16. **Weast, R.** 1977. *Handbook of Chemistry and physics.* Cleveland.
17. **Aguilar, G., B. A. Trejo, J. M. García, and C. Huitrón.** 1991. Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Can. J. Microbiol.* **37**:912-917.
18. **Beveridge, T. J., M. N. Hughes, H. Lee, K. T. Leung, R. K. Oole, I. Savvaidis, S. Silver, and J. T. revors.** 1997. Metal-microbe interactions: Contemporary approaches. *Adv. Microbiol. Physiol.* **38**:176-243.

19. **Mizusawa, K., E. Ichishima, and F. Yoshida.** 1966. Studies on proteolytic enzymes of thermophilic *Streptomyces*. Agric. Biol. Chem. **30**:35-41.
20. **Gadd, G.** 1993. Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. FEMS Microbiology Reviews **11**:297-316.
21. **Jones, R. P. and P. F. Greenfield.** 1984. A review of yeast ionic nutrition. Part I: growth and fermentation requirements. Process Biotechnology **4**:48-60.
22. **Mandels, M. and E. Reese.** 1956. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. Noloze **73**:269-278.
23. **Desrochers, M., L. Lurasek, and M. Paice.** 1980. Production of cellulase,  $\beta$ -Glucosidase and Xylanase by *Schizophyllum commune* grown on a cellulose-peptone medium. Dev. Ind. Microbiol. **22**:675-684.
24. **Mukherjee S.K. and S. K. Majumdar.** 1974. Effect of mineral on the production of pectinases by *Aspergillus niger*. Zbl. Bakt. Abt. **129**:410-414.
25. **Tobey, J. and A. Yousten.** 1976. Factors affecting the production of amylase by *Bacillus thuringiensis*. Dev. Ind. Microbiol. **18**:499-510.
26. **Channe, P. S. and J. G. Shewale.** 1995. Pectinase production by *Sclerotium rolfsii*: effect of culture conditions. Folia Microbiol. **40**:111-117.
27. **Zetelaki-Horvath, K. and E. Bekassy-Molnar.** 1975. Factors affecting polygalacturonase yield and kinetic of enzyme production by *Aspergillus awamori*. Acta alimentaria **4**:167-179.
28. **Chaudhuri, B. K. and V. Sahai.** 1993. Production of cellulase enzyme from lactose in batch and continuous cultures by a partially constitutive strain of *Trichoderma reesei*. Enzyme Microb. Technol. **15**:513-518.
29. **Morita, H. and Y. Fujioi.** 1999. Polygalacturonase production of *Rhizopus* sp. MKU 18 using a metal-ion-regulated liquid medium. J. Gen. Appl. Microbiol. **45**:199-201.
30. **Castro, P., P. Hayter, A. Ison, and A. Bull.** 1992. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**:84-90.
31. **Kisaalita, W., P. Slininger, and R. Bothast.** 1993. Defined media for optimal pyoverdine production by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Appl. Microbiol. Biotechnol. **39**:750-755.
32. **Silman, R., T. Nelsen, and R. Bothast.** 1991. Comparison of culture methods for production of *Colletotrichum truncatum* spores for use as a mycoherbicide. FEMS Microbiology Letters **79**:69-74.
33. **Box, G., W. Hunter, and J. Hunter.** 1989. Estadística para investigadores. Barcelona.
34. **Taragano, V. M. and A. Pilosof.** 1999. Application of Doehlert designs for water activity pH and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. Enzyme Microb. Technol. **25**:411-419.
35. **Box, G. and N. Drapper.** 1987. Empirical model-building and response surfaces. New York.
36. **Sakai, T. and M. Okushima.** 1982. Purification and crystallization of protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. Agriculture, Biology and Chemistry **46**:667-676.

## CAPITULO 6

### Expresión de PGasa en cultivo continuo.

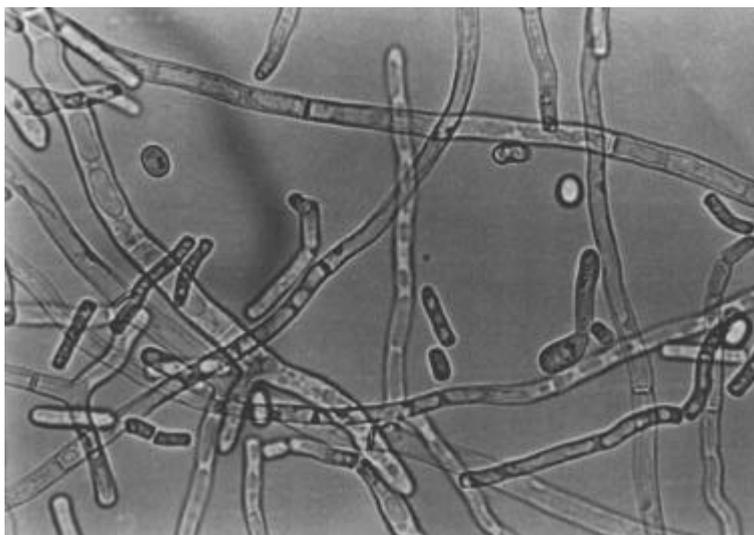
#### 6.1 Introducción.

Una vez determinados los parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de *G. klebahnii* (capítulo cuatro), así como la expresión de PGasa en sistema batch (capítulo cinco), se procedió a estudiar el efecto sobre la expresión enzimática de distintas variables en cultivo continuo. Este sistema de cultivo, tal como se comentó en el capítulo cuatro, posee la enorme ventaja de que permite diferenciar los cambios fenotípicos (expresión de alguna enzima, generación de productos, etc) generados por una variación en la composición del medio o en las condiciones de cultivo de aquellos que se generan a través de cambios en la velocidad específica de crecimiento causados a su vez por los cambios realizados en el medio.

Como se demostró en el capítulo cuatro, el medio de referencia (MR) puede sostener el crecimiento de *G. klebahnii* por lo que fue utilizado como base para los estudios realizados para el presente capítulo. Sobre él se realizaron las variaciones en cada caso.

La producción de enzimas puede ser reguladas en forma positiva o negativa por mecanismos de control tales como inducción, inhibición por retroalimentación y represión catabólica. La síntesis de muchas enzimas es fuertemente reprimida cuando el microorganismo crece en azúcares fácilmente fermentables

*G. klebahnii* es un hongo levaduriforme pleomórfico y durante el crecimiento cambia notablemente su morfología. Dependiendo de las condiciones de cultivo y de la limitación puede modificar su forma de células levaduriformes aisladas hasta una forma micelial con pocas ramificaciones. Ejemplos de dicho cambio pueden observarse en la figura 1.6. Estos cambios de forma fueron estudiados en cultivo continuo para verificar si existe alguna relación entre la forma predominante y los niveles de actividad enzimática.





**Figura 1.6:** Forma micelial y celular del *G. klebahnii*.

Las razones de este cambio morfológico no son claras pero suelen estar asociado a situaciones de stress. Tal es el caso de *Kluyveromyces marxianus*<sup>10</sup> o *Saccharomyces cerevisiae*<sup>12</sup> creciendo bajo limitación por nitrógeno. *Debaryomyces hansenii* creciendo en cultivo continuo con xilosa como fuente de carbono cambia de forma levaduriforme a micelial por disminución de la tensión de O<sub>2</sub> y este cambio es completamente reversible. *Candida utilis* tiende a formar pseudomicelio cuando la concentración de nitrógeno disminuye en el medio de cultivo<sup>8</sup>.

## **6.2 Materiales y métodos**

### **6.2.1 Cepa.**

En todos los ensayos realizados se utilizó el *Geotrichum klebahnii* ATCC 42397

### **6.2.2 Mantenimiento de la cepa.**

Los medios y protocolos de mantenimiento de la cepa son los mismos que los vistos en capítulo de estequiometría del crecimiento.

### **6.2.3 Medios de cultivo.**

Medio de referencia (MR): Se utilizó como referencia el mismo medio que en el capítulo arriba mencionado y sobre él se realizaron las variaciones pertinentes.

### **6.2.4 Cultivos:**

Al igual que en el capítulo anterior se utilizó un biorreactor Inceltech LH serie 210 con control automático de pH por electrodo de vidrio (Mettler Toledo) y de temperatura (resistencia interna y refrigeración por serpentín). Además posee monitoreo on line

(aunque no control automático) de O<sub>2</sub> por electrodo polarográfico Mettler.

El reactor posee un adquisidor de datos con el que se registra en tiempo real el valor de temperatura, O<sub>2</sub> y pH. Esto permite observar cualquier posible alteración debido a problemas eléctricos o mecánicos que pudieran ocurrir durante periodos en los que el cultivo este sin atención.

El protocolo de trabajo fue el mismo que para los estudios sobre cinética y estequiometría del crecimiento. Al igual que el caso de los cultivos batch la separación de biomasa para posterior determinación enzimática se realizó por centrifugación y no por filtración debido a la adsorción casi cuantitativa de la enzima en las membranas de acetato de celulosa. Las muestras se guardaron en tubos de vidrio a -18 °C hasta su análisis.

### **6.2.5 Medida de actividad enzimática.**

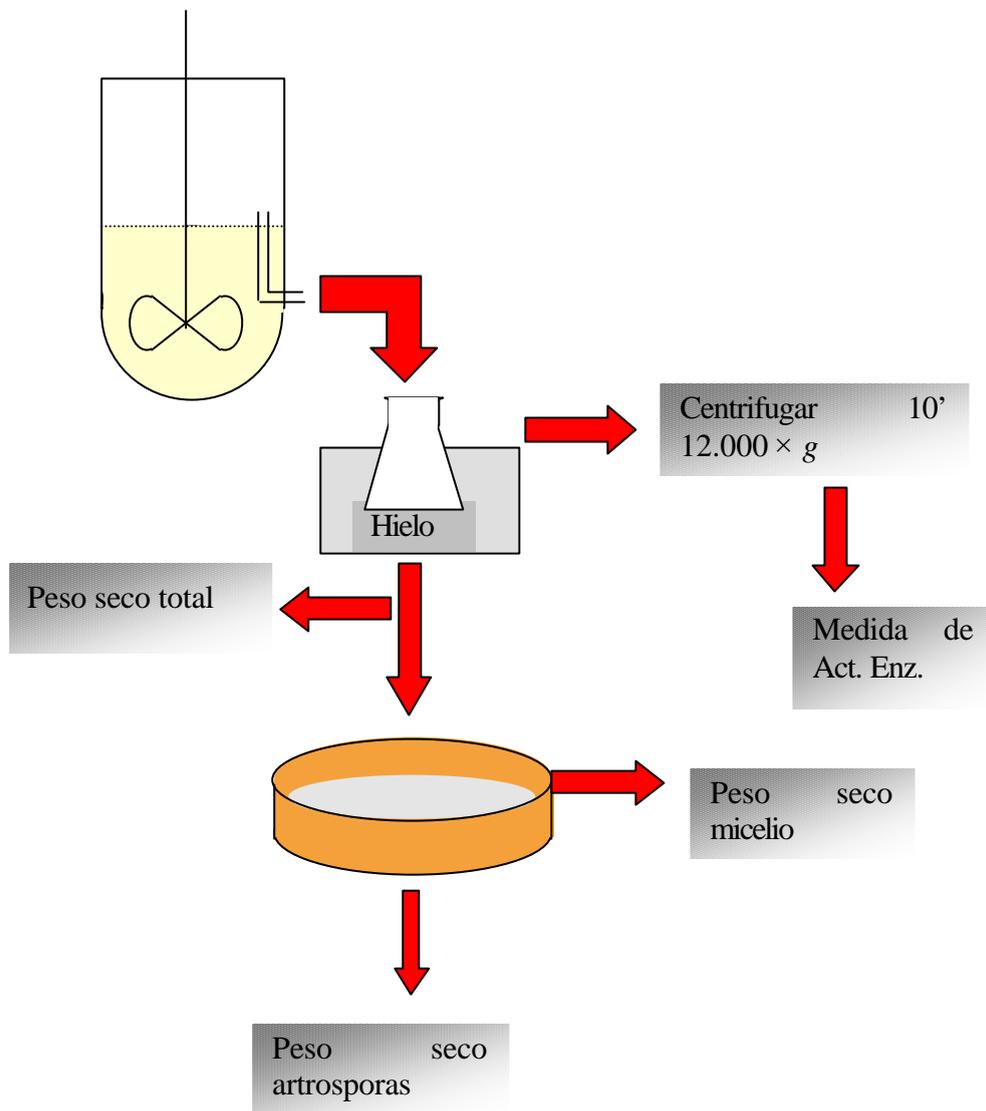
La actividad enzimática se determinó mediante la técnica de PGasa, descrita en el capítulo tres.

### **6.2.6 Cambios en la morfología celular.**

El cambio en la morfología se siguió por observación microscópica y se cuantificó según el siguiente protocolo.

La muestra ( $\cong$  250 mL exactamente medidos) se filtró por un tamiz de malla 230 (abertura = 65  $\mu$ ) para separar la biomasa en 2 tipos en función del tamaño de los diferentes tipos morfológicos. La biomasa retenida en el tamiz se lavó con H<sub>2</sub>O (d), se resuspendió y se llevó a volumen. Se utilizaron alícuotas de volúmenes apropiados del retenido (formas de tamaño “grande” o micelio), del filtrado (formas de tamaño “chico” o artrosporos) y de muestras del cultivo sin filtrar (biomasa total) para la determinación de los respectivos pesos secos por filtrado a través de membrana de 0,45  $\mu$  de poro (E04WP04700, MSI, USA). La biomasa retenida se lavó y secó a peso constante a 80°C. Un esquema de la operación de separación de formas celulares se muestra en la figura 2.6.

En el caso de que se quisiera utilizar a biomasa obtenida de cada fracción en algún cultivo subsiguiente, la muestra se tomo en un erlenmeyer estéril, todo el material utilizado se lavó convenientemente con etanol al 70 % y la operación de separación se realizó en el banco de flujo laminar.



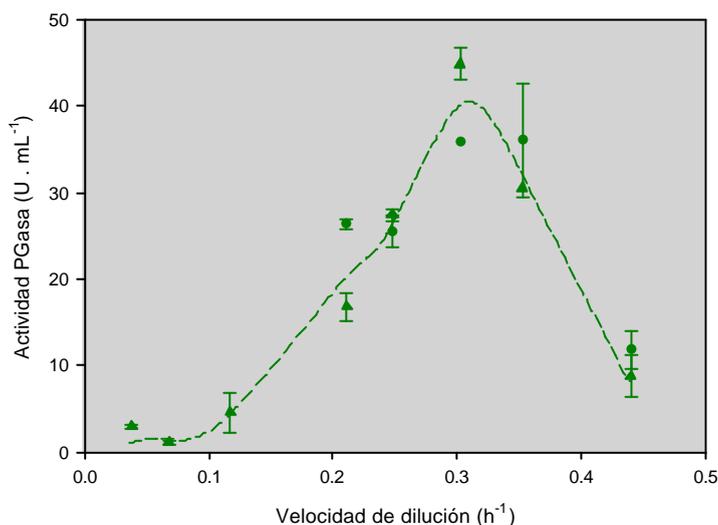
**Figura 2.6:** Esquema operativo de la separación de formas celulares y miceliales de *G. klebahnii*.

## 6.3 Resultados y Discusión

### 6.3.1 Efecto de la velocidad de dilución.

La primera variable estudiada fue la relación entre la velocidad específica de producción de PGasa en relación con la velocidad específica de crecimiento. Para tal fin se realizaron tres cultivos continuos con el medio de referencia en los que se fue modificando la velocidad de dilución (D). A modo de duplicado, los cultivos se hicieron de tal forma que quedaran solapados. El resultado puede verse en la figura 3.5. Se observa que a medida que la velocidad de crecimiento aumenta, la expresión de la enzima se incrementa en forma muy notoria. La actividad a cada valor de D entre muestras de diferentes cultivos e incluso entre muestras del mismo estacionario poseen una dispersión bastante marcada pero la tendencia hacia valores mayores de actividad se aprecia claramente. Este comportamiento con la velocidad de dilución resulta opuesto al encontrado por Zetelaki para PGasa de *Aspergillus*<sup>16</sup>. Antranikian<sup>3</sup> reporta un comportamiento muy similar para pullulanasa,  $\alpha$  amilasa y  $\alpha$  glucosidasa de *Clostridium*.

Esta dispersión dentro de un mismo estado estacionario se encontró durante casi todo el estudio en cultivo continuo y casi todas las limitaciones estudiadas. Más adelante se ahonda en este detalle.



**Figura 3.6:** Actividad enzimática en función de la velocidad de dilución en un cultivo continuo en estado estacionario. Alimentación: MR (limitado en carbono) Diferentes símbolos indican cultivos diferentes

Como puede observarse, la actividad medida de la enzima disminuye a valores altos de velocidad de dilución pero esto se debe a una disminución en la biomasa debido a la proximidad del D crítico (aproximadamente 0.4 h<sup>-1</sup>).

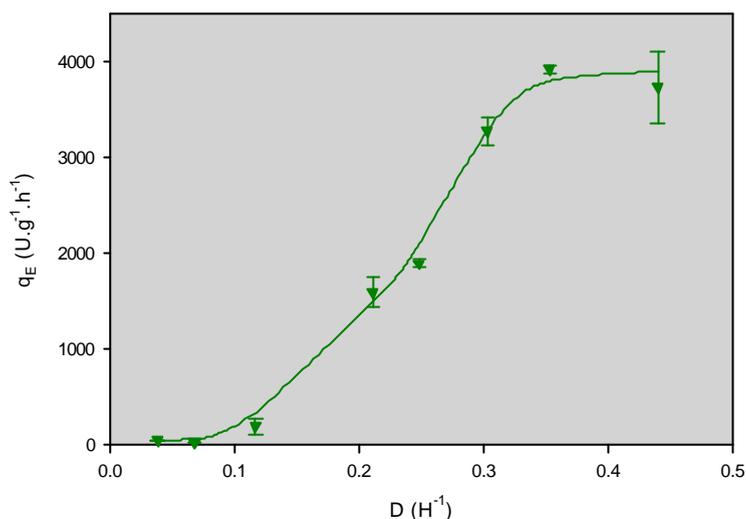
A valores de D altos pero menores que  $\mu_{\max}$  se obtienen sistemáticamente valores de actividad enzimática mayores que en batch. Este resultado es bastante general ya que fue observado para enzimas y especies tan diferentes como pullulanasa y  $\alpha$ -amilasa de *Clostridium*<sup>3</sup>, celulasa de *Trichoderma reesei*<sup>5</sup>, proteasa ácida de *Humicola lutea*<sup>1</sup> y  $\beta$  (1-3) glucanasa de *Oerskovia xanthineolytica*<sup>2</sup>

Si en lugar de representar actividad enzimática en función de  $D$  se grafica la velocidad específica de síntesis de la enzima se ve que se incrementa continuamente hasta estabilizarse a valores cercanos a  $\mu_{\max}$ . Se define la velocidad específica neta de síntesis de enzima  $q_E$  como:

$$q_E = \frac{A_E \times D}{X} \quad \left[ \frac{U}{g_x \cdot h} \right]$$

donde  $A_E$  es la actividad de PGasa en  $U \cdot L^{-1}$ .

En la figura 4.6 se ve el comportamiento de  $q_E$  en función de  $D$ . Resulta claro que la velocidad de síntesis de la enzima se incrementa con  $D$  ya que el  $q_E$  se incrementa de menos de 10 a más de 3500  $U \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ .



**Figura 4.6:** Velocidad específica de síntesis de PGasa en función de la velocidad de dilución. Los resultados provienen de diferentes cultivos continuos, todos realizados con el MR.

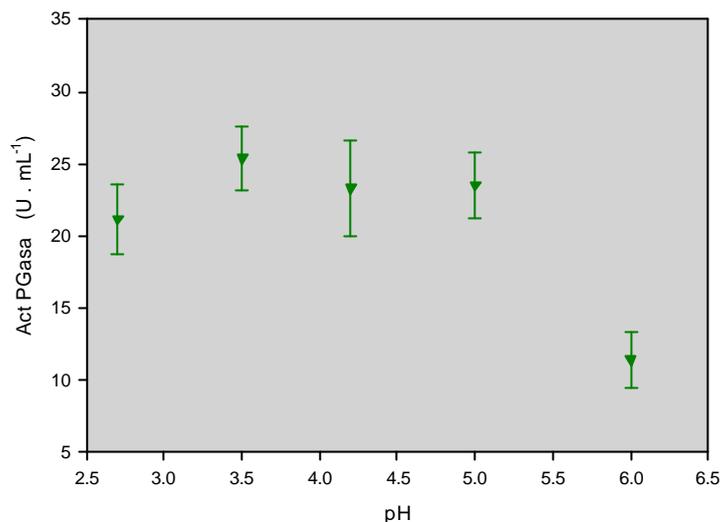
Si se comparan estos valores con los obtenidos en cultivos batch con el mismo medio se observa una mayor producción de enzima en cultivo continuo. Si se toma un valor de  $\mu_{\max}$  de  $0.45 \text{ h}^{-1}$ , una biomasa final de  $2.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  y una actividad enzimática promedio para de  $12 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  se obtiene un valor de  $q_E = 2300 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 6.3.2 Efecto pH.

Por una cuestión de comodidad, debido a la velocidad de recambio de medio de cultivo, para experiencias posteriores se escogió una velocidad de dilución de  $0,2 \text{ h}^{-1}$ .

Una vez estudiado el efecto de  $D$  sobre la expresión de PGasa se estudió el efecto del pH sobre la expresión de la enzima. Para tal fin el cultivo se alimenta con MR a pH 5 y se controla el valor de pH del cultivo en forma automática con el agregado de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o  $\text{NaOH}$  respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.6.

Luego de cada cambio de condición se tomaron muestras a los 5, 10 y 15 tiempos de retención (aproximadamente 20, 40 y 60 horas) siempre y cuando no se observaran cambios en las condiciones macroscópicas del cultivo.



**Figura 5.6:** Efecto del pH sobre la expresión de PGasa SE. En cultivo limitado en FCE .

Se observa que la expresión de la enzima no se ve mayormente afectada por el efecto del pH mientras ésta no pase por encima de 5. A pH mayores que 5, la actividad se ve fuertemente disminuida. La disminución de la actividad por encima de pH 5 puede deberse en parte a la desnaturalización de la enzima por efecto del pH pero, ya que en los estudios en batch este efecto ocurrió recién sobre pH 7, no parece que sea la única causa.

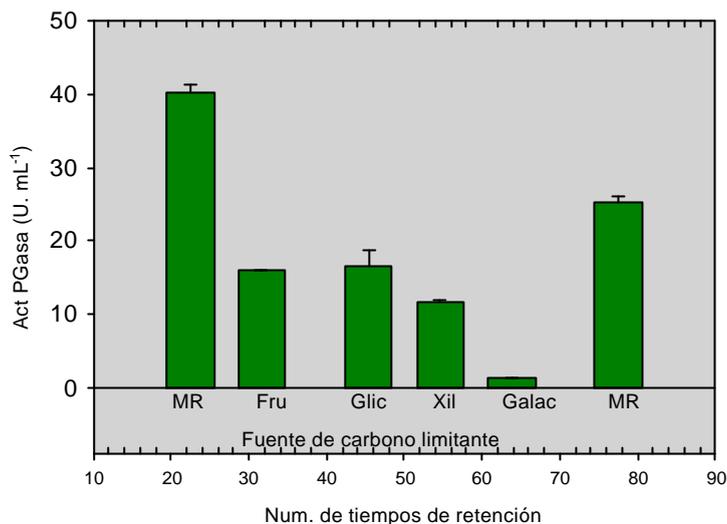
Sin ser muy marcado, se observa un ligero incremento de la actividad PGasa cuando el pH disminuye (efecto ya observado en batch). Esta disminución en la actividad enzimática con el aumento del pH fue reportado por Antranikian 3 para  $\alpha$  amilasa de *Clostridium* aunque en este caso el rango de pH óptimo es mucho más estrecho y la actividad disminuye cuando baja de 5.5.

Dado que no hubo mayores diferencias en los valores de actividad a pH menores que 5 para estudios posteriores se eligió este valor de pH a fin de variar lo menos posible las condiciones de cultivo con respecto al MR.

### 6.3.3 Efecto del cambio en la fuente de carbono y energía.

Manteniendo el valor de  $D$  en  $0,2 \text{ h}^{-1}$  y el pH del medio de cultivo en 5, se procedió a estudiar el efecto de la naturaleza de la fuente de carbono. Para tal fin la glucosa del medio testigo (MR) fue remplazada por cantidades equivalentes (en cmoles) de diferentes FCE. Los cultivos se mantuvieron siempre limitados en FCE. Los resultados se muestran en la figura 6.6.

La naturaleza de la FCE influye fuertemente sobre la actividad enzimática. Los resultados encontrados son coherentes con los hallados en cultivos en batch en los que la actividad enzimática es mayor con glucosa, xilosa y fructosa que con galactosa y glicerol. En la misma figura se observa que el primer estado estacionario con el MR da una actividad enzimática mucho mayor que el segundo, ocurrido 60 tiempos de retención (300 horas) más tarde. Este comportamiento se discute más adelante (Fig.9.6).



**Figura 6.6:** Efecto de la naturaleza de la FCE sobre la expresión de PGasa (en cultivo limitado en FCE).

### 6.3.4 Efecto del ácido galacturónico.

Dado que los cultivos en batch utilizando ácido galacturónico como FCE habían dado como resultado una posible inhibición de la síntesis, ya que el *G. klebahnii* creció sin inconveniente pero no produjo enzima, se investigó su efecto sobre la síntesis de enzima.

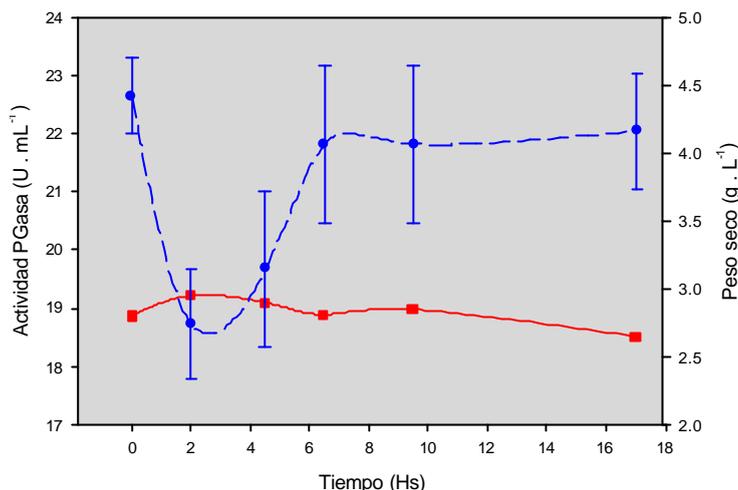
En este caso se utilizó un protocolo diferente al usado con las demás FCE. Para determinar si el GALA ejerce alguna acción sobre la expresión de PGasa se utilizó el método de pulsos.

El método de pulsos permite observar los efectos de un determinado componente sobre alguna variable del cultivo. Consiste en la inyección en un tiempo corto de dicho compuesto sobre el cultivo en estado estacionario hasta alcanzar una concentración deseada (en teoría se debe conseguir un aumento instantáneo de la concentración). La presencia o el incremento en la concentración del compuesto en el medio de cultivo genera, o no, un efecto en el cultivo que puede ser medido a cortos plazos. El efecto provocado es transitorio y una vez eliminado por dilución la sustancia problema, el sistema retorna al estado estacionario original.

Se realizó un pulso de GALA en un cultivo en estado estacionario limitado en glucosa y se tomaron muestras durante las 12 horas siguientes para medir actividad enzimática y peso seco. El pulso se realizó en un volumen y concentración tal que quedara 1 g/L en el medio de cultivo a tiempo cero.

Los resultados (Fig 7.6) confirman el hecho de que existe inhibición ya que la biomasa se incrementa ligeramente debido al incremento del sustrato y la enzima disminuye notablemente poco tiempo después del pulso recuperando la actividad aproximadamente en tres tiempos de retención.

Dado que en el estado estacionario sobre el que realizó el pulso las condiciones del cultivo eran las apropiadas para la expresión de PGasa se ve que el GALA ejerce una inhibición a nivel de la síntesis de enzima.



**Figura 7.6:** Efecto de un pulso de GALA sobre la actividad enzimática ● y peso seco ■ (medio MR).

### 6.3.5 Efecto del pool de vitaminas y de la concentración de $K_2HPO_4$ .

Para estudiar el efecto de la concentración de vitaminas y fosfato sobre la expresión enzimática se realizaron sendos cultivos limitados en estos componentes. Para ello se preparó el medio de cultivo MR pero con las vitaminas diluidas 1:100 en un caso y el  $K_2HPO_4$  diluido 1:25 en el otro. El cultivo comenzó limitado en glucosa a una velocidad de dilución de  $0.2\ h^{-1}$  y luego de transcurridos aproximadamente 30 tiempos de retención (160 h) el medio de cultivo se cambió de alimentación por el limitado en fosfato. Luego de tres días en los que se muestreó a diario, se cambiaron nuevamente las condiciones a limitado en vitaminas.

La tabla I.6 muestra los resultados obtenidos tanto en cuanto a la cantidad de enzima producida como algunos parámetros.

Limitación	Biomasa $g \cdot L^{-1}$	Glucosa remanente $g \cdot L^{-1}$	Act. PGasa $U \cdot mL^{-1}$	$qE$ $U \cdot g_x^{-1} \cdot h^{-1}$	Balance de C *
Glucosa	2.85	0.002	21.45	1505	1.07
Vitaminas	1.0	2.8	1.57	314	1.06
Fósforo	1.1	2.8	14.43	2623	1.04

\*Considerando biomasa y  $CO_2$

**Tabla I.6:** Actividad recuperada de cultivos continuos con diferentes limitaciones.

La limitación por un nutriente diferente a la FCE puede verificarse del dato de glucosa remanente en el medio de cultivo. Tal como se demostró en el capítulo 3, *G. klebahnii* no posee en estas condiciones de cultivo metabolismo de sobreflujo y cuando se limita en un nutriente distinto de la FCE, consume solamente lo necesario sin generar ningún tipo de producto carbonado. La limitación por fósforo rinde la mayor velocidad específica de síntesis de enzima.

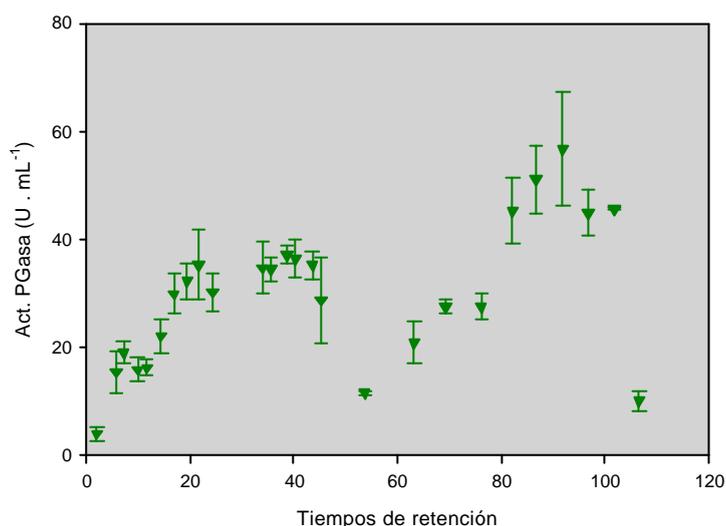
A pesar de que las diferencias entre una limitación y otra son muy grandes, los datos deben ser relativizados ya que, como se verá en el apartado siguiente, la actividad

enzimática oscila a lo largo del tiempo en un mismo estado estacionario. De todas maneras, las diferencias son lo suficientemente importantes como para creer que hay una variación real debida a los cambios en el medio de cultivo.

### 6.3.7 Comportamiento de la expresión de enzima en función del tiempo de retención.

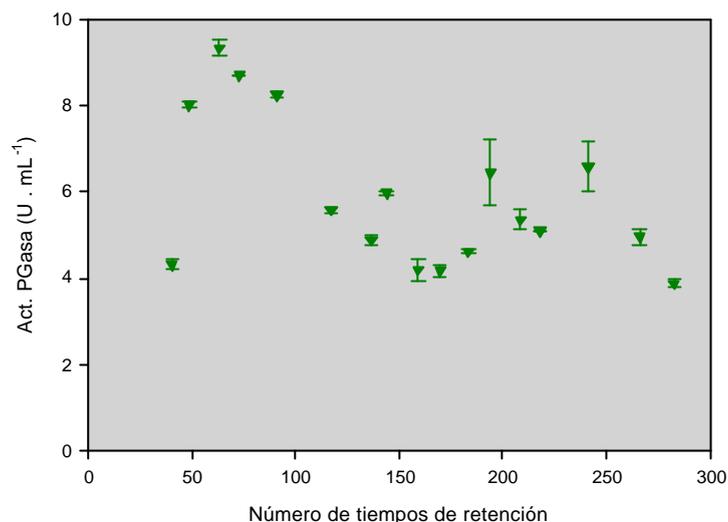
Un comportamiento curioso se observa en la expresión de PGasa de *G. klebahnii* cuando el cultivo es mantenido en un mismo estado estacionario y se analiza su evolución en función del tiempo. A pesar de que los parámetros cinéticos del cultivo ( $q_{O_2}$ ,  $q_S$ ,  $q_{CO_2}$ , etc) se mantienen constantes indicando que el cultivo efectivamente se encuentra en estado estacionario, la actividad enzimática oscila en forma aleatoria.

En cultivos limitados en glucosa mantenidos a un  $D$  de  $0.2 \text{ h}^{-1}$  durante 100 tiempos de retención ( $t_R$ ) la actividad enzimática varió entre  $55$  y  $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Cuando el  $D$  se mantuvo en  $0.4 \text{ h}^{-1}$  durante  $300 t_R$ , la actividad osciló entre  $10$  y  $4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Este comportamiento se muestra en la figuras 8.6 y 9.6. En ambos cultivos el medio de alimentación fue MR.



**Figura 8.6:** Actividad PGasa de un cultivo continuo de *G. klebahnii* limitado en FCE (glucosa) a  $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ .

Este comportamiento está en contra del concepto de estado estacionario, más aun si se tiene en cuenta que el cultivo estuvo siempre limitado en glucosa y la biomasa, el  $O_2$  disuelto y la velocidad de dilución se mantuvieron constantes durante las 500 horas de cultivo. Pedersen y Nielsen<sup>11</sup> reportan un comportamiento similar en un trabajo sobre la influencia de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de una  $\alpha$ -amilasa por *Aspergillus oryzae*. En este trabajo realizan los cultivos con glucosa como sustrato limitante. Al igual que en el caso de la PGasa de *G. klebahnii* la enzima no es necesaria para el crecimiento en estas condiciones lo que puede resultar en una regulación menos estricta de su expresión. Otra explicación a este extraño comportamiento (posiblemente más acertada) se indica más adelante en relación a la concentración de los microelementos.



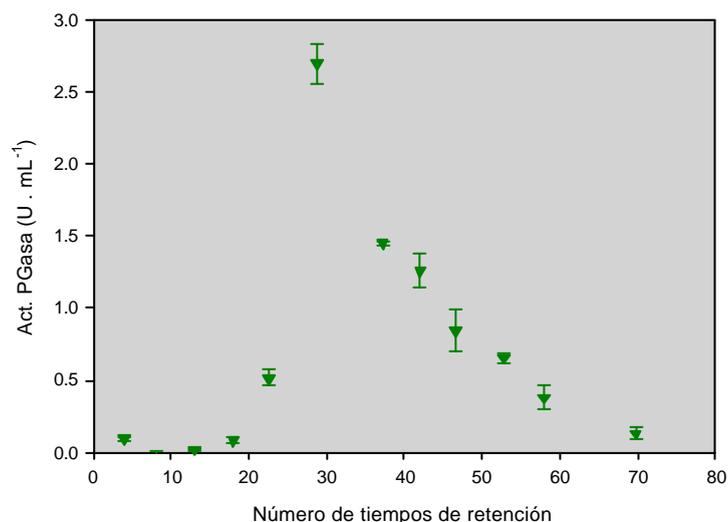
**Figura 9.6:** Actividad PGasa de un cultivo continuo de *G. klebahnii* limitado en FCE (glucosa) a  $D = 0.4 \text{ h}^{-1}$ .

El mismo comportamiento se encontró bajo diferentes limitaciones y condiciones de crecimiento. En las figuras 10.6 a 13.6 se observa el perfil de actividad PGasa en función del número de tiempos de retención de cultivos continuos limitados en nitrógeno, glicerol, galactosa y fosfato respectivamente.

Puede observarse que el comportamiento es bastante general aunque cuando el cultivo estuvo limitado en fósforo la variación fue ligeramente inferior.

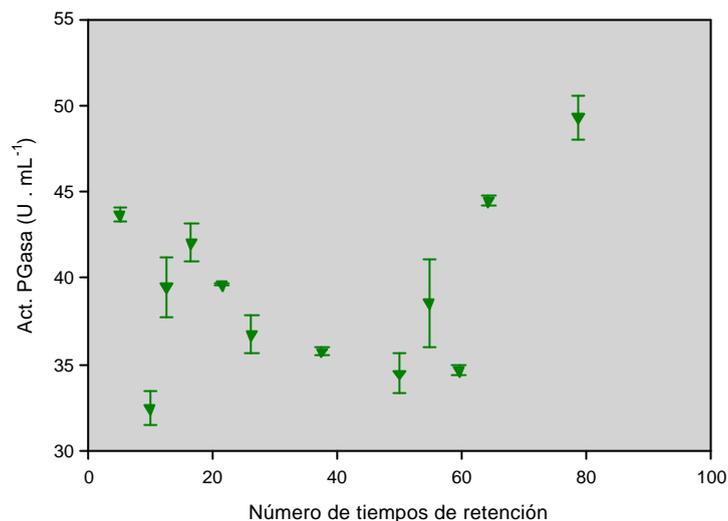
Además se observa que la naturaleza de la fuente de carbono influye sobre el nivel medio de la actividad enzimática, tal como se había observado en cultivos batch la galactosa es un sustrato pobre para la producción de enzima.

Cuando el cultivo se limita en fuente de nitrógeno la expresión de PGasa es mínima (Fig. 10.6).

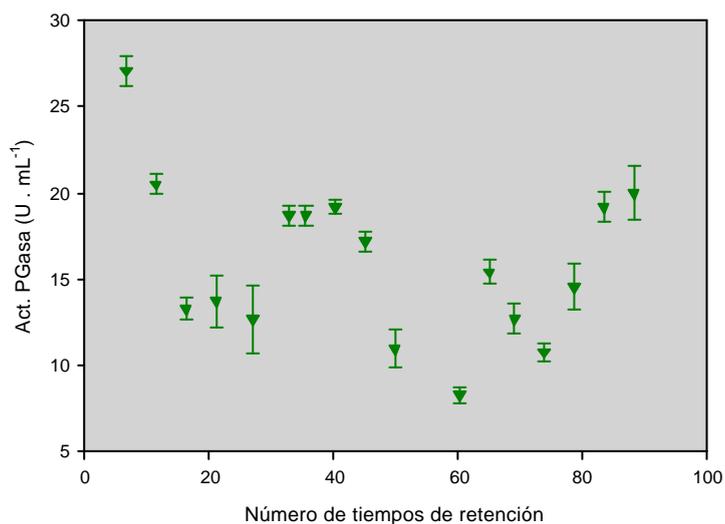


**Figura 10.6:** Actividad PGasa de un cultivo continuo de *G. klebahnii* limitado en fuente de nitrógeno a  $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ .

Durante este cultivo la biomasa en estado estacionario se mantuvo alrededor  $1.19 \pm 0.06$  g/L, la glucosa remanente fue de  $2.83 \pm 0.09$  g/L y el balance de carbono considerando biomasa y CO<sub>2</sub> como únicos productos carbonados resulto igual a 1.04. Tal como había ocurrido en los cultivos batch con la misma limitación, la actividad enzimática se vio mucho más deprimida (más del 90%) que la formación de biomasa (aproximadamente un 60%). Al no ser la PGasa una enzima necesaria para el crecimiento, es lógico que el microorganismo sacrifique su síntesis al verse privado de nitrógeno.



**Figura 11.6:** Actividad PGasa de un cultivo continuo de *G. klebahnii* limitado en FCE (glicerol) a  $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ .



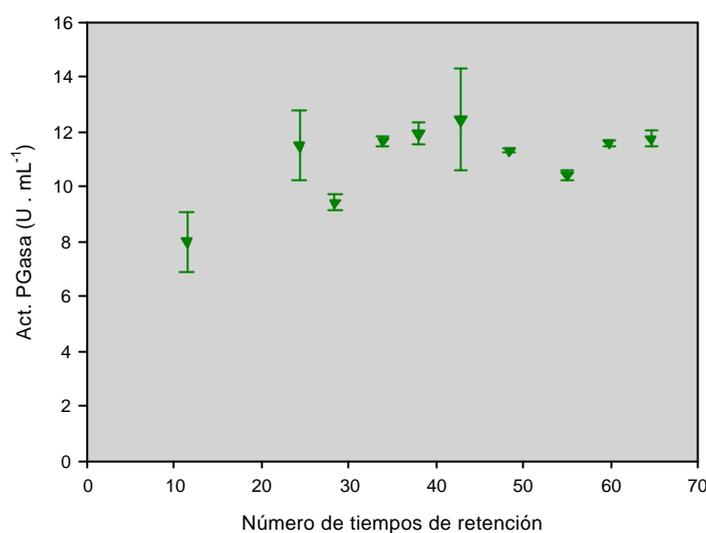
**Figura 12.6:** Actividad PGasa de un cultivo continuo de *G. klebahnii* limitado en FCE (galactosa) a  $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ .

En las figuras 11.6 y 12.6 se muestra la actividad de PGasa en función del  $t_R$  con glicerol o galactosa como fuente de carbono y energía respectivamente. Puede

observarse que el efecto de la oscilación es muy grande en cualquiera de las dos limitaciones aunque la tendencia es a encontrar valores de actividad más altos con la limitación por glicerol que por galactosa. Los valores de biomasa en ambos cultivos fueron altos,  $3.04 \pm 0.07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  y  $2.78 \pm 0.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  respectivamente, lo que indica que los rendimientos en biomasa son elevados con estas dos FCE.

El cultivo limitado en galactosa tiene una producción de PGasa similar a la encontrada en batch pero no ocurre lo mismo con el cultivo limitado en glicerol, en batch se obtuvo un actividad más baja que la obtenida con el MR. Quizás la expresión de PGasa con glicerol como FCE requiera de un tiempo mayor y la duración del batch no permita que se exprese en todo su potencial.

Cuando la limitación del cultivo continuo no fue en la FCE sino en fosfato, el comportamiento encontrado fue ligeramente distinto (Fig.13.6).



**Figura 13.6:** Actividad PGasa de un cultivo continuo de *G. klebahnii* limitado en fósforo a  $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ .

La biomasa en este caso se vio muy disminuida, la media durante el cultivo fue de  $0.85 \pm 0.05 \text{ g/L}$  y la glucosa se mantuvo en  $2.76 \pm 0.09 \text{ g/L}$ . Como puede verse en este caso la actividad enzimática se mantiene en valores bastante altos teniendo en cuenta la biomasa obtenida, tal como se indica en la tabla I.6, la velocidad específica de formación e PGasa es la más alta, casi el doble de la encontrada para la limitación en FCE. Llama la atención en este cultivo la falta casi total de oscilación de la actividad en función del número de tiempos de retención. Hasta el presente no se ha encontrado una explicación para este comportamiento.

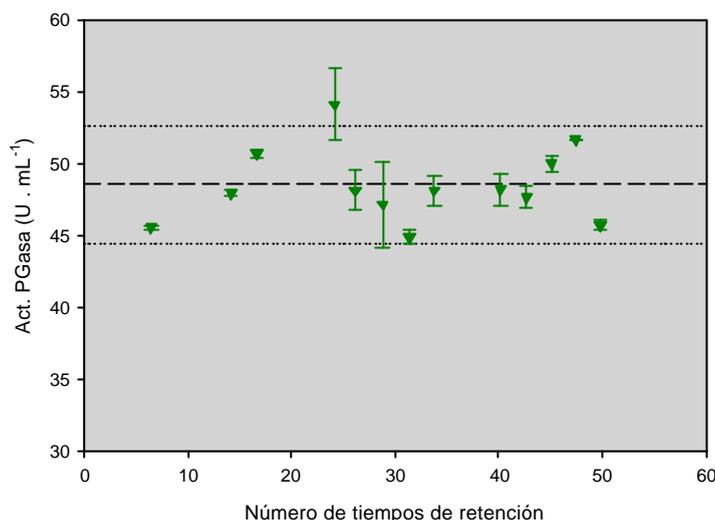
### 6.3.8 Efecto de los microelementos sobre la expresión enzimática.

Una vez estudiado el efecto de los microelementos en batch y teniendo en cuenta el efecto nocivo que ejercen sobre la expresión de PGasa en la concentración utilizada en el MR, se estudio el efecto causado por ellos en cultivo continuo.

Para tal fin se utilizó, en primera instancia, el medio de cultivo con la dilución de microelementos 1:85 MRD. Cuando se realizó un cultivo a largos tiempos de retención

con este medio de cultivo se observó (Fig. 14.6) que la actividad, además de ser en promedio más alta, se mantuvo constante durante todo el cultivo.

Teniendo en cuenta se realizó a un  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ , la actividad recuperada es mucho más alta que con MR.



**Figura 14.6:** Actividad PGasa de un cultivo continuo de *G. klebahnii* limitado en FCE (glucosa) a  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . Cultivo realizado con MRD.

Según se ve en la figura 1.6, la actividad enzimática encontrada a este valor de  $D$  para el MR es de aproximadamente  $5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Los valores de velocidad específica de síntesis de enzima ( $q_E$ ) para este cultivo son de  $1800 \pm 240 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Estos valores son enormemente mayores que los aproximadamente 100 que se obtienen en MR (Fig. 2).

El cultivo debió realizarse a una velocidad de dilución más baja de lo utilizado para el resto de los cultivos ya que el  $\mu_{\text{max}}$  de *G. klebahnii* se ve alterado por la disminución de los microelementos y a un  $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$  el cultivo tiende a lavarse y es muy difícil obtener un estado estacionario estable.

Este resultado aporta quizás la explicación más razonable a la oscilación de la actividad enzimática durante el estado estacionario en las otras condiciones. De cualquier manera no fue comprobada experimentalmente por lo que es sólo una suposición razonable.

Es normal que los microorganismos acumulen microelementos durante el crecimiento<sup>14</sup>. *G. klebahnii* creciendo en cultivo continuo y en todas las condiciones estudiadas se adhiere a las paredes del reactor. No se ha comprobado experimentalmente pero es posible que durante el cultivo parte de los microorganismos que estuvieron pegados a las paredes (probablemente muertos debido a la falta de medio por largo tiempo) caigan al medio de cultivo y se lisen, incrementando en forma transitoria la concentración de microelementos en el medio de cultivo. Este incremento puede resultar en una disminución transitoria de la expresión enzimática. Tal como se vio en la figura 10.5 un incremento de algunos de los componentes del pool de microelementos (especialmente Fe, Mn y Zn) hace que la concentración de enzima en el medio varíe. Estos cambios son tan pequeños que no llegan a alterar el estado estacionario en cuanto a las otras variables.

Cuando la concentración de microelementos se disminuye hasta 1:85 en el medio de cultivo, los posibles incrementos transitorios en la concentración de los mismos no alcanzan a modificar la expresión de la enzima y por ello, por más que existan los cambios en la concentración de microelementos, no se traducen en un cambio muy grande en la concentración de enzima.

Estas oscilaciones no serían, en principio, más que un artefacto experimental debido al sistema de cultivo.

### 6.3.9 Cambios morfológicos durante el estado estacionario

Previo al hallazgo del efecto de los microelementos sobre la estabilidad en la expresión de PGasa, buscando una causa para las oscilaciones durante los distintos estados estacionarios, se encontró un comportamiento muy singular en la morfología de *G. klebahnii* durante el estado estacionario.

Tal como se comentó en la introducción, *G. klebahnii* es un hongo pleomórfico que puede crecer, bien como micelio poco ramificado o bien como células libres. Dentro de un mismo estado estacionario se encontró que la forma de crecimiento cambia en los primeros momentos del cultivo y luego se estabiliza en una proporción artrosporas / micelio que depende de la limitación a la que esté sometido el cultivo.

La forma preponderante en una determinada condición de crecimiento y las razones por las cuales un microorganismo toma una forma u otra presentan cierta confusión en la literatura <sup>10</sup>. Según O'Shea esta confusión se aclara si se separa a los microorganismos pleomórficos en dos grandes grupos: hongos levaduriformes (al que pertenece *G. klebahnii*) y levaduras.

Los hongos levaduriformes poseen una forma principal miceliar pero puede cambiar a una forma celular (levaduras) cuando el cultivo es sometido a condiciones de stress. Pueden ser a su vez divididos en patógeno y no patógenos. Los patógenos cambian de su forma miceliar (saprofítica) a la levaduriforme (patogénica) por un cambio de temperatura de 30°C a 37°C. A este grupo pertenecen, por ejemplo *Blastomyces dermatitidis*, *B. brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporotrichum schenckii* y *Coccidioides immitis* <sup>6</sup>.

A los no patogénicos corresponde por ejemplo, *Aureobasidium pullulans*. Reeslev y Jensen <sup>13</sup> han demostrado que el cambio de miceliar a levaduriforme ocurre por una limitación en Zn y Fe.

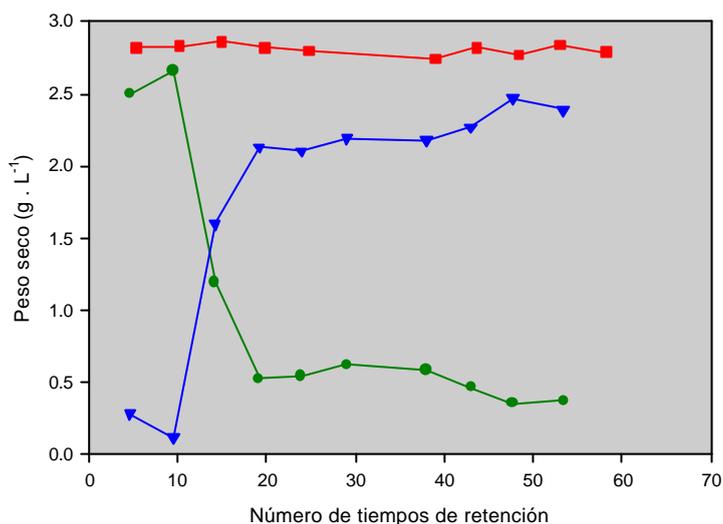
Las levaduras dimórficas presentan un comportamiento opuesto. Poseen naturalmente una forma celular y pueden cambiar a una forma pseudomiceliar cuando se ven sometidas a stress. Levaduras que presenten este tipo de comportamiento son *Sacharomyces cerevisiae* <sup>7</sup>, *Hansenula anomala* <sup>15</sup>, *Sacharomycopsis fibulgera* <sup>9</sup> y *Kluyveromyces marxianus* <sup>10</sup>. Los factores que pueden alterar la morfología en estos casos puede ser una limitación por O<sub>2</sub>, una disminución de la velocidad de crecimiento, etc.

Aún en el crecimiento de hongos filamentosos han sido reportados tales cambios morfológicos. Carlsen y col <sup>4</sup> encontraron que *Aspergillus oryzae* creciendo en un medio definido con glucosa como FCE cambia su forma de crecimiento de miceliar a micropellets según sea el pH del cultivo. A pH de 3.0 o 3.5 el hongo crece como micelios libres, entre 4.0 y 5.0, crece como una mezcla de hifas y pellets y a pH 6 o mayores crece solamente como pellets.

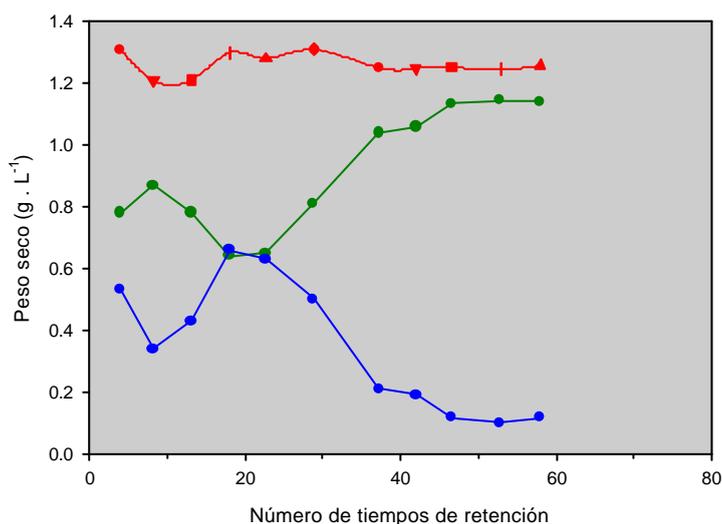
El estudio sobre los cambios morfológicos en *G. klebahnii* en cultivo continuo se realizó según el procedimiento indicado en materiales y métodos tal como se indica en el esquema. El batch previo al inicio de cada cultivo continuo se realizó con el medio de

cultivo utilizado posteriormente en la alimentación de modo que los primeros tiempos de retención pueden estar influenciados por la morfología de la fase exponencial tardía del cultivo batch. Los pesos secos de artrosporas o (forma levaduriforme o FL), micelio (forma miceliar o FM) y biomasa total (X) se midieron en forma independiente.

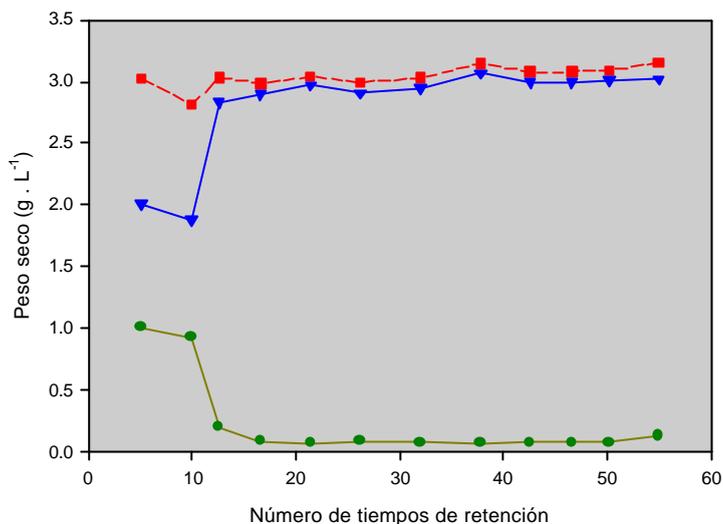
Se estudiaron los cambios morfológicos en función del número de tiempos de retención bajo varias limitaciones: glucosa, nitrógeno, glicerol, galactosa y fósforo. Los resultados se muestran en las figuras 15.6 a 19.6. En todos los cultivos se mantuvo constante la velocidad de dilución en un valor de  $0.2 \text{ h}^{-1}$ .



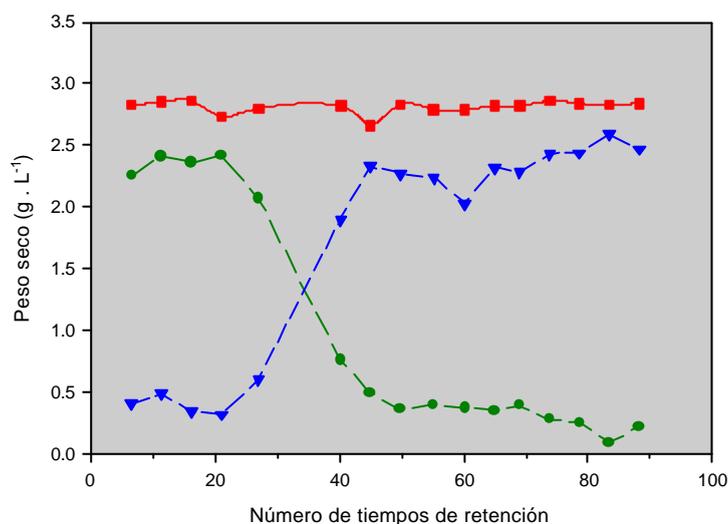
**Figura 15.6:** perfil de tamaño celular en un cultivo continuo limitado en glucosa. ● FL, ▼ FM, ■ peso seco total.



**Figura 16.6:** perfil de tamaño celular en un cultivo continuo limitado en nitrógeno. ● FL, ▼ FM, ■ peso seco total.



**Figura 17.6:** perfil de tamaño celular en un cultivo continuo limitado en glicerol. ● FL, ▼ FM, ■ peso seco total.

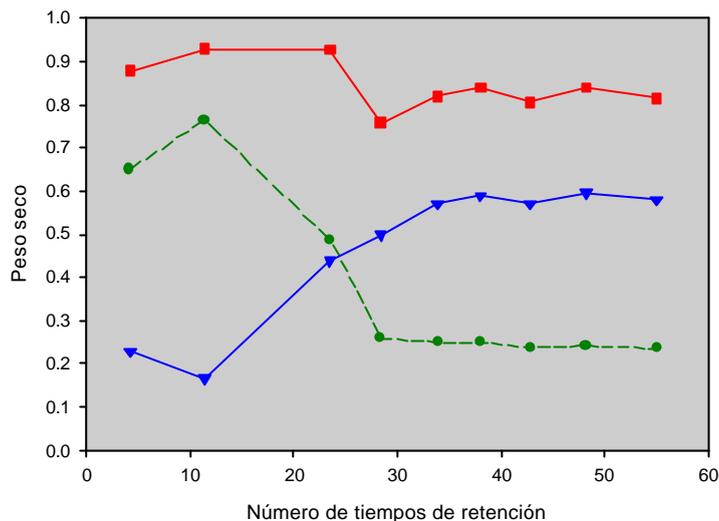


**Figura 18.6:** perfil de tamaño celular en un cultivo continuo limitado en galactosa. ● FL, ▼ FM, ■ peso seco total.

Se observa claramente que la morfología celular cambia en el tiempo al comienzo del cultivo y que en todos los casos se estabiliza en una proporción FM/FL determinada que depende de la limitación. A excepción de la limitación por nitrógeno, la forma predominante fue siempre la miceliar.

La relación FM/FL disminuye según el orden glicerol, galactosa, glucosa, fosfatos y finalmente nitrógeno, limitación en la cual la relación se invierte.

Curiosamente el cultivo limitado en glicerol, aparte de estabilizarse en una población casi 100 % miceliar, comenzó el cultivo con estas formas celulares a diferencia de todas las demás que lo hicieron como FL.



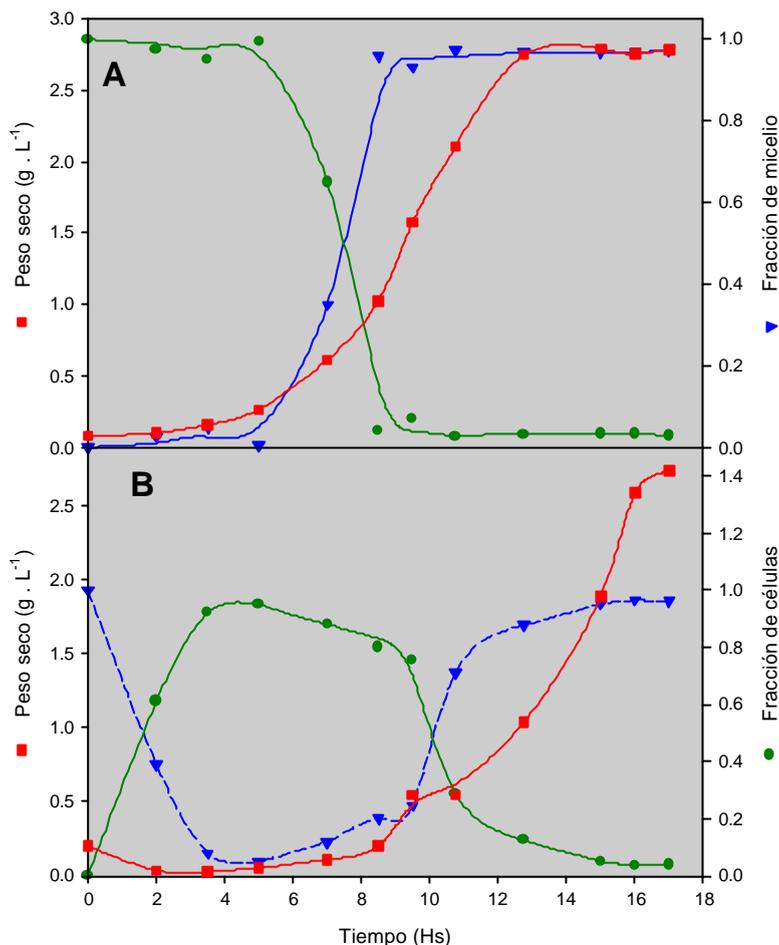
**Figura 19.6:** perfil de tamaño celular en un cultivo continuo limitado en fosfato. ● FL, ▼ FM, ■ peso seco total.

Es también muy llamativo el resultado encontrado en el cultivo limitado en fosfato (Fig. 19.6). A pesar de terminar con una población que es mayoritariamente miceliar, la relación FM / FL es la más baja (si se exceptúa el cultivo limitado en nitrógeno).

Este dato y el de la limitación por nitrógeno coinciden con la clasificación dada por O'Shea<sup>10</sup> en la que los hongos levaduriformes poseen morfología miceliar cuando crecen en condiciones óptimas y toman la forma de levadura cuando son sometidas a algún tipo de stress. En los tres cultivos limitados en FCE se observó que la población preponderante fue la FM. Al limitarse en fosfato desciende la biomasa total a expensas en parte a un descenso del rendimiento celular (Tabla IV.4) y dentro de esta disminución queda una proporción un poco mayor de FL (aunque aun hay mayoría de FM) y al limitarse en nitrógeno directamente se invierte la relación y las FL comprenden una mayoría casi absoluta.

Vale aclarar que durante esta evolución de la formas de crecimiento no se encontró ninguna relación con los cambios en la actividad enzimática bajo ninguna de las limitaciones analizadas. Posiblemente ocurra debido a que las FL son fisiológicamente iguales a las FM y sólo cambian las proporciones como una forma de incrementar la superficie de absorción de nutrientes.

Si las células pertenecientes a un cultivo limitado en glucosa son separadas en asepsia y se utilizan las fracciones (micelio y artrosporas) para sembrar sendos cultivos batch en MR se observa que el cultivo sembrado con micelio se fragmenta en artrosporas antes de comenzar el crecimiento exponencial (fig. 20B). Se indica el peso seco total así como la fracción en peso de micelio (FM). Puede verse claramente que en el cultivo sembrado con formas levaduriformes (Fig 20 A) el incremento de la proporción de células miceliar acompaña al crecimiento de la biomasa total pero que en el cultivo sembrado con micelio (B), éste debe primero fragmentarse en artrosporas para que el *G. klebahnii* pueda empezar a crecer pero que una vez comenzado el crecimiento, el comportamiento es similar a otro cultivo.



**Figura 20.6:** Curvas de crecimiento en batch (MR) de *G. klebahnii* a partir de células separadas por tamaño. A, cultivo sembrado con FL. B, cultivo sembrado con FM. ● FL, ▼ FM, ■ peso seco total.

Evidentemente, cuando *G. klebahnii* debe crecer en forma acelerada primero se fracciona y aumenta el número de microorganismos por unidad de masa seca bien para aumentar la superficie de contacto con el medio y posibilitar un mayor flujo de nutrientes hacia la biomasa, bien para aumentar el número de sitios de crecimiento. Como este tipo de microorganismos crece sólo a través de sus extremos, a igualdad de cantidad de biomasa total, más células pequeñas presentan un mayor número de sitios de crecimiento que menos células de mayor tamaño. Los hongos filamentosos aumentan el número de sitios de crecimiento a expensas de aumentar las ramificaciones pero no es el caso de *G. klebahnii* ya que éste nunca supera el límite de una ramificación corta por hifa.

## 6.4 Referencia Bibliográfica

1. Aleksieva, P. and S. Mutafov. 1997. Continuous culture of *Humicola lutea* 120-5 for acid proteinase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13:353-354.
2. Andrews, B. and J. Asenjo. 1987. Continuous culture studies of synthesis and regulation of extracellular  $\beta$  (1-3) Glucanase and protease enzymes from *Oerskovia xanthineolytica*. *Biotechnology and Bioengineering* 30:628-673.
3. Antranikian, G., C. Herzberg, and G. Gottschalk. 1987. Production of thermostable  $\alpha$  amylase, pullulanase and  $\alpha$ -glucosidase in continuous culture by a new clostridium isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 53:1668-1673.
4. Carlsen, M., A. B. Spohr, J. Nielsen, and J. Villadsen. 1996. Morphology and physiology of an  $\alpha$ -amylase producing strain of *aspergillus oryzae* during batch cultivation. *Biotechnology and Bioengineering* 49:266-276.
5. Chaudhuri, B. K. and V. Sahai. 1993. Production of cellulase enzyme from lactose in batch and continuous cultures by a partially constitutive strain of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.* 15:513-518.
6. Deacon, J. W. 1984. *Introduction to modern mycology*. Oxford.
7. Hill, G. and C. W. Robinson. 1988. Morphological behaviour of *Saccaromyces cerevisiae* during continuous fermentation. *Biotech. Lett.* 10:815-820.
8. Lucca, M. E., M. E. Romero, and D. A. S. Callieri. 1995. Continuous culture of *Candida utilis*: influence of medium nitrogen concentration. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:515-518.
9. Nwoguh, C. E. and D. R. Berry. 1990. Effect of methionine on the growth and morphogenesis of *Saccaromycopsis fibulgera* in defined medium. *Biotech. Lett.* 12:271-276.
10. O'Shea, D. G. and P. K. Walsh. 2000. The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415: a study incorporating image analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:316-322.
11. Pedersen, H. and J. Nielsen. 2000. The influence of nitrogen source on the  $\alpha$ -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:278-281.
12. Radcliffe, P. A., K. M. Binley, J. Trevethick, M. Hall, and P. E. Sudbery. 1997. Filamentous growth of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* induced by overexpression of the WHI2 gene. *Microbiology* 143:1867-1876.
13. Reeslev, M. and B. Jensen. 1995. Influence of  $Zn^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  on polysaccharide production and mycelium/yeast dimorphism of *Aureobasidium pullulans* in batch cultivations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42:910-915.
14. Shumate, S. E. and G. W. Strandberg. 1985. Accumulation of metals by microbial cells, p. 235-247. In M. Moo-Young, C. W. Robinson, and J. A. Howell (eds.), *Comprehensive biotechnology*. Pergamon Press, Ontario, Canada.
15. Sundhagul, M. and L. R. Hedrick. 1966. Effect of tryptophan on growth and morphology of *Hansenella schneegii* cells. *J. Bacteriol.* 92:241-249.
16. Zetelaki, K. 1983. Possibilities for control of pectolytic enzyme formation by *Aspergillus niger* in continuous culture. *Acta alimentaria* 12:11-19.

## Conclusiones

En esta sección se resumen las conclusiones generales que surgen de cada uno de los capítulos precedentes

### **Capítulo 2 - Técnica de PPasa**

1. Como es común en las reacciones heterogéneas, la actividad enzimática es más dependiente del área del sustrato expuesta a la enzima que de la cantidad total de sustrato. Por esta razón en de suma importancia la homogeneidad del tamaño de partícula utilizado.
2. PPasa se adsorbe completamente sobre la protopectina antes de actuar.
3. La técnica es confiable para determinación de muestras de cultivo sin purificar y permite, modificando el tiempo de reacción, realizar analizar muestras con actividades comprendidas dentro de un ancho margen.
4. La técnica es muy engorrosa y su uso se hace poco recomendable cuando la cantidad de muestras es grande.
5. La falta de un sustrato comercial y el hecho de que la actividad enzimática dependa del origen de la protopectina utilizada, debido a los cambios en el grado de esterificación que posee, obliga a la estandarización de la misma cada vez que se prepara una nueva tanda de sustrato.

### **Capítulo 3 - Técnica de PGasa.**

La técnica reportada es simple y permite determinar la actividad en muestras crudas siempre y cuando no contengan alta concentración de azúcares reductores.

#### **Propiedades de la enzima**

1. La enzima no es inhibida por los productos de la reacción.
2. La enzima es muy sensible a la agitación
3. La enzima es inestable cuando se encuentra diluida en buffer a temperatura ambiente.
4. Es estable cuando se encuentra en el medio de cultivo.
5. El  $Mg^{2+}$  ejerce un efecto activador sobre la actividad enzimática mientras que el  $Ca^{2+}$  actúa como un potente inhibidor.
6. La enzima posee un valor de KM aparente de  $0.189 \pm 0.013 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Este valor concuerda con el de otras PGasas de levaduras.
7. La enzima es fuertemente adsorbida sobre materiales poliméricos, observándose pérdida de actividad si las muestras son guardadas en tubos eppendorf y desaparición completa si se filtra por membranas de acetato de celulosa.

### **Capítulo 4 - Estudio del crecimiento de G. klebahnii**

## CONCLUSIONES

1. *G. klebahnii* crece en medios sintéticos con monosacáridos, glicerol, ácido láctico y galacturónico como fuente de carbono y energía (FCE) y con urea y amonio como fuente de nitrógeno (FN). No puede utilizar disacáridos ni pectinas como FCE ni nitrato como FN.
2. La capacidad de utilizar urea como FN es sorpresiva ya que *G. klebahnii* está reportado como ureasa negativo.
3. *G. klebahnii* no presenta metabolismo de sobreflujo, sólo si se limita el cultivo en O<sub>2</sub> se observa producción de etanol, el cual es consumido cuando se agota la fuente de carbono.
4. La limitación por O<sub>2</sub> produce profundos cambios en el metabolismo energético. El más notorio es el incremento en un factor de 10 del consumo de substrato para la obtención de energía así como la disminución de los flujos a través de la cadena de citocromos. Estos resultados son coherentes con un cambio de metabolismo completamente respiratorio a uno mixto, respiratorio y fermentativo.
5. La cinética de crecimiento en medio sintético con glucosa (limitante) como fuente de carbono puede describirse correctamente mediante un modelado simple con las ecuaciones de Monod y Pirt. Los parámetros de crecimiento son:  $\mu_{\max} = 0.401 \text{ h}^{-1}$ ,  $K_S = 3.33 \cdot 10^{-4} \text{ cmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0.686 \text{ cmol} \cdot \text{cmol}^{-1}$  y  $0.0268 \text{ cmol} \cdot \text{cmol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . El valor elevado del rendimiento indica una alta eficiencia en el aprovechamiento de la fuente de carbono.
6. Si el cultivo se limita en vitaminas o en fósforo, la eficiencia del crecimiento disminuye. La causa sería una menor eficiencia en la obtención de ATP a nivel de la fosforilación oxidativa.

### **Capítulo 5 - Expresión de PGasa en cultivos batch**

1. La enzima no presenta isoenzimas cuantitativamente importantes y la actividad se debe a una única proteína.
2. *G. klebahnii* no produce ninguna otra proteína extracelular.
3. La enzima se expresa durante toda la fase de crecimiento obteniéndose el máximo de actividad inmediatamente después de finalizada la fase exponencial.
4. Modificaciones en la naturaleza de la FCE así como en la FN, aún con la utilización de fuentes de nitrógeno complejas, no generan grandes cambios en la cantidad de enzima producida.
5. La modificación de la composición del pool de microelementos es el efector más importante, generando un aumento de 1600 % en la cantidad de enzima producida con respecto al MR.

### **Capítulo 6 - Expresión de PGasa en cultivo continuo**

1. A una velocidad de crecimiento intermedia (0.2 h<sup>-1</sup>) o superior, la concentración de enzima en el estado estacionario es mayor que la obtenida en batch para igual medio de cultivo.
2. La velocidad específica de producción de enzima (qE) aumenta constantemente con el aumento de D.

## CONCLUSIONES

3. *G. klebahnii* cambia de forma de levaduriforme a miceliar con el transcurso del tiempo hasta estabilizarse en una proporción de poblaciones característica para cada limitación
4. La concentración de PGasa en estado estacionario oscila en función del tiempo sin ninguna razón aparente.
5. La causa más probable de esta oscilación es que se trate de un artefacto debido a una modificación transitoria en la concentración de metales.