

EVALUACIÓN DE PRODUCCION DE ENZIMAS HIDROLITICAS A PARTIR DEL CULTIVO SUMERGIDO DE *Humphreya coffeata*.

Carmona-Saldarriaga Laura¹; Marín-Palacio Luz Deisy¹

Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Bioprocesos (CIBIOP). Departamento de Ingeniería de Procesos. Universidad EAFIT. Medellín. Colombia

Las enzimas son catalizadores biológicos con gran importancia a nivel celular e industrial, debido a que incrementan la velocidad de las reacciones sin afectar el equilibrio. Las enzimas pueden ser producidas por fermentación de microorganismos como hongos y bacterias. Por lo tanto, la prospección de estos en dicho campo es un tema con auge en investigación.

El basidiomiceto *Humphreya coffeata*, un hongo de podredumbre blanca posee condiciones de crecimiento en las cuales es probable que produzca enzimas hidrolíticas como pectinasas, amilasas y celulasas. El objetivo de este trabajo fue explorar la capacidad de *H. coffeata* para producir estas 3 enzimas en fermentación sumergida. En primer lugar, se evaluó el efecto de la geometría del matraz sobre la producción de biomasa y la actividad enzimática. Se encontró que la geometría del matraz tuvo un efecto significativo en la producción de biomasa, pero no afectó la actividad enzimática, obteniéndose valores de 1,16 U/mL para exo-pectinasas y un porcentaje de reducción de viscosidad asociado a endo-pectinasa del 4,5%. 0,11 U/mL para la actividad amiolítica y 0,8 U/mL para exocelulasas, 0,09 U/mL para endo celulasas y 0,2 U/mL para betaglucosidasa. Posterior a dicha etapa de prospección se procedió con el estudio específico de las pectinasas, las cuales tuvieron mayor potencial respecto a la cantidad producida, para lo cual se evaluó un residuo agroindustrial (cáscaras de naranja) como fuente de carbono, se evaluó el efecto del pH y temperatura en la actividad enzimática mediante un diseño de experimentos factorial y la inmovilización de la enzima mediante atrapamiento covalente sobre una matriz de alginato de sodio. Se encontró que el

uso de cáscaras de naranja como fuente de carbono no tiene efecto sobre la actividad enzimática, que el pH y temperatura favorables para la reacción es 5,5 y 55 °C, con una velocidad enzimática máxima de 0,07 U/mL*min y una constante de afinidad por el sustrato de 0,022 mg/mL, y que la enzima inmovilizada posee actividad exo-pectinasa, aunque en menor proporción que el extracto crudo.

ARTICULO 1

PROSPECCIÓN DE ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE *Humphreya coffeata* EN CULTIVO SUMERGIDO EVALUADO EN DOS CONFIGURACIONES DE MATRAZ

Carmona-Saldarriaga Laura¹; Marín-Palacio Luz Deisy¹

Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Bioprocesos (CIBIOP). Departamento de Ingeniería de Procesos. Universidad EAFIT. Medellín. Colombia

ABSTRACT: Las hidrolasas son enzimas que realizan la ruptura de un gran número de biomoléculas usando como co-sustrato la molécula de agua, esta clase de enzimas ha sido atractiva a nivel industrial en diversos procesos como fabricación de papel, alimentos, textiles entre otros, lo que genera una demanda con tendencia creciente; debido a esto, producirlas mediante nuevas fuentes cobra importancia a nivel industrial. Estas enzimas son producidas por fermentación de diversos microorganismos, dentro de los cuales las de origen fúngico tienen gran interés, dado que se favorecen procesos de transferencia de estas al medio. *Humphreya coffeata*, es un hongo de la familia Ganodermataceae, muchos de los cuales han sido estudiados por la capacidad de producir compuestos con actividad biológica. Sin embargo, para este en específico no se ha reportado el potencial en la producción de enzimas. En el presente trabajo se evaluó la producción de amilasas, pectinasas y celulasas a partir de *Humphreya coffeata*, en cultivo sumergido bajo dos configuraciones de matraz (convencional y bafleado), encontrándose que las 3 enzimas son producidas por el hongo, teniendo mayor potencial pectinasas con una producción de 1,16 U/mL para exo-pectinasa y un porcentaje de reducción de viscosidad asociado a endo-pectinasa del 4%.

KEYWORDS: *Humphreya coffeata*, enzimas, configuración de matraz, hidrolasas

INTRODUCCIÓN:

Las enzimas son catalizadores biológicos que aceleran la velocidad de las reacciones propiciando que sean viables o se logre obtener un producto determinado en menor tiempo, sin modificar la constante de equilibrio; su ventaja frente a catalizadores químicos radica en que son producidas de manera biológica y sus productos o subproductos generalmente poseen menor impacto ambiental que los catalizadores químicos.

Estas son ampliamente usadas en diversos procesos tanto a nivel celular, como nivel químico e industrial (Moral et al., 2015).

Pueden clasificarse de diferentes formas, de acuerdo con su función principal y se encuentran inmersas en diversas áreas como cosmética, alimentos, o aplicaciones técnicas.

El 75 % de las enzimas que se producen a nivel industrial son de tipo hidrolítico entre las que se encuentran las celulasas, pectinasas y amilasas (Li et al., 2012) .

A nivel industrial un alto porcentaje de las enzimas son producidas mediante fermentación en sumergido de diversos microorganismos, 50 % por hongos y levaduras seguido de bacterias con un 35 % (Moral et al., 2015).

Los hongos han sido utilizados industrialmente por la capacidad de producir una gran variedad de enzimas de forma extracelular, lo cual facilita los procesos de separación haciendo más rentable su producción, así la mayoría de enzimas hidrolíticas son producidas por hongos pertenecientes al género *Aspergillus*; por ejemplo cepas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma longibrachatum* han sido reportados como productores de celulasas, pectinasas y amilasas (Li et al., 2012).Especies de *Trichoderma* y algunos hongos filamentosos como *Aspergillus niger* han sido encontradas en suelos agrícolas y madera en descomposición lo que demuestra que en la hidrólisis de dichos compuestos trabajan de manera sinérgica enzimas como: celulasas, hemicelulasas, pectinasas y ligninasas (Awojobi et al., 2013).

Por su parte, la producción de pectinasas para ser usada en la clarificación de jugos ha sido evaluada por Sandri et al., (2011) en especies fúngicas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* encontrando que los extractos obtenidos logran hasta un 75% de clarificación en jugos de manzana (Sandri, et al., 2011). De igual manera, Awojobi et al (2013), evaluaron especies de *Trichoderma* para la producción de celulasas extracelulares, encontrando resultados favorables para *T. longibrachiatum* con producción de hasta 1000 U/mL usando CMC como sustrato (Awojobi et al.,2013). Estas especies también han sido usadas en la producción de amilasas como lo reportan Carlsen y Nielse (2001) quienes usaron cepas de *Aspergillus oryzae* para la producción de amilasas, , encontrando que la glucosa favorecía la producción de estas enzimas al ser comparados con otros sustratos como maltosa y galactosa (Carlsen y Nielsen, 2001).

Dentro de los hongos se encuentran los basidiomicetos que corresponden a un grupo de hongos de aproximadamente 30.000 especies que han sido estudiados por la producción de metabolitos biológicamente activos (Brizuela et al., 1998) donde las enzimas corresponden a un gran grupo de interés. Por ejemplo, a partir de Basidiomicetos como *Trachyderma tsunodae* se ha logrado producir enzimas como bilirubin- oxidasa reportada por Brizuela et al., (1998) y cepas de *Oudemansiella*, *Coprinus*, *Auricularia*, *Poria*, que han sido utilizadas para producir colesterol-oxidasa importante en diversos tratamientos médicos (Brizuela et al., 1998), así *Humphreya coffeata* es un basidiomiceto, al que no se le ha estudiado su potencial enzimático, a pesar de que muchos de sus procesos biológicos requieren de la presencia de las mismas (Brizuela et al., 1998).

La forma más común de producción de las enzimas, son los cultivos en fermentación sumergida donde se hace fundamental generar condiciones de crecimiento que favorezcan la producción de las enzimas tales como cambios en las condiciones hidrodinámicas del cultivo, que pueden ser generados por diferentes configuraciones de matraces, como los sistemas bafleados y de resorte que han sido estudiados en cultivos

filamentosos y pueden afectar la transferencia de oxígeno (Palacios-Morales et al., 2016) (Gamboa-Suasnavart et al., 2011) (Saat et al., 2014).

El objetivo del trabajo fue evaluar la producción de celulasas, amilasas, y pectinasas a partir de *Humphreya coffeata* y determinar el efecto de la configuración del matraz sobre la producción de estas enzimas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Conservación, activación de la cepa y condiciones de crecimiento

Humphreya coffeata cepa nativa, se encuentra en el cepario de la Universidad EAFIT, conservado en discos de papel filtro de 0,5 cm de diámetro, con 5 mL de agua destilada estéril y almacenados a 4 °C (García-García et al., 2014).

Para la activación de la cepa, un disco de papel filtro con micelio fue incubado en caja Petri con PDA durante 6 días a 30 °C. Posteriormente, 5 discos de agar fueron inoculados en 50 mL de medio con la siguiente composición (g/L): glucosa 35; peptona 5; Extracto de levadura 2,5; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; vitamina B1 0,05 (Porrás-Arboleda et al., 2009), incubados 72 h a 150 rpm y 37 °C.

Finalmente, 5 mL del inóculo, que corresponde a 0,14 g/L de biomasa fueron inoculados en Erlenmeyer de 250 mL con 45 mL de medio específico para cada enzima reportado en la literatura.

2.2 Cultivo en matraces

Los cultivos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL de dos configuraciones: convencional (MC) de altura 144,93 mm, altura de cuello 43,43 mm y diámetro de boca 30,6 mm y Bafleado (MB) con altura 126,74 mm, altura de cuello 21,84 mm y diámetro de boca 27,8 mm.

La composición del medio de cultivo varió de acuerdo con la enzima que se deseaba inducir. Para la producción de amilasas la composición en g/L fue: Almidón 5, Extracto de levadura 5, K_2HPO_4 0,5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,1, Peptona 5 (Shankar et al., 2017).

Por su parte, para la producción de pectinasas se utilizó, en (g/L): Extracto de levadura, 1,0; Glucosa, 10,0; K_2HPO_4 , 0,4; KH_2PO_4 , 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,4; Pectina cítrica 2, (Uzuner y Cekmecelioglu, 2015).

Y para la producción de celulasas se usó el medio de cultivo reportado en la literatura modificado (g/L): CMC (Amtex, baja viscosidad) 10, extracto de levadura 0,60; KH_2PO_4 7; K_2HPO_4 2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,15; $(NH_4)_2SO_4$ 1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01; KCl 0,50 (Goldbeck et al., 2013).

Los cultivos se incubaron a 30 °C y 150 rpm (Incubadora de agitación C25 New Brunswick Scientific;) durante 12 días, realizando sacrificio de matraz cada 4 días.

2.3 Métodos analíticos

La concentración de biomasa de *H. coffeata* se determinó por método gravimétrico de peso seco, filtrando al vacío todo el cultivo celular a través de papel filtro (BOECO 392), previamente pesado. La biomasa fue secada a 40 °C por 24 h.

La determinación de azúcares reductores remanente en el medio de cultivo se cuantificó por el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS), (Miller, 1959), empleando glucosa como estándar.

2.4 Actividad pectinolítica

2.4.1 Actividad endo-pectinasa

Para la determinación de la actividad endo-pectinasa, 7,5 mL de solución de ácido poli galacturónico (alfa Aesar) al 1% en buffer acetato (pH 4,5, 0,1 M) fueron mezclados con 2,5

mL de muestra de cultivo libre de células e incubados a 45°C por 10 min. La reacción fue detenida poniendo las muestras en hielo por 7 min; cuando la mezcla alcanzó la temperatura ambiente se midió la viscosidad en un viscosímetro de Ostwald.

La actividad endo-pectinolítica fue definida como reducción en el porcentaje de viscosidad respecto al sustrato (Sandri et al., 2011).

2.4.2 Actividad exo-pectinasa

Para la determinación de la actividad exo-pectinasa se utilizó como sustrato una solución al 1 % de ácido poli galacturónico, pectina cítrica (alfa Aesar) en buffer acetato (pH 4,5, 0,1 M). Se tomaron 400 µL de sustrato con 100 µL de extracto y se incubaron a 45°C por 20 min. La determinación de azúcares liberados se realizó por el método de DNS (centrifugando a 14000 rpm por 5 min posterior a la reacción), usando ácido galacturónico como estándar (Sandri et al., 2011).

Una unidad de exo-pectinasa fue definida como la cantidad de extracto enzimático necesario para hidrolizar la pectina y formar 1 µmol de ácido galacturónico por minuto bajo las condiciones de reacción especificadas (Debing et al., 2006).

2.5. Actividad amilolítica

80 µL del extracto crudo fueron mezclados con 400 µL de solución buffer citrato (pH 5,0, 0,1 M) y 800 µL de almidón soluble al 4% en agua, se dejó en reposo a 40 °C por 15 min y la reacción fue detenida adicionando 480 µL de DNS. Finalmente, se determinó el azúcar liberado mediante el método de DNS.

Una unidad amilolítica fue definida como la cantidad de extracto enzimático que libera 1 µg de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones establecidas (Sánchez et al., 2016).

2.6. Actividad celulolítica

2.6.1. Actividad exo-glucanasa sobre papel filtro

50 mg de papel filtro (filtro Advanced 100) fueron mezclados con 1 mL de solución buffer citrato (pH 4,8, 0,05 M) y 1 mL de extracto enzimático, e incubados a 50°C por 60 min. Finalmente se determinaron los azúcares libres mediante el método de DNS (Goldbeck et al., 2013).

Una unidad exo-glucanasa fue definida como la cantidad de extracto enzimático que libera 1 µg de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones establecidas.

2.6.2 Actividad endo-glucanasa

Se tomaron 0,5 mL de CMC al 1% en buffer citrato (pH 4,8, 0,05 M) con 0,5 mL de extracto y se incubaron a 50 °C por 10 min. Se determinaron los azúcares libres mediante el método de DNS (Goldbeck et al., 2013).

Una unidad endo-glucanasa fue definida como la cantidad de extracto enzimático que libera 1 µg de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones establecidas.

2.6.3 Actividad betaglucosidasa

1 mL de Celobiosa 15 mM en buffer citrato pH 4.8, 0,05 M fue mezclado con 1 mL de extracto e incubado a 50 °C por 30 minutos. Finalmente se midieron los azúcares liberados con un kit de glucosa oxidasa (sigma) (Goldbeck et al., 2013).

Una unidad betaglucosidasa fue definida como la cantidad de extracto enzimático que libera 1 µg de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones establecidas.

2.7 Análisis estadístico

Los análisis se realizaron mediante Análisis de varianza (ANOVA), con un 95 % de confianza, usando el software STATGRAPHICS CENTURION.

Todas las muestras fueron realizadas con 2 réplicas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efecto de la configuración de matraz y sustrato en el crecimiento celular de *Humphreya coffeata*

El desarrollo de la cinética de crecimiento de *Humphreya coffeata* crecida en dos configuraciones de matraz, matraz convencional (MC) y matraz bafleado (MB) en medio enriquecido con una mezcla de pectina cítrica y glucosa, almidón y CMC se muestra en la Figura 1.

En los medios enriquecidos con pectina cítrica (Figura 1A), la máxima producción de biomasa alcanzada a los 12 días del cultivo se presentó en los cultivos MB, con una producción de $7,4 \pm 0,003$ g/L, comparado con los cultivos en MC, donde la producción fue de $4,6 \pm 0,0002$ g/L, para lo cual se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gamboa-Suasnavart et al., (2011) y Marín-Palacio et al., (2014), quienes encontraron mayor producción de biomasa en cultivos de *Streptomyces lividans* cuando estos fueron conducidos en MB comparados con los MC.

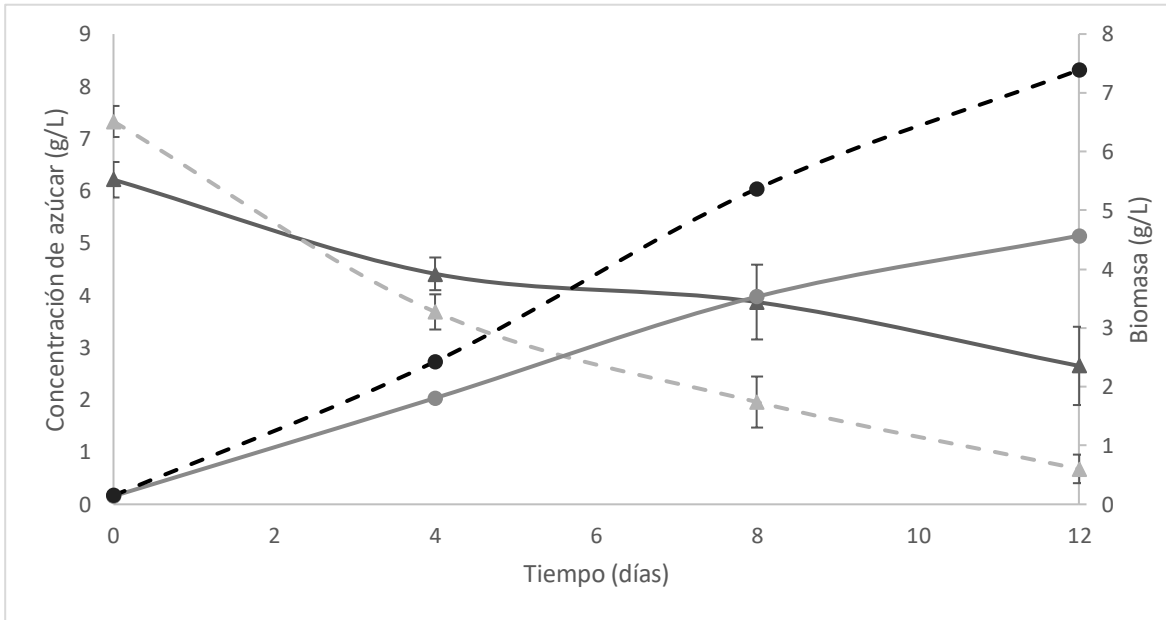
Estos comportamientos encontrados en sistemas MB fueron estudiados por Palacios-Morales et al., (2016) quienes sugirieron que la configuración del MB genera un flujo turbulento que favorece el crecimiento celular, dado que generan altas variaciones en las velocidades de flujo.

A su vez los obstáculos en configuraciones bafleadas permiten zonas de estrés hidrodinámico que promueve la elongación y ruptura de la biomasa, lo cual afecta la morfología de los microorganismos evaluados, siendo más pequeños para las geometrías en bafles, aumentando la transferencia de oxígeno y su adsorción.

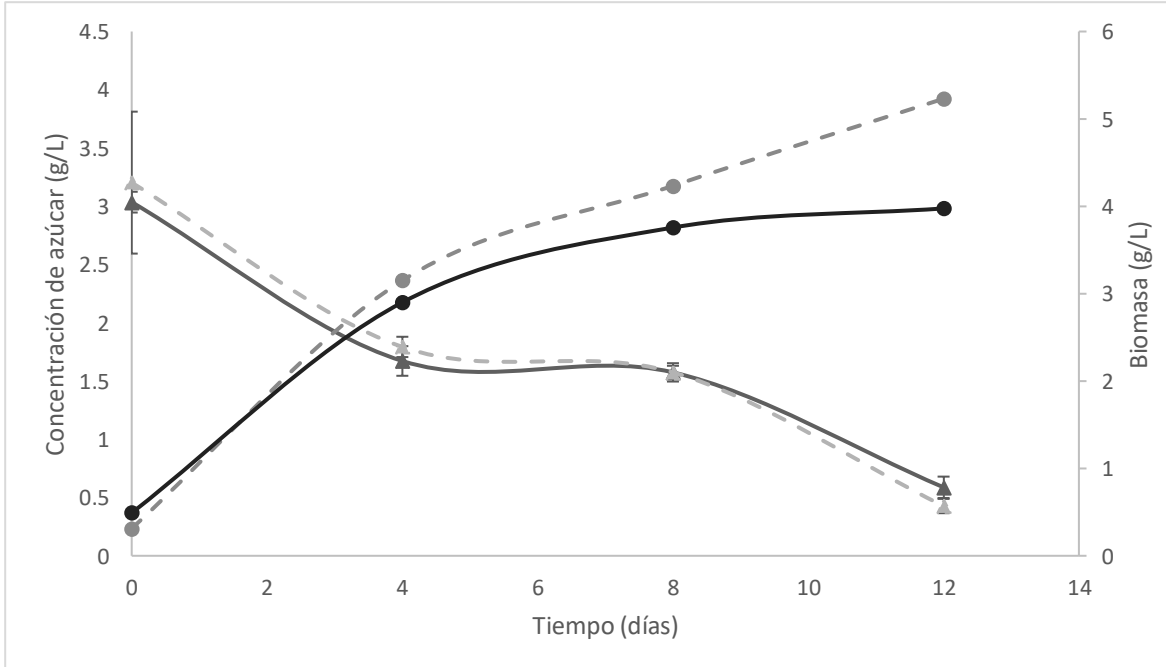
Por otro lado, la velocidad específica de crecimiento ajustada mediante el modelo logístico fue de $0,45 \text{ d}^{-1}$ para los MB (R^2 de 0,89) y de $0,41 \text{ d}^{-1}$ para los MC (R^2 de 0,91), los R^2 de estos modelos obtenidos indican buen ajuste de los datos experimentales para el modelo usado, estos resultados son comparables con lo reportado por Gamboa-Suasnavart et al., (2011) quienes encontraron mayores velocidades de crecimiento en cultivos de *Streptomyces lividans* crecidos en MB respecto a MC.

Los cultivos en MB presentaron un mayor consumo de azúcar, representado por un valor de 0,69 g/L de azúcar remanente al finalizar el cultivo con respecto al MC con 2,3 g/L, lo que podría estar relacionado con la mayor producción de biomasa obtenida en MB. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Saat et al., (2014), quienes no encontraron diferencias significativas en la producción de biomasa y el consumo de glucosa en cultivos de *Pycnoporus sanguineus* usando sistemas bafleados y convencionales.

A.



B.



C.

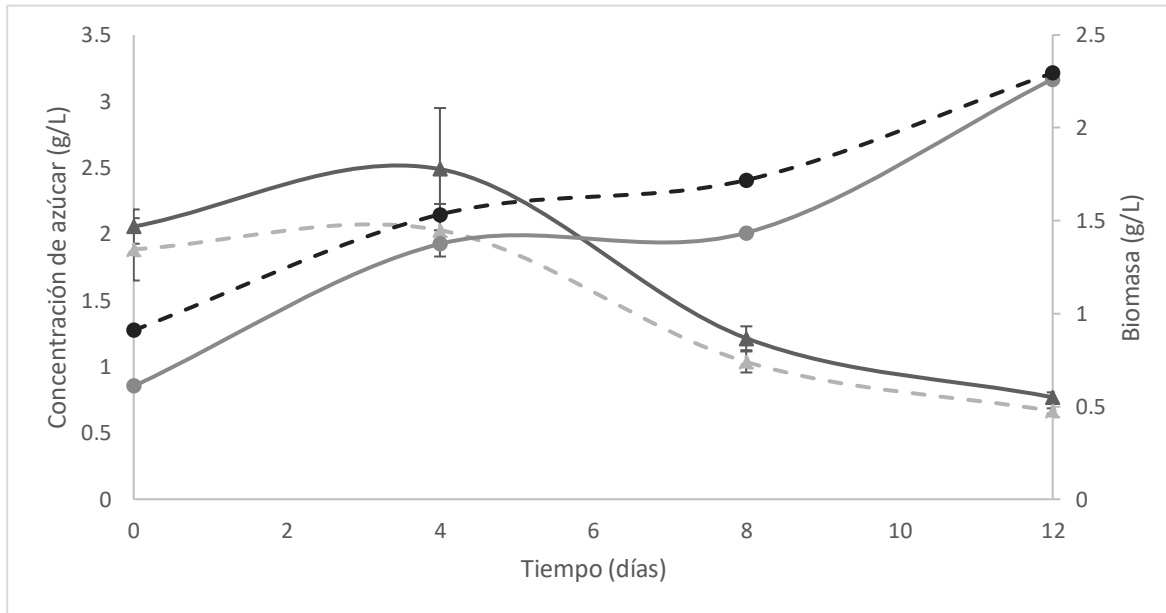


Figura 1 Cinética de crecimiento (circulo relleno) y consumo de sustrato (cuadrado relleno) de *Humphreya coffeata* crecida en matraces convencionales (línea continua) y matraces bafleados (línea discontinua) incubados a 30 °C y 150 rpm en un medio enriquecido con pectina cítrica y glucosa (A), almidón (B) y CMC (C).

Por su parte, aunque no se encontraron diferencias significativas para la producción de biomasa en cultivos enriquecidos con almidón (Figura 1B), se alcanzó en MB una concentración de $5,3 \pm 0,02$ g/L, mientras que en MC hubo una reducción del 20 % en la producción, con una concentración de $4,3 \pm 0,05$ g/L a los 12 días de cultivo.

Respecto a la velocidad específica de crecimiento determinada mediante el modelo logístico se encontró que el sistema de MB alcanzó un valor de $0,33$ d⁻¹ (R² de 0,84) respecto a los cultivos en MC donde se alcanzaron velocidades específicas de $0,25$ d⁻¹ (R² de 0,83). Así mismo, no se evidencian diferencias significativas en el comportamiento del consumo de sustrato en ambos sistemas, similar a lo encontrado para el sistema con pectina y glucosa.

Para los cultivos llevados a cabo con CMC (Figura 1C) se alcanza una máxima concentración de biomasa a los 12 días de cultivo con una concentración de $5,3 \pm 0,04$ g/L para sistemas MB y $3,9 \pm 0,003$ g/L para sistemas MC, comportamientos similares fueron obtenidos con respecto al consumo de sustrato. Sin embargo, una pequeña diferencia en la velocidad específica de crecimiento fue encontrada $0,13$ d⁻¹ para MC (R² de 0,78) y $0,08$ d⁻¹ para MB (R² de 0,84).

El modelo para MC presenta menor ajuste a los datos respecto a MB lo cual podría explicar que MB sea menor que MC para el sistema con CMC comparado con los sistemas con pectina/glucosa y almidón, para los cuales MB siempre fue mayor. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas; resultados similares a los encontrados por Saat et al., (2014), con *Pycnoporus sanguineus*, quienes no encontraron diferencias en el crecimiento para ambos sistemas de matraces a velocidades de agitación menores a 250 rpm donde la transferencia de oxígeno podría ser similar.

Al comparar el crecimiento de *Humphreya coffeata* en los tres sustratos evaluados y en las dos configuraciones de matraz se puede decir que la velocidad específica de crecimiento fue mayor para la configuración de matraz bafleados que para la configuración de matraz convencional y que dichos valores son menores en un 15 % para el uso de almidón y un 80

% para el sistema con celulosa comparados con el medio de cultivo que contiene como fuente de carbono glucosa-pectina cítrica; lo cual indica que podría existir una mayor afinidad por la glucosa-pectina.

La diferencia encontrada, pudo ser debido a la presencia de glucosa como una fuente de carbono más asimilable y fácil de consumir por los microorganismos y aún más en hongos, puesto que la mitad del peso de estos equivale a carbono y es fuente directa para la formación de piruvato en el proceso de glicolisis, donde el sistema de transporte del mismo y las enzimas requeridas para su procesamiento hacen parte del microorganismo de manera innata, lo cual significa que no requiere adaptación (Olsson et al., 2006).

3.2 Actividad Enzimática

3.2.1 Actividad Pectinolítica

El comportamiento de la actividad pectinolítica de los extractos obtenidos de *Humphreya coffeata* son mostrados en Figura 2. La actividad endo-pectinasa, medida en función de la reducción de viscosidad de una solución de ácido poligalacturónico al 1% p/V, muestra que las mayores reducciones de viscosidad se obtuvieron en los medios llevados a cabo en MB con una reducción máxima del 4,5%, al ser comparadas con MC donde solo se alcanza una reducción del 2,5%. Comportamientos contrarios fueron obtenidos para la actividad exo-pectinasa, donde se alcanza una actividad de 1,6 U/mL de MC y de 1,2 U/mL en MB. A pesar de que no se encuentran diferencias significativas ($p > 0,05$).

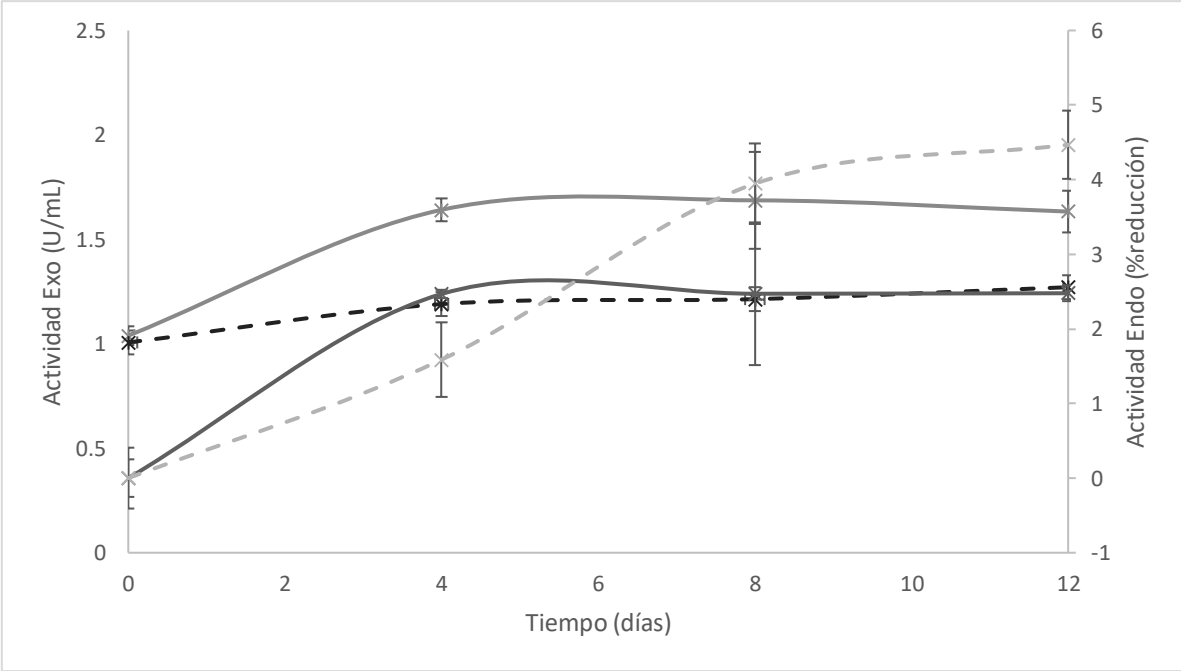


Figura 2 Actividad pectinolítica de extractos de *Humphreya coffeata* crecida en matraces convencionales (línea continua) y matraces bafleados (línea discontinua) incubados a 30°C y 150 rpm. Actividad Endo-pectinasa(equis), actividad exo-pectinasa (asterisco).

Estos resultados son cercanos a lo encontrados por Arellano et al. (2015), quienes evaluaron cepas de *Bacillus* en cáscaras de toronjo y naranja como sustrato, encontrando actividades exo-pectinasa entre 1,5 U/mL y 3,3 U/mL. Por su parte Uzuner y Cekmecelioglu (2015), para un sistema bacteriano de *Bacillus subtilis* alcanzaron actividades enzimáticas exo-pectinasa de 5,06 U/mL a las 72 h de cultivo; mientras que Poondla et al. (2015), en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* logró actividades Exo-pectinasas de 6 U/mL.

Anuradha et al., (2014), estudió el efecto de la morfología de *Aspergillus awamori* MTCC 9166 modificando condiciones de cultivo como temperatura, pH y velocidad de agitación, para el cual encontraron que las mismas condiciones favorables de pH 5,5, temperatura de 28 °C y agitación de 200 rpm de fermentación favorecen la producción de biomasa y de poligalacturonasa con valores de 17,8 U/mL para *pellets* de tamaño medianos; efecto que podría relacionarse al obtenido con MB donde se observaron morfologías de tamaño pequeño (2 veces menores aproximadamente) respecto a las obtenidas mediante MC.

Finalmente, Sandri et al., (2011) estudiaron pectinasas aisladas de cepas fúngicas de *Aspergillus niger* en procesos de clarificación de jugos determinando la actividad pectinolítica como la reducción en el porcentaje de viscosidad de una solución de pectina, encontrando una reducción máxima de 98%, confiriéndole cualidades favorables para su uso en procesos industriales. Valor significativamente mayor que el encontrado en el presente estudio.

A pesar de que la actividad endo-pectinasa se encuentra por debajo de valores presentados en la literatura, la exo-pectinasa presenta valores cercanos a otras pectinasas aisladas de sistemas biológicos, por lo cual cabe anotar que la medida de reducción de viscosidad no es una medida favorable y directa como lo propuso Jayani et al., (2005), quienes indican que a pesar de que generalmente se ha asociado la reducción en la viscosidad como una medida de actividad enzimática de la pectinasa, no se ha encontrado una relación directa entre ese cambio de viscosidad y los enlaces hidrolizados contrario a lo obtenido mediante la medida asociada a la liberación de azúcares por acción de la exo-pectinasa.

Además Schnitzhofer et al., (2007) encontraron para un sistema de *Sclerotium rolfsii* una clara distinción o preferencia de producción respecto a ambos tipos de pectinasa donde se podría considerar como endoenzima en el caso de grandes cambios en la viscosidad o exoenzima en el caso de cambios pequeños en la viscosidad, asociados a una hidrólisis en el final de la cadena.

3.2.2 Actividad amilolítica

En la Figura 3 se presenta la actividad amilolítica de los extractos obtenidos de *Humphreya coffeata*.

El valor máximo de actividad enzimática fue de 0,11 U/mL a los 8 días de cultivo, para ambas geometrías de matraz ($p > 0,05$).

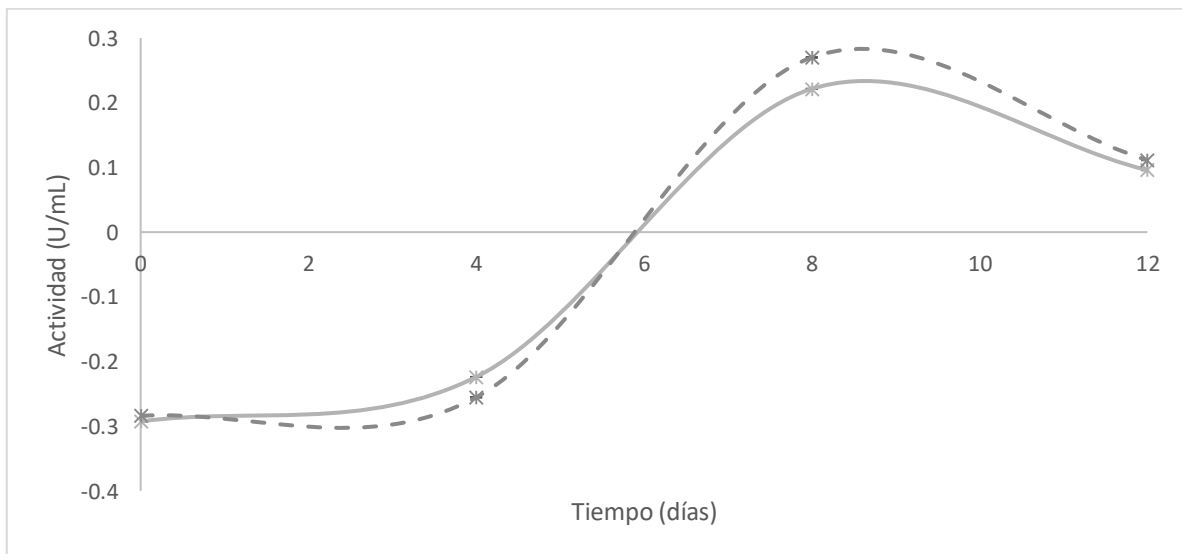


Figura 3 Actividad amilolítica de extractos de *Humphreya coffeata* crecida en matraces convencionales (línea continua) y matraces bafleados (línea discontinua-) incubados a 30 °C y 150 rpm.

Al comparar la actividad amilolítica de los extractos obtenidos en este estudio con otros reportes en diferentes modelos biológicos, se puede evidenciar la poca actividad obtenida bajo las condiciones evaluadas.

Por ejemplo, extractos de cultivos de *Bacillus sp. MB6* en cultivo en sumergido usando almidón soluble como fuente de carbono alcanzaron actividades de 210 U/mL (Shankar et al., 2017); mientras Kumar et al., (2012) usando *Iriformospora* en fermentación sumergida con almidón soluble como fuente de carbono lograron actividad amilasa de 39,48 U/mL. Por su parte, resultados con valores mayores de actividad (550 U/mL) fueron encontrados por Dar et al.,(2015), para cepas de *Penicillium chrysogenum* usando torta de linaza como sustrato y modificando parámetros de proceso como pH de fermentación, sugiriendo que pH ácidos favorecen la producción de amilasa para este microorganismo (Dar et al., 2015).

La diferencia en los valores de actividad podría estar influenciada por el tipo de fuente de carbono a usar durante la fermentación y la afinidad por el mismo de cada microorganismo, como lo presentaron Carlsen y Nielsen, (2001) quienes al evaluar la producción de amilasa a partir de *Aspergillus oryzae* utilizando diferentes fuentes de carbono encontraron diferencias en la producción enzimática, donde para galactosa la actividad fue nula pero con la adición de una baja concentración de glucosa si se presentó actividad (Carlsen y Nielsen, 2001), lo que sugiere que bajo las condiciones evaluadas el potencial de *Humphreya coffeata* para producir amilasas es bajo.

3.2.3 Actividad Celulolítica

La actividad enzimática medida como endo-glucanasa, exo- glucanasa y beta glucosidasa son presentadas en la Figura 4. La mayor actividad exo-celulolítica se alcanzó el día 8 con una actividad aproximada de 0,8 U/mL para ambas configuraciones de matraz ($p > 0,05$), y comienza a disminuir hasta el día 12, lo cual sugiere que podrían estarse produciendo enzimas que las degradan o inhibidores que se van generando en el proceso fermentativo como fenoles u otros azúcares. Por ejemplo, Li et al., (2013) expusieron que acumulación de

celobiosa inhibe la actividad de endo-glucanasa y exo-glucanasa lo cual podría explicar dicha disminución, dado que es coherente con el resultado presentado en la figura 4, donde existe una disminución en la actividad endo y exo glucanasa, al aumentare la actividad beta glucosidasa, que libera celobiosa.

Este valor encontrado para actividad exo-glucanasa es similar al reportado por Salmon et al.,(2014), quienes encontraron valores cercanos a 1 U/mL a partir de *Ganoderma applanatum* indicando que este valor es significativamente menor para este tipo de microorganismo respecto a otros similares.

Ahora bien, varios trabajos han sido encontrados referente a variaciones de cultivo o reacción que favorezcan la producción de celulasas, por ejemplo Li et al., (2013), evaluaron condiciones óptimas de pH de fermentación para producir celulasas a partir de *Trichoderma reesei* y el efecto del mismo sobre la morfología, encontrando que para exoglucanasas la actividad máxima se logró a las 80 horas de cultivo con un valor de 12 U/mL y no reportan una relación entre los cambios morfológicos dados por el cambio en el pH y su producción enzimática.

El efecto de la fuente de carbono también ha sido evaluado en la actividad de enzimas celulolíticas. Awojobi. et al., (2013) determinaron el efecto de la fuente de carbono usada en la fermentación para cepas de *Trichoderma*, sobre la actividad celulolítica asociada a exoglucanasas ,encontrando actividades de hasta 400 U/mL usando CMC como sustrato en comparación con otros sustratos como galactosa, sacarosa, fructosa o almidón donde las actividades se redujeron hasta un 25 %.

Ahora bien al evaluar la actividad endo-glucanasa referente a la celulasa que actua sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos internos en las unidades de glucosa de manera aleatoria, se observó que no hubo diferencias significativas entre ambas configuraciones de matraz ($p > 0,05$), y una disminución en la actividad durante el tiempo de cultivo, lo cual es similar a

lo encontrado para exocelulasas que sugiere la degradación de las mismas por posible acumulación de celobiosa en el medio.

La mayor actividad se obtuvo a los 8 días de cultivo con un valor de 0,09 U/mL siendo significativamente menor a la actividad endo-glucanasa encontrada por Li et al., (2013), quienes reportan una actividad de hasta 40 U/mL para *Trichoderma reesei* en condiciones óptimas de pH (4,5). Además, indican que *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Rhizopus*, han sido ampliamente usados en la producción de enzimas tipo celulasas, donde especialmente *Trichoderma* presenta una buena habilidad para producir endoglucanasas 20-36 % y exoglucanasas 60-80 % respecto a otros microorganismos.

A su vez, Paredes et al., (2010) encontraron que *Lentinula edodes* en pseudotallo de residuos de cultivo de banano alcanzó las actividades más altas de 8,14 UI/g en residuo seco para la medida de actividad celulolítica sobre CMC, asociado a actividad endoglucanasa.

Finalmente para las β -glucosidasa se encontraron valores desde 0,002 hasta 0,2 U/mL. Este valor para la β -glucosidasa es similar al encontrado por Li et al., (2013), usando *Trichoderma reesei* donde reportan la producción de celobiosa como inhibidor de endo y exoglucanasas; por ende la acción de la β -glucosidasa podría explicar la reducción en la actividad de las otras dos celulasas (Endo,Exo) (Ponce y Pérez 2002).

Para este caso se encontró que a partir del día 8 existe una tendencia constante hasta el día 12, y es justo en ese punto donde se da la máxima actividad beta glucosidasa y disminuye la actividad endo-glucanasa y exo-glucanasa.

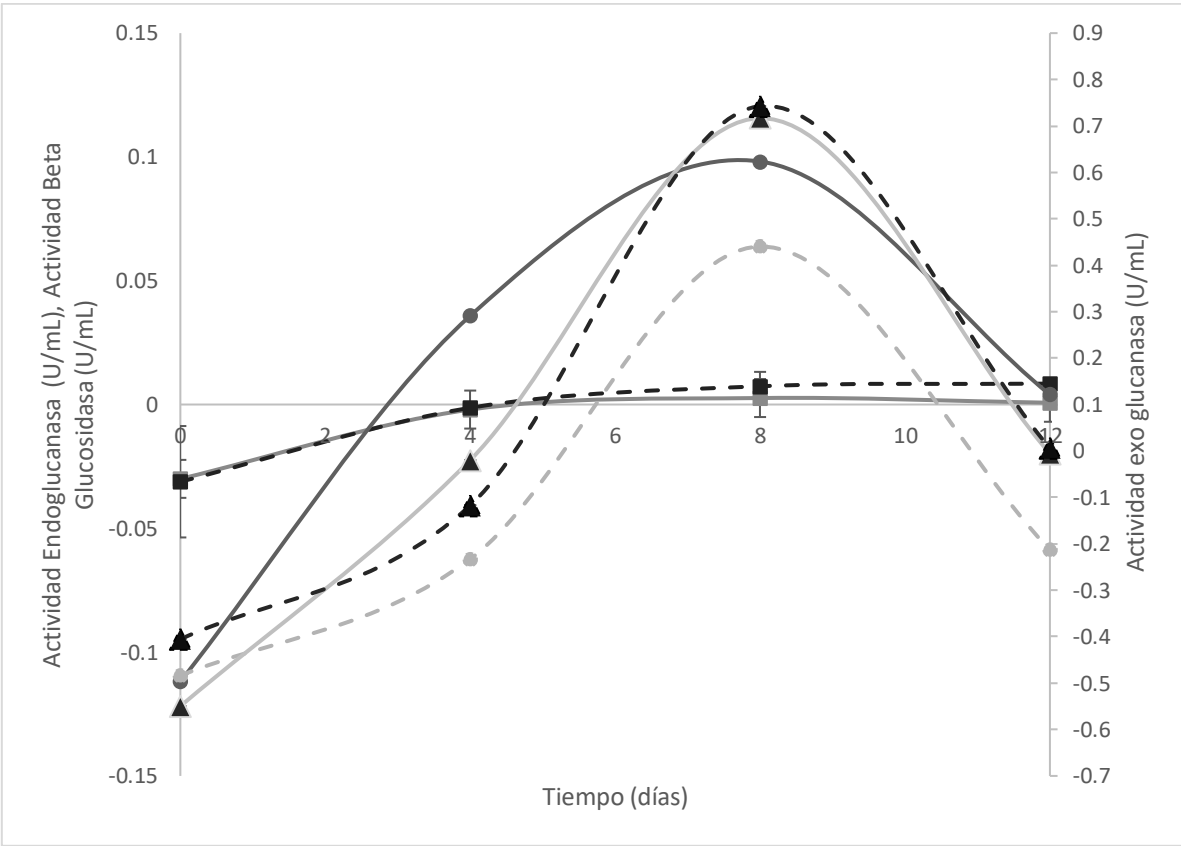


Figura 4 Actividad celulolítica de extractos de *Humphreya coffeata* crecida en matraces convencionales (líneas continuas) y matraces bafleados (líneas discontinuas) incubados a 30°C y 150 rpm. Actividad Endoglucanasa (circulo), Actividad Exoglucanasa (triángulo) y Actividad Beta-glucosidasa (cuadrado).

Los valores determinados para las celulasas indican que *Humphreya coffeata* posee actividad celulolítica similar a otras cepas fúngicas, aunque estos valores podrían potencializarse con el uso de otros sustratos inductores como lo determinaron Kobakhidze et al., (2016) quienes evaluaron la inducción de endocelulasas y xilanasas en basidiomicetos de podredumbre blanca como *Fomes fomentarius* y en *Pseudotrametes gibbosa* usando diferentes fuentes de carbono, encontrando que al usar Avicel como sustrato, las actividades de endo-glucanasa y xilanasas variaron de 3,9 U / mL y 7,4 U / mL en *Fomes fomentarius* y 34,2 U / mL y 29,5 U / mL en *Pseudotrametes gibbosa*, mientras que el uso de carboximetilcelulosa o xilano redujo la actividad endo-glucanasa hasta casi 1 U/mL.

CONCLUSIONES

Humphreya coffeata posee potencial para producir enzimas hidrolíticas como celulasas y pectinasas y aunque la geometría del matraz influye en la producción de biomasa, la actividad enzimática no se ve afectada. Estos resultados sugieren a *Humphreya coffeata* como buen candidato para la producción de estas enzimas, con mayor potencial para producción de pectinasas, dados los valores encontrados y comparados con la literatura; sin embargo, se hace necesario realizar otros estudios posteriores enfocados en maximizar la producción de estas.

BIBLIOGRAFÍA

- Anuradha, K., Padma, P. N., Venkateshwar, S., & Reddy, G. (2014). Effect of physical factors on pellet morphology of *Aspergillus awamori* MTCC 9166 and polygalacturonase production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 271-274.
- Arellano, J., Ilich, S., Salazar, M., Rodríguez, I., Torres, P., & Alarcón, W. (2015). Producción de pectinasas por *Bacillus spp.* a partir de cáscaras de naranja y de toronja como fuente de carbono. *Revista Rebiol* ,35(1), 62-69.

- Awojobi, K. O., Agboola, F. K., Arotupin, D. J., Oladoye, C. O., & Olutiola, P. O. (2013). The screening and selection of *Trichoderma* species capable of producing extracellular cellulolytic enzymes from soil of decaying plant materials. *Ife Journal of science*, *15*(2), 263–271.
- Blanco, A. S., Durive, O. P., Pérez, S. B., Montes, Z. D., & Guerra, N. P. (2016). Simultaneous production of amylases and proteases by *Bacillus subtilis* in brewery wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*(3), 665-674.
- Brizuela, M. A., García, L., & Pérez, L. (1998). Basidiomicetos : nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana Micología*, *15*, 69–74.
- Carlsen, M., & Nielsen, J. (2001). Influence of carbon source on α -amylase production by *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *57*(3), 346–349.
- Dar, G. H., Kamili, A. N., Nazir, R., Bandh, S. A., Jan, T. R., & Chishti, M. Z. (2015). Enhanced production of α -amylase by *Penicillium chrysogenum* in liquid culture by modifying the process parameters. *Microbial pathogenesis*, *88*, 10-15.
- Debing, J., Peijun, L., Stagnitti, F., Xianzhe, X., & Li, L. (2006). Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *64*(2), 244–250.
- Gamboa-Suasnavart, R. A., Valdez-Cruz, N. A., Cordova-Dávalos, L. E., Martínez-Sotelo, J. A., Servín-González, L., Espitia, C., & Trujillo-Roldán, M. A. (2011). The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microbial Cell Factories*, *10*(1), 110
- Goldbeck, R., Ramos, M. M., Pereira, G. A. G., & Maugeri-filho, F. (2013). Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. *Bioresource Technology*, *128*, 797–803.
- Garcia-Garcia, M., Rocha-zavaleta, L., Valdez-cruz, N. A., & Trujillo-roldán, M. A. (2014). Conservation of the mycelia of the medicinal mushroom *Humphreya coffeata* (Berk

-) Stey . in sterile distilled water,MethodsX1, 19–22
- Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review.*Process Biochemistry*,40(9), 2931-2944.
- Kobakhidze, A., Asatiani, M., Kachlishvili, E., & Elisashvili, V. (2016). Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes. *Annals of Agrarian Science*, 14(3), 169–176.
- Kumar, V., Sahai, V., & Bisaria, V. S. (2012). Production of amylase and chlamydo spores by *Piriformospora indica* , a root endophytic fungus. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(2), 124–128.
- Li, C., Yang, Z., Zhang, R.H.C., Zhang, D., Chen, S., & Ma, L. (2013). Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 470–477.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*,2(3),1-11
- Marín-Palacio, L. D., Gamboa-Suasnavart, R. A., Valdez-Cruz, N. A., Servín-González, L., Córdova-Aguilar, M. S., Soto, E., ... & Trujillo-Roldán, M. A. (2014). The role of volumetric power input in the growth, morphology, and production of a recombinant glycoprotein by *Streptomyces lividans* in shake flasks.*Biochemical engineering journal*,90, 224-233.
- Moral, S., Ramírez-coutiño, L.P., & García-gómez, M. D. J. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(3), 87–102.
- Palacios-Morales, C., Aguayo-Vallejo, J. P., Trujillo-Roldán, M. A., Zenit, R., Ascanio, G., & Córdova-Aguilar, M. S. (2016). The flow inside shaking flasks and its implication for mycelial cultures. *Chemical Engineering Science*, 152, 163–171.
- Paredes, D.,Álvarez, M.,& Silva, M. (2010). Obtención de Enzimas Celulasas por

Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del Cultivo de Banano, *Revista Tecnológica ESPOL*, 23, 81–88.

Ponce, T., Pérez, O., (2002, septiembre). Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y Perspectiva* [PDF file]. Retrieved from <http://eclipse.red.cinvestav.mx/publicaciones/avayper/sepoct02/CELULASAS.PDF>

Poondla, V., Bandikari, R., Subramanyam, R., & Obulam, V. S. R. (2015). Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 70-76.

Porras-Arboleda, S.M., Valdez-Cruz, N.A., Rojano, B., Aguilar, C., Rocha-Zavaleta, L., & Trujillo-roldán, M. A. (2009). Mycelial Submerged Culture of New Medicinal Mushroom, *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. (Aphyllophoromycetideae) for the Production of Valuable Bioactive Metabolites with Cytotoxicity, Genotoxicity, and Antioxidant Activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 11(4), 335–350.

Olsson, L., Christensen, T. M. I. E., Hansen, K. P., & Palmqvist, E. A. (2003). Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 612–619.

Saat, M. N., Annuar, M. S. M., Alias, Z., Chuan, L. T., & Chisti, Y. (2014). Modeling of growth and laccase production by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37(5), 765-775.

Salmon, D. N. X., Spier, M. R., Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. de S., Weingartner, V., Bier, M. C. J., & Faraco, V. (2014). Analysis of inducers of xylanase and cellulase activities production by *Ganoderma applanatum* LPB MR-56. *Fungal Biology*, 118(8), 655–662.

Sandri, I. G., Fontana, R. C., Barfknecht, D. M., & Moura, M. (2011). Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT- Food Science and Technology*, 44, 2217–2222.

Schnitzhofer, W., Weber, H. J., Vršanská, M., Biely, P., Cavaco-Paulo, A., & Guebitz, G. M.

(2007). Purification and mechanistic characterisation of two polygalacturonases from *Sclerotium rolfsii*. *Enzyme and microbial technology*, 40(7), 1739-1747.

Shankar, J., Lall, B. M., Jadhav, S. K., & Tiwari, K. L. (2017). Parameter's optimization and kinetics study of alpha -amylase enzyme of *Bacillus sp* . MB6 isolated from vegetable waste. *Process Biochemistry*, 52, 123–129.

Uzuner, S., & Cekmecelioglu, D. (2015). Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* growing on hazelnut shell hydrolyzate. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 113, 62–67.

ARTICULO 2

EVALUACIÓN DE RESIDUO AGROINDUSTRIAL Y CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS A PARTIR DE *Humphreya coffeata*

Carmona-Saldarriaga Laura¹; Marín-Palacio Luz Deisy¹

Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Bioprocesos (CIBIOP). Departamento de Ingeniería de Procesos. Universidad EAFIT. Medellín. Colombia

ABSTRACT: Las pectinasas son enzimas hidrolíticas que actúan sobre unidades de pectina hasta su degradación a ácido galacturónico. Son ampliamente usadas en la industria alimenticia principalmente en la clarificación de jugos. En el presente trabajo se determinó la producción de pectinasas a partir del cultivo en sumergido de *Humphreya coffeata* usando cáscaras de naranja como fuente de carbono, se evaluó el efecto del pH y temperatura en la actividad enzimática mediante un diseño de experimentos factorial y la inmovilización de la enzima mediante atrapamiento covalente sobre una matriz de alginato de sodio. Se encontró que el uso de cáscaras de naranja como fuente de carbono no afecta la actividad enzimática al ser comparado con el medio pectina/glucosa y que el pH y temperatura favorables para la reacción es 5,5 y 55 °C, con una velocidad enzimática máxima de 0,07 U/mL*min y una constante de afinidad por el sustrato de 0,022 mg/mL, y que la enzima inmovilizada posee actividad pectinolítica 81% por ciento menor a la enzima en estado libre.

KEYWORDS: pectinasas, poligalacturonasas, enzimas hidrolíticas, *Humphreya coffeata*

INTRODUCCIÓN:

Las enzimas son catalizadores biológicos producidas por todos los organismos vivos con el objetivo de aumentar la tasa de las reacciones químicas involucradas en los procesos metabólicos (Archna et al.,2015); su especificidad hace que su interés sea cada vez mayor en diferentes procesos industriales, tales como: procesos de clarificación de jugos, fabricación de pulpas de papel y diversas reacciones químicas. Dentro de las enzimas más

comunes se encuentran las enzimas hidrolíticas que abarcan el 75 % del mercado industrial (Li et al., 2012), en las cuales se encuentran las pectinasas que son enzimas que degradan la pectina presente en diversos tejidos celulares tales como frutas cítricas (Poondla et al., 2015). Estas enzimas han sido utilizadas desde la antigüedad en preparaciones domésticas y fabricación de vinos, lo cual le confirió importancia y permitió su rápida expansión a diversos sectores industriales (Kashyap et al., 2001).

Dentro de las pectinasas se encuentran las poligalacturonasas, que pueden clasificarse como: exo-pectinasas que actúan sobre los enlaces glucosídicos seguidos al carboxilo en la cadena pectica y las endo-pectinasas que atacan la cadena de manera aleatoria (Li et al., 2004).

Estas pectinasas también pueden ser catalogadas como pectinasas ácidas y básicas, dependiendo del pH favorable para su reacción. Dentro de las ácidas se encuentran las usualmente utilizadas en la industria de la clarificación de jugos.

Las pectinasas ácidas son generadas usualmente por especies fúngicas como *Aspergillus niger*. Por su parte pectinasas de carácter básico son de preferencia en procesos de tipo textil y provienen de especies bacterianas como las de género *Bacillus* (Arellano et al., 2015).

A su vez, son varios los estudios que utilizan residuos agroindustriales para producir enzimas: por ejemplo, para el caso de pectinasas han sido evaluados, naranja y toronja (Arellano et al., 2015), cabezas de girasoles (Patil y Dayanand 2005), residuos de yuca (Janani et al., 2012) y jugo de cebolla (Pereira et al., 2017).

A pesar del esfuerzo en el estudio de las enzimas y que cobran mayor interés e importancia a nivel industrial, porque su uso podría permitir operaciones más eficientes (Li et al., 2012), algunos de estos procesos no se encuentran optimizados y las enzimas deben ser removidas en cada lote lo que puede aumentar los costos de producción. En este sentido, se han estudiado estrategias en diferentes partes de la cadena como

condiciones que permitan maximizar la actividad catalítica (Anuradha et al., 2014) y procesos de inmovilización que favorezcan su aplicación en procesos específicos. Dicho proceso de inmovilización consiste en disponer la enzima sobre una matriz, bien sea por atrapamiento, enlace covalente o adsorción, sin comprometer la viabilidad de la reacción (Ramírez-Tapias et al., 2016).

Con base en los resultados anteriormente expuestos relacionados con la prospección de actividad hidrolítica de *Humphreya coffeata* en cultivo en sumergido en dos configuraciones de matraz se encontró que *Humphreya coffeata* posee potencial para producir pectinasas por lo que en esta parte del trabajo se evaluó la cáscara de naranja como fuente de carbono sobre la producción de pectinasas de *Humphreya coffeata*, se determinaron las condiciones de pH y temperatura que favorecen la reacción, los parámetros cinéticos y se evaluó la inmovilización mediante atrapamiento como una aproximación para el uso de estas enzimas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Conservación, activación de la cepa y condiciones de crecimiento

Humphreya coffeata cepa nativa, se encuentra en el cepario de la Universidad EAFIT, y fue conservado en discos de papel filtro de 0,5 cm de diámetro con 5 mL de agua destilada estéril y almacenados a 4 °C (García-García et al., 2014).

Para la activación de la cepa, un disco de papel filtro con micelio es incubado en caja Petri con PDA durante 6 días a 30 °C. Posteriormente, 5 discos de agar son inoculados en 50 mL de medio con la siguiente composición (g/L): glucosa 35; peptona 5; extracto de levadura 2,5; KH₂PO₄H₂O 1; MgSO₄7H₂O 0,5; vitamina B1 0,05 (Porrás-Arboleda et al., 2009), incubados 72 h a 150 rpm y 37 °C. Posterior, se inocularon los medios a evaluar. La composición del medio de cultivo para la producción de pectinasas en (g/L) fue: extracto de levadura, 1,0; glucosa, 10,0; K₂HPO₄, 0,4; KH₂PO₄, 0,2; MgSO₄·7H₂O, 0,4; Pectina cítrica 2 (Uzuner y Cekmecelioglu, 2015).

Finalmente, con el objetivo de evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de pectinasas se reemplazó la cantidad de pectina cítrica y glucosa referenciada en el medio anterior, por cáscaras de naranja en una concentración de 12 g/L, lo cual equivale a una concentración de 2 g/L de pectina y 10 g/L de glucosa aproximadamente.

Los cultivos fueron incubaron a 30 °C y 150 rpm (Incubadora de agitación C25 New Brunswick Scientific;) durante 12 días, realizando sacrificio de matraz cada 4 días.

2.2 Concentración de biomasa

La biomasa de *H. coffeata* se determinó por método gravimétrico de peso seco, filtrando al vacío todo el cultivo celular a través de papel filtro (Boedco), previamente pesado. La biomasa fue secada a 40 °C por 24 h.

2.3 Determinación de azúcares

El azúcar remanente en el medio se determinó bajo el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS), (Miller, 1959) empleando glucosa como estándar.

2.4 Actividad pectinasa

2.4.1 Actividad endo-pectinasa

Para la determinación de la actividad endo-pectinasa, 7,5 ml de solución de ácido poli galacturónico (alfa Aesar) al 1% en buffer acetato (pH 4,5, 0,1 M) fueron mezclados con 2,5 mL de muestra de cultivo libre de células e incubados a 45 °C por 10 min. La reacción fue detenida, poniendo las muestras en hielo por 7 minutos. Cuando la mezcla alcanzó la temperatura ambiente se midió la viscosidad en un viscosímetro de Ostwald.

La actividad endo-pectinasa fue definida como reducción en el porcentaje de viscosidad respecto al sustrato (Sandri et al., 2011).

2.4.2 Actividad exo pectinasa

Para la determinación de la actividad exo-pectinolítica se utilizó como sustrato una solución al 1 % de ácido poli galacturónico, pectina cítrica (Alfa Aesar) en buffer acetato (pH 4,5, 0,1 M). Se tomaron 400 μ L de sustrato con 100 μ L de extracto y se incubaron a 45 °C por 20 minutos. La determinación de azúcares liberados se determinó por el método de DNS (centrifugando a 14000 rpm por 5 min posterior a la reacción) usando ácido galacturónico como estándar (Sandri et al., 2011).

Una unidad exo-pectinasa fue definida como la cantidad de extracto enzimático necesario para hidrolizar la pectina y formar 1 μ mol de ácido galacturónico por minuto bajo las condiciones de reacción especificadas (Debing et al., 2006).

2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico para la producción de pectinasas usando cáscaras de naranja como fuente alternativa (cáscaras de naranja a una concentración de 12g/L, trituradas en el medio) se realizó sobre el extracto obtenido al día 8 de cultivo y se analizó mediante una tabla ANOVA, con un 95 % de confianza, usando el software STATGRAPHICS CENTURION.

2.6 Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática

Se tomaron los extractos libres de células correspondientes al día 8 de cultivo y se varió el buffer usado para la reacción que abarcara un pH entre 3 y 7 con espaciamiento de 1, y una temperatura entre 25 y 65 °C con espaciamiento de 10 °C, con el objetivo de generar una matriz experimental de dos factores, cada uno en 5 niveles. El análisis estadístico se realizó mediante diagrama de Pareto y superficie de respuesta, usando el software STATGRAPHICS CENTURION.

2.7 Parámetros enzimáticos

Dadas las condiciones de pH y temperatura que favorecieron la reacción enzimática se determinó mediante el modelo de Michaelis-Menten, la velocidad máxima de reacción y constante de afinidad por el sustrato a 4 diferentes concentraciones de sustrato: 0,5, 0,75 1,1,5,2 g /L, mediante un análisis de regresión no lineal determinado en el software POLYMATH versión 6.1

2.8 Inmovilización enzimática

Para la inmovilización enzimática, el extracto obtenido a los 8 días de cultivo fue liofilizado. 1,8 gramos de extracto liofilizado fueron re suspendidos en 30 mL de buffer acetato (pH 5, 0,1 M). La matriz fue preparada con 0,4 g de alginato de sodio en 5 mL de extracto, adicionados por goteo a una solución al 1% de cloruro de calcio para obtener las esferas de agar con alginato (Ramírez et al., 2016).

La actividad enzimática del extracto inmovilizado se determinó, disponiendo 0,025 g de esferas (equivalente a aproximadamente 100 µL de extracto) con 400 µL de solución sustrato (ácido poli galacturónico, pectina cítrica (Alfa Aesar) al 1 % disuelto en buffer

acetato (pH 5, 0,1 M) en tubos de 1,5 mL agitados 10 segundos y puestos a 45 °C en baño maría por 20 min. Posterior a la reacción fueron tomados 100 µL del sobrenadante para medir mediante el método del DNS los azúcares, usando ácido galacturónico como estándar. (Sandri et al., 2011).

Una unidad de exo-pectinasa fue definida como la cantidad de extracto enzimático necesario para hidrolizar la pectina y formar 1 µmol de ácido galacturónico por minuto bajo las condiciones de reacción especificadas (Debing et al., 2006).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación de la fuente de carbono

En la Figura 2 se presenta la cinética de crecimiento de *Humphreya coffeata* crecida sobre dos fuentes de carbono: pectina/glucosa y cáscaras de naranja.

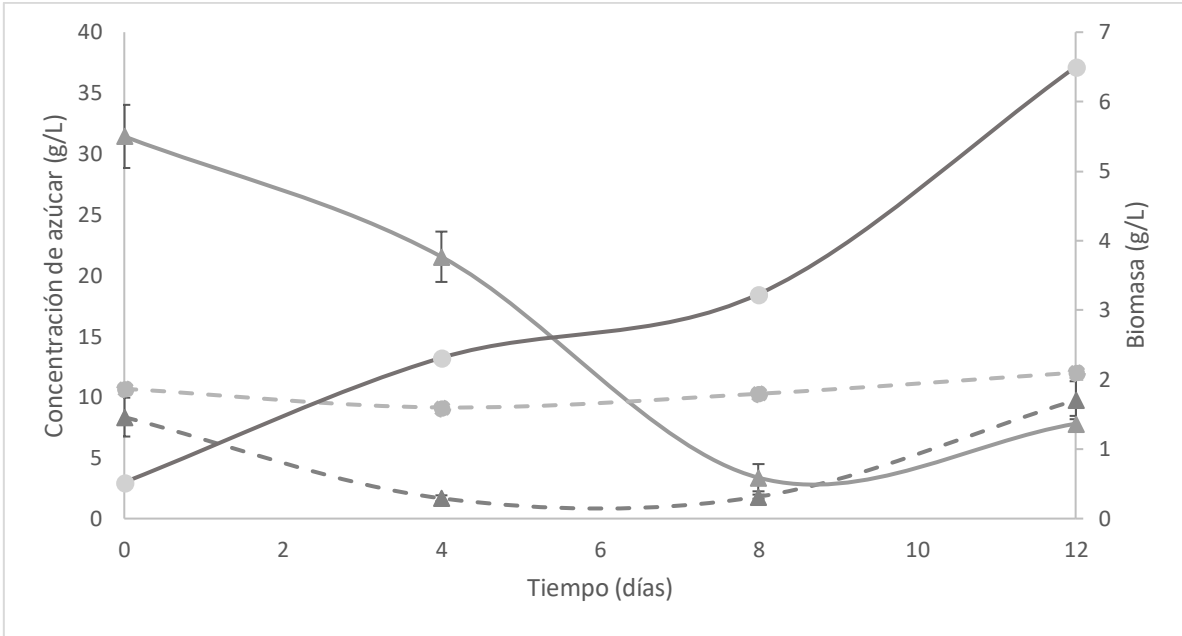


Figura 2 Cinética de crecimiento (circulo relleno) y consumo de sustrato (triángulo relleno) de *Humphreya coffeata* crecida usando glucosa/pectina como fuente de carbono (línea continua) y cáscaras de naranja (línea discontinua) incubados a 30 °C y 150 rpm.

El crecimiento de la biomasa de *Humphreya coffeata* presentó una producción 40 % superior en el medio con Pectina/glucosa con una concentración de biomasa de 6,5 g/L al día 8 de cultivo comparado con el medio con cáscara de naranja que presentó una concentración de 2 g/L.

Sin embargo, el cultivo llevado a cabo con cáscara de naranja fue un cultivo semisólido que no permite evidenciar bajo la metodología de cuantificación utilizada que porcentaje de esta materia corresponde a biomasa de *Humphreya coffeata*, lo cual genera que el valor para la variable biomasa permanezca casi constante para este medio. En trabajos similares Economou et al., (2010), evaluaron el crecimiento celular de *Mortierella isabelina* en fermentación semisólida, de manera indirecta, para lo cual midieron la concentración de glucosamina como constituyente del hongo, dado que exponen que metodologías como la propuesta en este trabajo podrían no ser suficientemente adecuadas.

Los resultados encontrados pueden deberse a que la naranja, que posee una concentración de aproximadamente 10 g/L de azúcares reductores y 2,03 g/L de pectina no provee una fuente considerable de carbono para crecimiento celular de *Humphreya coffeata*. Resultados similares fueron obtenidos por Reginatto et al., (2017), quienes determinaron que la composición del medio de cultivo utilizado para producir pectinasas a partir de *Aspergillus niger*, se veía influenciado por la concentración de glucosa más no por la adición de pectina, así para un medio sin glucosa se obtuvo menor concentración de biomasa que para un medio con 10 g/L de glucosa, por lo que sugieren que el efecto del crecimiento celular se encuentra asociado a la glucosa.

Para el caso presentado en este trabajo el crecimiento celular podría estar también asociado a la glucosa o a la sinergia de ambos compuestos (pectina/glucosa) más que a la presencia de pectina únicamente que para ambos medios fue similar, o que la concentración adicionada de cáscaras de naranja no supe la cantidad de carbono necesaria para el microorganismo. Este resultado es contrario al encontrado por Osorio

et al., (2008) , quienes evaluaron el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y la producción de renina a partir de *Mucor miehei* en cultivos sumergido, para lo cual encontraron que, al usar cantidades estequiométricas de suero de leche, harina de maíz, bagazo de caña y cáscara de papa se presentaba un crecimiento similar respecto al medio estándar que usaba glucosa.

Con respecto al consumo de azúcares puede observarse que este es menor en un 10% para el medio con cáscaras de naranja respecto al medio estándar que contiene glucosa/pectina, teniendo en cuenta que la presencia de azúcares libres medida como azúcares reductores es menor desde el tiempo 0, con un valor de 31,42 g/L para el medio glucosa/pectina y un valor de 8,43 g/L para el medido con cáscaras de naranja.

Para ambos cultivos, se observa un aumento en la presencia de azúcares reductores en el medio después del día 8, lo que coincide con las mayores actividades enzimáticas (Figura 1), lo cual sugiere que azúcares simples se están liberando de los polisacáridos complejos como la pectina por acción de las enzimas. Este comportamiento fue observado por Osorio et al., (2008) en cultivos de *Mucor miehei* usando suero de leche, harina de maíz, bagazo de caña y cáscaras de papa, donde se presentaron comportamientos oscilatorios para el consumo de azúcar.

La actividad enzimática, medida como actividad endo-pectinasa y exo-pectinasa para el medio glucosa-pectina y el sustituido con cáscaras de naranja, se presentan en la Figura 2.

La máxima actividad enzimática fue encontrada a partir del día 8, con valores para exo-pectinasa de 1,10 U/mL para el medio de glucosa/pectina y 0,8 U/mL para el medio sustituido con cáscaras de naranja y valores para endo-pectinasa de 4,09 % de reducción de viscosidad respecto al sustrato para el medio de glucosa/pectina y 5,21 % de reducción de viscosidad para el medio sustituido con cáscaras de naranja respecto al sustrato, determinando que no existen diferencias significativas para ninguna de las variables evaluadas al día 8 ($p > 0,05$), por lo tanto, la fuente agro industrial no representa una desventaja en la producción de enzimas, aunque la producción de biomasa sea un poco

menor. Este resultado contrasta con el reportado por Reginatto et al., (2017), para cepas de *Aspergillus niger*, dado que la adición de pectina al medio de cultivo pobre en azúcares reductores favoreció en un 40% la producción de pectinasas.

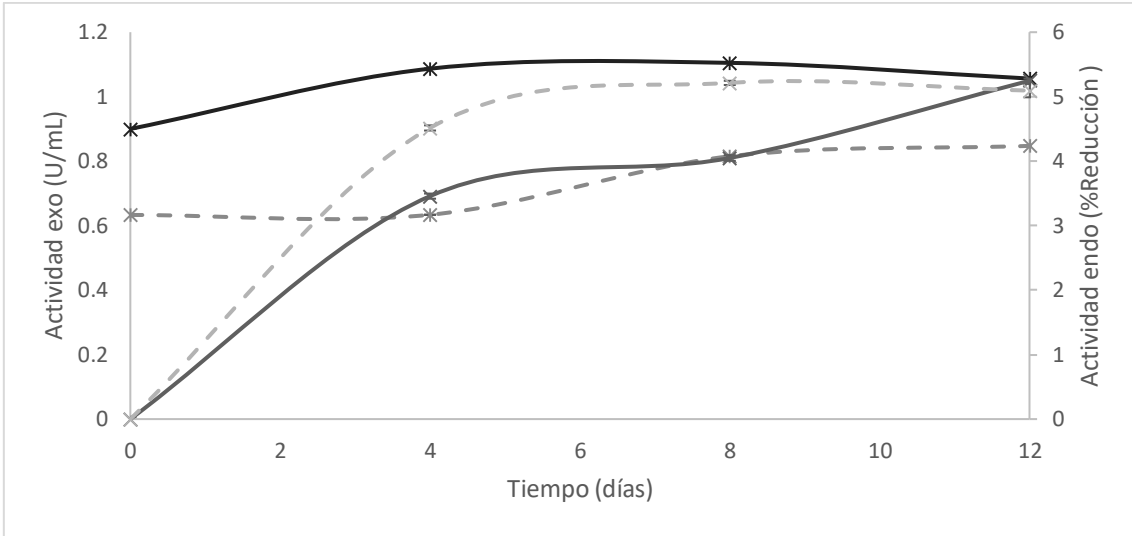


Figura 3 Actividad pectinasa de extractos de *Humphreya coffeata* usando glucosa/pectina como fuente de carbono (línea continua) y cáscaras de naranja (línea discontinua) incubados a 30°C y 150 rpm. Actividad endo-pectinasa (equis), actividad exo-pectinasa (asterisco).

Por su parte Arellano et al., (2015), quienes usaron cepas de *Bacillus spp.* para producir pectinasas y evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre las mismas, determinaron que el uso de cáscaras de toronjo o naranja no presentaba diferencias significativas en la producción de pectinasas producidas en cultivos en sumergido.

Schneider et al., (2018) , quienes realizaron la evaluación de la producción de enzimas hidrolíticas en cepas de *Penicillium echinulatum* en medios de cultivo sumergidos sustituidos con bagazo de caña, glucosa, glicerol y celulosa, para los cuales evaluaron sobre 19 sustratos actividades de celulasas, hemicelulasas, amilasas, estearasas y pectinasas, encontraron que para pectinasas no habían diferencias significativas sobre la producción de las mismas para los sustratos evaluados, aunque fue mayor para el medio sustituido con glicerol.

Los resultados encontrados podrían sugerir que la fuente de carbono no es el factor limitante para la producción de pectinasas, lo cual concuerda con lo encontrado por Uzuner y Cekmecelioglu (2015), quienes optimizaron las condiciones de producción de pectinasas a partir de *Bacillus subtilis*, mediante un diseño Placket and Burman determinando que el extracto de levadura tenía afectación sobre la producción de pectinasas y no la pectina como fuente de carbono utilizada.

3.2 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de pectinasas producidas a partir de *Humphreya coffeata*.

La Figura 3 presenta la actividad exo-pectinasa (A) y la actividad endo- pectinasa (B) de extractos de *Humphreya coffeata*, usando ácido poli galacturónico (Alfa Aeser) al 1% como sustrato evaluado a diferentes pH y temperaturas.

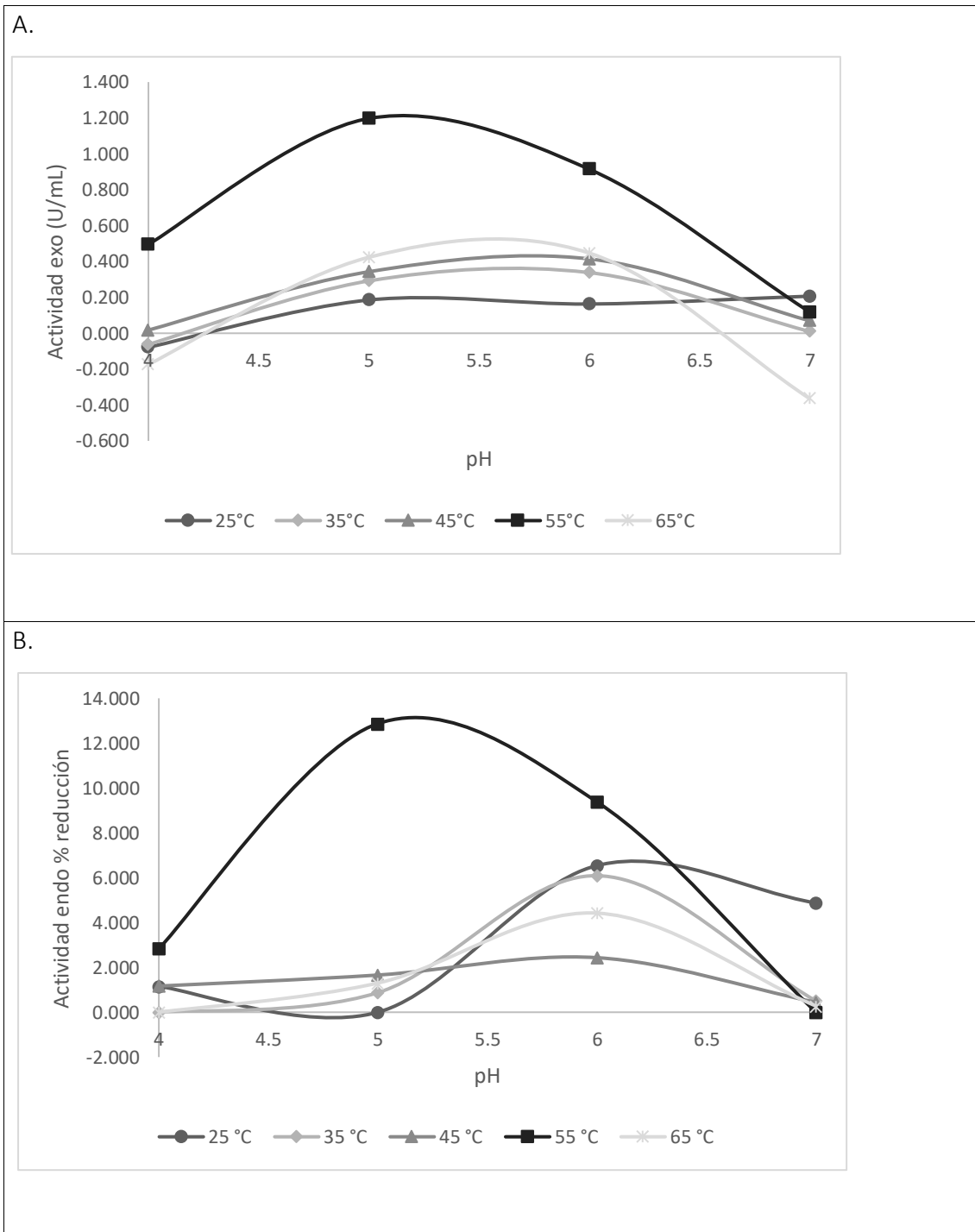


Figura 3 Actividad exo-pectinasa (A) y Actividad endo.pectinasa (B) usando ácido poli galacturónico 1 % p/V como sustrato a partir de *Humphreya coffeata* a diferentes pH y diferentes temperaturas 25 °C (circulo relleno), 35 °C (rombo relleno), 45 °C (triángulo relleno), 55 °C (cuadrado relleno), 65 °C (asterisco).

De la figura 3 se puede observar que las mayores actividades exo-pectinasa y endo-pectinasa se presentaron para la temperatura de 55 °C en un rango de pH entre 4 y 6.

Las mayores actividades con valores de 1,19 U/mL y 12,8 % de reducción de viscosidad para exo-pectinasa y endo-pectinasa respectivamente fueron encontradas a un pH de 5.

Arellano et al., (2014) reportaron condiciones favorables de pH 6,5 y temperatura de 35 °C para la actividad enzimática de pectinasas obtenidas de cepas de *Bacillus spp* y aunque los valores no son iguales para alcanzar la máxima actividad, comportamientos similares fueron hallados, donde a partir del pH y temperatura favorable se observa una disminución en la actividad enzimática.

De igual manera, Yu y Xu (2018) reportaron condiciones de temperatura de 37 °C y pH de 5 para alcanzar actividades enzimáticas pectinolíticas de 110 U/mL producidas por *Bacillus sp. ZJ1407*.

Estos resultados, permiten inferir que las enzimas producidas tienen carácter ácido lo que les confiere oportunidad de operación para tratamientos a nivel industrial de preferencia en clarificación de jugos (Arellano et al.,2014).

Para las temperaturas de 35, 45 y 65 °C no se presentan diferencias significativas en los rangos de pH evaluados excepto para pH 6 donde se evidencias mayores diferencias con valores de actividad de 0,33 U/mL, 0,41 U/mL y 0,44 U/mL, para las temperaturas de 35, 45 y 65 °C respectivamente. Por su parte a la temperatura de 25 °C no se evidencia actividad enzimática a ninguno de los pHs evaluados.

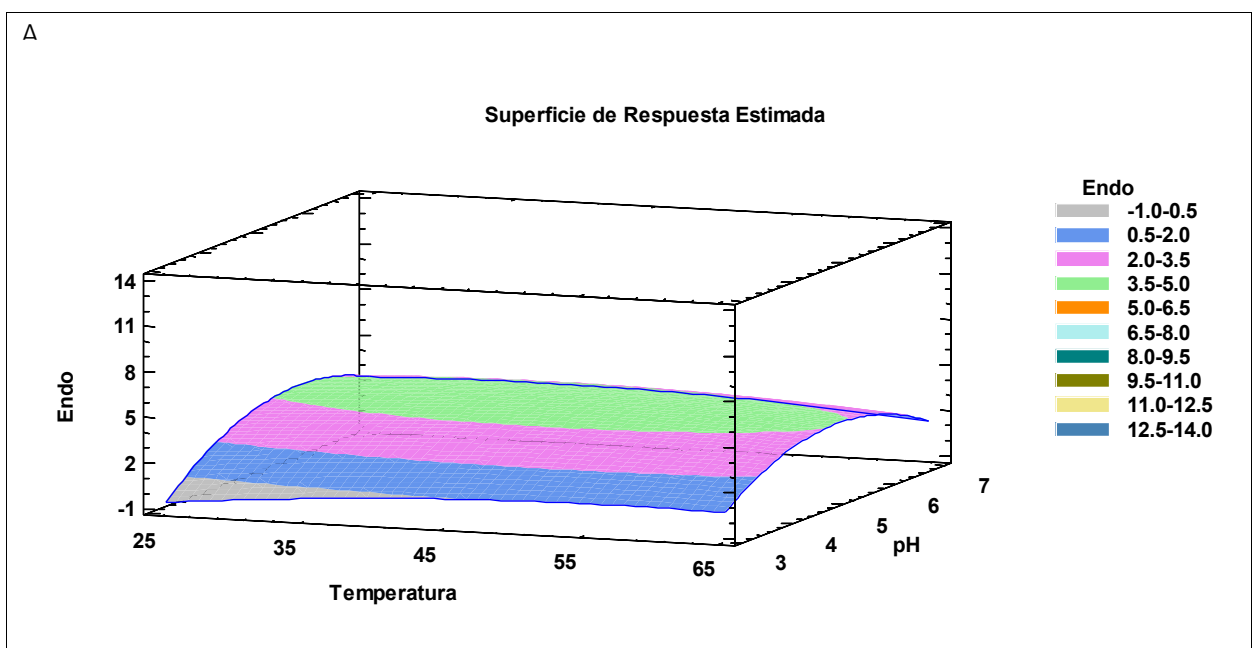
Ahora bien, la mayor actividad endo-pectinasa, se presenta para una temperatura de reacción de 55 °C y un pH de 5 con un valor de 12,87 % de reducción en la viscosidad, resultado menor al encontrado por Sandri et al., (2011), quienes evaluaron la clarificación de jugos usando pectinasas de origen fúngico, alcanzando reducciones hasta del 98% a una temperatura de reacción de 40 °C.

Cabe anotar que la temperatura determinada como favorable es mayor respecto a otras evaluadas en la literatura, lo cual sugiere estabilidad térmica de la enzima a temperaturas relativamente altas comparadas con las utilizadas comúnmente. (Sandri et al.,2011;Yu y Xu 2018;Arellano et al., 2014).

El análisis estadístico por diagrama de Pareto permitió identificar que el pH tiene un efecto significativo sobre la actividad endo-pectinasa y exo-pectinasa, por lo cual sería este factor el que domina la actividad y podría explicar los cambios drásticos en la actividad enzimática a las diferentes temperaturas, esto está directamente relacionado con lo expuesto por Arsalan y Younus (2018), quienes indican que cada enzima posee un pH y una temperatura favorable de reacción, por encima de las cuales se pierde actividad, principalmente debido al pH por desnaturalización de la proteína.

Por su parte, Sharma y Rishishwar (2015), evaluaron el efecto del pH en la reacción de pectinasas producidas por *Aspergillus niger* cultivado en estado sólido sobre residuos agroindustriales como bagazo de caña, cáscaras de frutas, fibra de piña entre otros, determinando que el pH favorable de reacción bajo dichas condiciones era 4,5.

El gráfico de superficie de respuesta presentado en la Figura 4 para la actividad endo-pectinasa (A) y exo-pectinasa (B) permitió determinar que el pH y temperatura intermedio, favorable para ambas reacciones fue de 55 °C y un pH de 5,5, punto para el cual se realizó una validación encontrándose un valor de actividad exo-pectinasa de $2,04 \pm 0,084$ U/mL y un valor de $10\% \pm 1,09$ reducción de viscosidad respecto al sustrato.



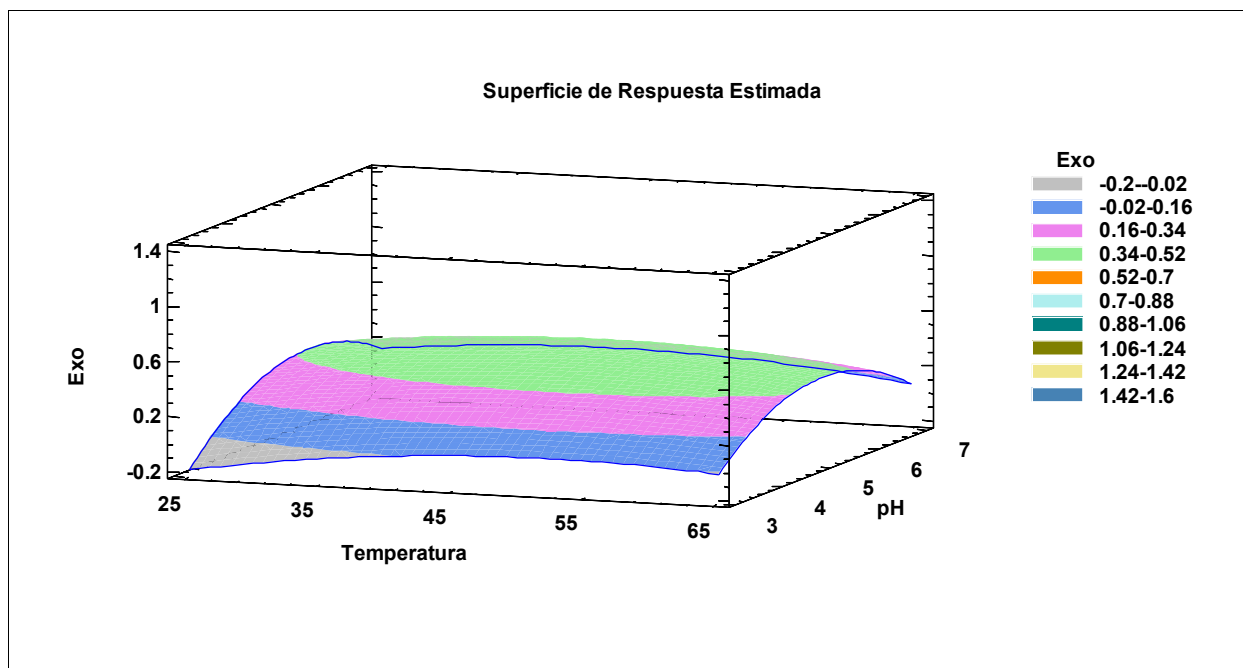


Figura 4. Gráfico de superficie de respuesta para actividad (A) endo-pectinasa y (B) exo-pectinasa a diferentes temperaturas y pH de reacción

Estos resultados se encuentran dentro de rangos ya explorados en la literatura para enzimas de este tipo como lo presenta Sandri et al., (2011) quienes evaluaron la clarificación de jugos a partir de pectinasas de origen fúngico respecto a pectinasas de origen comercial, encontrando que temperaturas entre 40°C y 50 °C permitían obtener mayores valores de reducción de viscosidad, a su vez, evidenciaron que por encima de 50°C se empieza a observar una tendencia descendente, con porcentajes máximos de reducción de viscosidad de 90%.

3.3 Parámetros cinéticos para exo-pectinasas producidas a partir de *Humphreya coffeata*

Para la determinación de los parámetros cinéticos de pectinasas producidas a partir de *Humphreya Coffeata* se realizó la medida de la actividad asociada a la exo-pectinasa, dado que corresponde a una medida directa de los enlaces hidrolizados; a condiciones intermedias entre los dos puntos favorables de cada enzima, dando como resultado un pH de 5,5 y temperatura de 55 °C.

En la figura 5 se presenta la cinética enzimática para extractos con pectinasas obtenidas a partir de *Humphreya coffeata* obtenidos a pH 5,5 Y 55 °C.

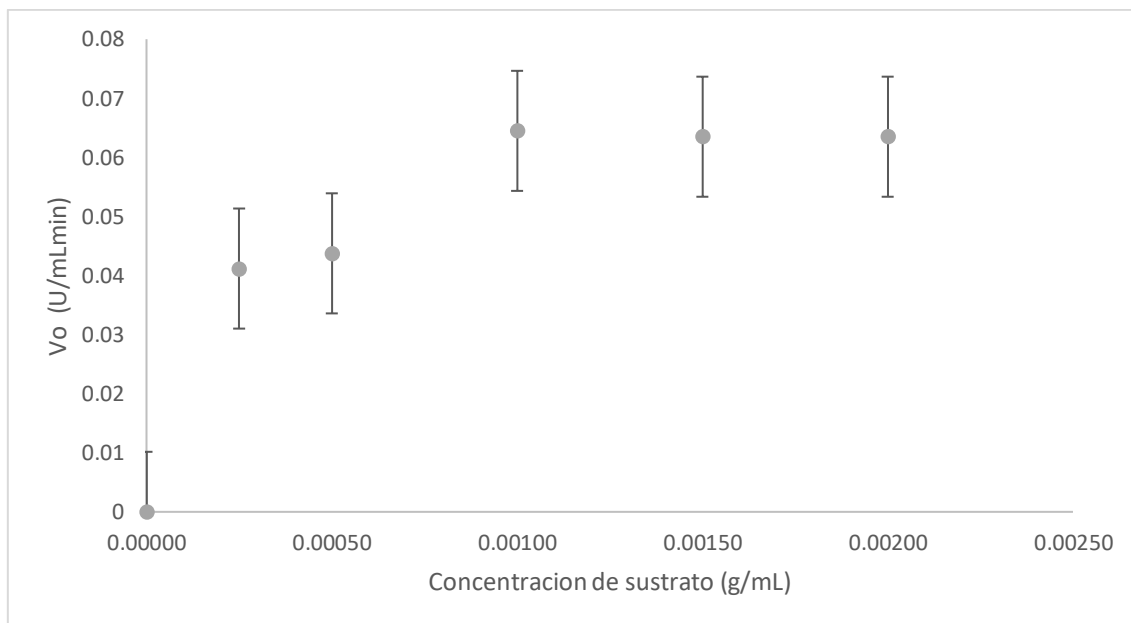


Figura 5 Cinética enzimática para pectinasas producidas a partir de *Humphreya coffeata* usando como sustrato ácido poligalacturónico Aeser al 1 %

Los parámetros cinéticos fueron determinados mediante el modelo Michaelis-Menten para el cual por un modelo no lineal determinado con ayuda del software Polymath se obtuvo un valor de V_{max} de $0,07 \text{ U/mL} \cdot \text{min}$ y K_m de $0,022 \text{ mg/mL}$ con un coeficiente de ajuste $R^2 0,97$, lo cual indica que existe buen ajuste entre los datos experimentales y el modelo determinado para obtener dichas variables.

Los valores encontrados fueron mucho menores a los obtenidos por Dai et al., (2018) con una K_m de $6,73 \text{ mg/mL}$ y V_{max} de $0,311 \text{ mg/mL min}$, bajo el mismo modelo de Michaelis-Menten para enzimas pectinolíticas comerciales provenientes de Aladdin (Shanghai, China).

Por su parte Dalagnol et al., (2017) quienes determinaron el efecto del uso de ultrasonido como pretratamiento para mejorar la actividad enzimática de una preparación comercial (Zimopec PX5) que contenía pectinasas, celulasas y xilanasas, encontraron una V_{max} de 1513 mg/mL min y una K_m de $1,6 \text{ mg/mL}$ para la actividad pectinolítica, valores significativamente mayores a los obtenidos en este trabajo.

Las diferencias en los parámetros enzimáticos pueden asociarse al origen de las enzimas utilizadas, dado que para preparaciones comerciales se tienen generalmente actividades

mayores que para extractos crudos como lo indicaron Pereira et al., (2017) quienes utilizaron jugo de desechos de cebolla para producir pectinasas a partir de *Pleurotus sajor-caju* en estado sólido, encontraron una actividad de 4,82 U/mL con una constante afinidad Km de 243,83 mM y una Vmax de 6,99 mM/min.

3.7 Inmovilización enzimática de pectinasas producidas a partir de *Humphreya coffeata*.

La inmovilización del extracto liofilizado del cultivo de *Humphreya coffeata*, se realizó sobre una matriz de alginato.

El extracto liofilizado, consistió en una solución concentrada del extracto crudo con una concentración aproximada de 1,116 +/- 0,03 mg/L de proteína.

En la Tabla 1. se presentan los resultados de actividad enzimática del extracto de *Humphreya coffeata*: extracto crudo, extracto liofilizado y extracto liofilizado inmovilizado en perlas de alginato.

Tabla 1 Actividad pectinolítica para *Humphreya coffeata* liofilizada e inmovilizada

	Proteína (mg/L)	Actividad U/ml
Extracto crudo	0,585 +/- 0,007	0,879 +/- 0,023
Liofilizado	1,116 +/- 0,030	1,978 +/- 0,036
Inmovilizado	1,116 +/- 0,030	0,526 +/- 0,015

La mayor actividad enzimática se presenta en el extracto liofilizado (solución concentrada de enzima) con una actividad 55 % superior que el extracto crudo y un 81% respecto a la enzima inmovilizada, lo cual es coherente con una mayor concentración de proteína total para el liofilizado respecto al extracto crudo.

Por su parte, el proceso de liofilización permitió concentrar el extracto a casi el doble en concentración proteica, lo cual se vio reflejado en duplicar la actividad pectinolítica . Sin embargo, la actividad enzimática se redujo con la técnica de inmovilización, debido posiblemente al efecto asociado a fenómenos de disolución en la fabricación de las perlas. Este comportamiento es similar al encontrado por Ramírez-Tapias et al., (2016),

donde se evaluó la estabilización por punto covalente de poligalacturonasa usada en clarificación de jugos, encontrando que posterior al proceso de inmovilización la actividad enzimática se veía reducida, principalmente por la cinética de reacción, dado que el máximo rendimiento se logró en 45 minutos para la enzima libre y 5 horas para la enzima inmovilizada.

Estos efectos adversos asociados a la reducción en la actividad enzimática en matrices de inmovilización se encuentran asociados a impedimentos estéricos y fenómenos de difusión, que han sido atacados mediante otras estrategias como la propuesta por Dai et al.,(2018), quienes evaluaron la inmovilización de pectinasas sobre esferas compuestas de alginato de sodio/ oxido de grafeno, encontrando similitud en el valor de la máxima actividad enzimática de la enzima libre e inmovilizada, asociado a la composición de la matriz pero al evaluar parámetros de reacción como pH y temperatura encontraron que la enzima inmovilizada representaba una ventaja frente a un rango de mayor amplitud en estas variables.

CONCLUSIONES

Usar sustituyentes de la fuente de carbono como cáscaras de naranja en la fermentación de *Humphreya coffeata* no representa desventaja en cuanto a la producción de pectinasas, dado que se encontraron valores similares de actividad exo-pectinasa y endo-pectinasa respecto al uso de glucosa, lo cual impacta directamente una reducción en el costo del medio para su producción.

Se determinó que las pectinasas producidas en este trabajo son de tipo ácido, lo cual permite que sean implementadas en procesos industriales de clarificación de jugos, encontrando una temperatura favorable de reacción de 55 °C y un pH de 5,5. A dichas condiciones se obtuvo una velocidad enzimática máxima de 0,07 U/mL*min y una constante de afinidad por el sustrato de 0,022 mg/mL.

El proceso de inmovilización arrojó resultados positivos para la enzima inmovilizada sobre matriz de alginato, dado que a pesar de que se ve disminuida la actividad

enzimática, aún se conserva actividad, por lo cual se sugiere determinar condiciones favorables de este proceso con el objetivo de aumentar eficiencia enzimática del extracto inmovilizado.

BIBLIOGRAFÍA

- Anuradha, K., Padma, P. N., Venkateshwar, S., & Reddy, G. (2014). Effect of physical factors on pellet morphology of *Aspergillus awamori* MTCC 9166 and polygalacturonase production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 271-274.
- Arellano, J., Ilich, S., Salazar, M., Rodríguez, I., Torres, P., & Alarcón, W. (2015). Producción de pectinasas por *Bacillus spp.* a partir de cáscaras de naranja y de toronja como fuente de carbono. *Revista Rebiol*, 35(1), 62-69.
- Arellano, J. C., Zerpa, S. A. I., Castillo, M. L. S., Haro, I. M. R., Gutiérrez, W. N. A., & Álvarez, F. O. G. (2014). Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de pectinasas producidas por *Bacillus spp.*. *Revista Rebiol*, 34(1), 33-41.
- Archna, S., Priyank, V., Nath, Y. A., & Kumar, S. A. (2015). Bioprospecting for extracellular hydrolytic enzymes from culturable thermotolerant bacteria isolated from Manikaran thermal springs. *Research Journal of Biotechnology*, 10(4), 33-42.
- Arsalan, A., & Younus, H. (2018). Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. *International journal of biological macromolecules*.
- Dai, X. Y., Kong, L. M., Wang, X. L., Zhu, Q., Chen, K., & Zhou, T. (2018). Preparation, characterization and catalytic behavior of pectinase covalently immobilized onto sodium alginate/graphene oxide composite beads. *Food chemistry*, 253, 185.
- Dalagnol, L. M., Silveira, V. C., da Silva, H. B., Manfroi, V., & Rodrigues, R. C. (2017). Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. *Process Biochemistry*, 61, 80-87.

- Economou, C. N., Makri, A., Aggelis, G., Pavlou, S., & Vayenas, D. V. (2010). Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresource technology*,101(4), 1385-1388.
- Garcia-Garcia, M.,Rocha-zavaleta, L., Valdez-cruz, N. A., & Trujillo-roldán, M. A.. Conservation of the mycelia of the medicinal mushroom *Humphreya coffeata* (Berk .) Stey . in sterile distilled water, *MethodsX*, (2014) 19–22.
- Janani, L. K., Kumar, G., & Rao, K. B. (2011). Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus sp.* MFW7 using Cassava Waste. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*,1(2), 329-336.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource technology*,77(3), 215-227.
- Li, R., Rimmer, R., Buchwaldt, L., Sharpe, A. G., Seguin-Swartz, G., & Hegedus, D. D. (2004). Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo-and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*,2(3),1-11
- Osorio Correa, A. M., Gómez Vanegas, N. A., & Sánchez Jaramillo, C. Y. (2008). Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del moho *Mucor miehei*.
- Patil, S. R., & Dayanand, A. (2006). Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresource technology*,97(16), 2054-2058.
- Pereira, G. S., Cipriani, M., Wisbeck, E., Souza, O., Strapazzon, J. O., & Gern, R. M. (2017). Onion juice waste for production of *Pleurotus sajor-caju* and pectinases. *Food and Bioproducts Processing*,106, 11-18.

- Poondla, V., Bandikari, R., Subramanyam, R., & Obulam, V. S. R. (2015). Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 70-76.
- Porras-Arboleda, S.M., Valdez-Cruz, N.A., Rojano, B., Aguilar, C., Rocha-Zavaleta, L., & Trujillo-roldán, M. A. (2009). Mycelial Submerged Culture of New Medicinal Mushroom, *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. (Aphyllphoromycetideae) for the Production of Valuable Bioactive Metabolites with Cytotoxicity, Genotoxicity, and Antioxidant Activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 11(4), 335–350.
- Reginatto, C., Rossi, C., Miglioranza, B. G., dos Santos, M., Meneghel, L., da Silveira, M. M., & Malvessi, E. (2017). Pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth. *Process Biochemistry*, 58, 1-8.
- Rishishwar, P. Effect of pH on commercially applicable Pectinase enzyme derived from Strain improved *Aspergillus Niger* using Agro-industrial waste by solid state fermentation process, *Research journal of science & IT management*, 11-14.
- Sandri, I. G., Fontana, R. C., Barfknecht, D. M., & Moura, M. (2011). Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT- Food Science and Technology*, 44, 2217–2222.
- Schneider, W. D. H., Gonçalves, T. A., Uchima, C. A., dos Reis, L., Fontana, R. C., Squina, F. M., ... & Camassola, M. (2018). Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium echinulatum* strains and its hydrolysis potential for lignocelulosic biomass. *Process Biochemistry*, 66, 162-170.
- Tapias, Y. A. R., Rivero, C. W., Gallego, F. L., Guisán, J. M., & Trelles, J. A. (2016). Stabilization by multipoint covalent attachment of a biocatalyst with polygalacturonase activity used for juice clarification. *Food chemistry*, 208, 252-257.
- Uzuner, S., & Cekmecelioglu, D. (2015). Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* growing on hazelnut shell hydrolyzate. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 113, 62–67.

Yu, P., & Xu, C. (2018). Production optimization, purification and characterization of a heat-tolerant acidic pectinase from *Bacillus sp.* ZJ1407. *International journal of biological macromolecules*, 108, 972-980.