



MICOL. NEOTROP. APL. 4 : 49-62, 1991.

PRODUCCION DE PECTINASAS DE *ASPERGILLUS NIGER* POR FERMENTACION SOLIDA SOBRE SOPORTE

M. R. TREJO-HERNÁNDEZ¹, E. ORIOL², A. LÓPEZ-CANALES³, S. ROUSSOS²,
G. VINIEGRA-GONZÁLEZ¹ Y M. RAIMBAULT²

- ¹ Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I), Departamento de Biotecnología, Iztapalapa, Apartado Postal 55-535, 09340 México, D.F., México.
- ² Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM), Centre de Montpellier, U. F. Biotechnologie PMC, 911 Avenue Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, Francia.
- ³ UNAM, Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 510-3, 62270 Cuernavaca, México.

PECTIC ENZYMES PRODUCTION BY *ASPERGILLUS NIGER* IN SOLID STATE FERMENTATION

Aceptado para publicación: octubre 15, 1991

SUMMARY

Fungal pectic enzymes were produced by solid state fermentation using *Aspergillus niger* and sugar cane bagasse as culture support. The solid support was humidified to 70% with a solution containing salts, sucrose as carbon source and pectin as inducer. Best yield was obtained with *Aspergillus niger* after 45 hours of culture. Endo-activity (PEG) was observed in the extracted fermentation juice obtained by pressing of the solid support. The fermentation time was reduced from 72 to 45 hours and the concentration of pectinases in juice was 10 times more than in submerged cultivation.

Key words: Pectinases, *Aspergillus niger*, solid state fermentation.

14 SEP. 1994

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 40.203-cc.1

Cote : B

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo de tres cepas pectinolíticas de hongos filamentosos en medio líquido, de las cuales se seleccionó *Aspergillus niger* por su alta producción de pectinasas. Esta cepa fue cultivada sobre un soporte sólido (bagacillo de caña de azúcar), impregnado de una solución nutritiva que contiene un inductor (pectina) y una fuente de carbono (sacarosa). Se optimizó la relación inductor/fuente de carbono y se estudiaron cinéticas de producción de pectinasas. Se demostró que la síntesis de pectinasas por *A. niger* está parcialmente desligada del crecimiento y alcanza un máximo a las 45 horas de incubación. Una actividad endo-galacturonasa (PEG) fue observada en el jugo de fermentación obtenido por prensado del soporte sólido. El tiempo de fermentación se redujo de 72 a 45 horas y la concentración de enzimas pectinolíticas en el jugo de fermentación fue 10 veces más elevada que en el cultivo líquido.

Palabras clave: Pectinasas, *Aspergillus niger*, fermentación sólida.

INTRODUCCION

Las enzimas pécticas de hongos filamentosos son un conjunto de enzimas que hidrolizan la pectina. Estas presentan una extensa aplicación en la industria alimentaria principalmente en la obtención y clarificación de jugos de frutas y del vino (Fogarty y Ward, 1974; Neubeck, 1975). La importancia del mercado potencial de estas enzimas ha provocado el desarrollo de sistemas de producción a nivel industrial. El sistema convencional para la producción de pectinasas es el cultivo sumergido, utilizando medios sintéticos (Janda, 1983; Rombouts y Pilnik, 1980) y medios a base de substratos naturales con una alta concentración de pectina, tales como: pulpa de remolacha (Ilczuk, 1976), cáscara de limón (Rodríguez *et al.*, 1986), pulpa de henequén (Huitrón *et al.*, 1984), desechos de manzana (Hours *et al.*, 1988).

Recientemente se han desarrollado estudios sobre la producción de enzimas pécticas, utilizando la fermentación en medio sólido, sobre diferentes substratos: bagazo de caña de azúcar (Carrizales, 1983); salvado de trigo (Ghildyal *et al.*, 1981; Qadeer *et al.*, 1985; Budiattman y Lonsane, 1987). Sin embargo, pocos estudios han sido efectuados sobre la influencia de la composición del medio, en cultivo sólido sobre soporte. La inducción de estas enzimas en cultivo sumergido ha sido estudiada utilizando diferentes fuentes de carbono (Tuttobello y Mill, 1961). La composición del medio de cultivo es

un factor importante ya que influye sobre la diversidad y la cantidad de las enzimas pécticas. El estudio de la producción de enzimas en medio sólido con medios de cultivo sintéticos, impregnados sobre un soporte inerte permite estudiar el comportamiento de los hongos filamentosos en relación a la composición del medio de cultivo, la influencia de la actividad del agua, la liberación de calor (Oriol, 1987), así como la influencia de la transferencia de gases. Por otra parte, la recuperación de metabolitos en estas condiciones se realiza por prensado lo que permite obtener un producto concentrado (Roussos, 1985). Al contrario, en cultivos sólidos en los cuales el soporte es también el substrato, es difícil evaluar la influencia de un sólo factor sobre el comportamiento de un microorganismo ya que en gran parte, estos substratos son muy complejos y dada su composición se dificulta la determinación de los diferentes parámetros importantes en cultivo sólido.

Considerando la fermentación sólida sobre soporte como un nuevo proceso para la producción de metabolitos, este trabajo representa un estudio sobre la metodología de cultivo de hongos filamentosos en soporte sólido y en particular, sobre la influencia de la composición del medio de cultivo en la síntesis de enzimas pécticas. Se presentan los resultados de la selección de cepas, el efecto inductivo de la pectina y la presencia de la sacarosa sobre la producción de enzimas pectinolíticas.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Se utilizaron tres cepas pectinolíticas de hongos filamentosos: *Aspergillus niger* van Tieghem (CH4), *Penicillium* sp. y *Rhizopus oryzae* Went et Prinsen-Geerligts (ATCC-4858). Las dos primeras cepas fueron proporcionadas por el Dr. Carlos Huitrón (Depto. de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) y se aislaron a partir de la pulpa de henequén (Saval *et al.*, 1983). La tercera cepa proviene de la American Type Culture Collection, E.U.A. Las cepas fueron conservadas en un medio de Malto-Bacto-Agar, a 4°C durante 6 meses.

Medios de cultivo

Medio de esporulación. Las cepas se resembraron cada 15 días en un medio con la siguiente composición (g/L): harina de yuca (*Manihot esculenta*) 40.0, KH_2PO_4 2.0, urea 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, CaCl_2 1.0, agar 15.0, agua 1000 ml y un

pH de 5.6 (Roussos, 1985). Las cepas fueron incubadas a 30°C durante una semana.

Selección de cepas en medio líquido

Para la selección de cepas se utilizó el medio líquido de Tuttobello y Mill (1961), modificado y constituido en g/L de: sacarosa 20.0, pectina 20.0, y un medio básico a base de extracto de levadura 2.0, NH_4NO_3 5.0, $(\text{Na})_2\text{SO}_4$ 0.2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0008, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004 y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.001. La sacarosa junto con la pectina fueron esterilizadas por separado a 120°C por 20 min y mezcladas a la solución mineral antes de la inoculación. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 125 ml de medio de cultivo inoculado con 2×10^7 esporas/g de substrato seco. La incubación se realizó a 30°C, con una agitación de 200 rpm durante 5 días.

Cultivo en medio sólido

El soporte utilizado fue bagacillo de caña de azúcar, proporcionado por el ingenio Emiliano Zapata de Zacatepec, Mor., México. Este proviene del fraccionamiento del bagazo de caña en dos partes: la fibra larga, destinada a la industria papelera y el bagacillo (médula de caña), que se utiliza en la preparación de forrajes a base de melaza.

El soporte fue molido y tamizado para obtener la fracción de malla 20-50. El bagacillo de caña, así preparado, se impregnó al 70% con el medio nutritivo que contiene pectina como inductor y sacarosa como fuente de carbono, como lo describió Oriol (1987). La composición de la solución mineral fue (g/L): urea 2.4, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 9.8, KH_2PO_4 5.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0008, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004 y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.001. Las sales minerales y la sacarosa junto con la pectina fueron esterilizados por separado a 120°C por 20 min. El pH del inóculo y la solución nutritiva fueron ajustados a 5. Los cultivos fueron realizados en dispositivos de fermentación descritos por Raimbault y Alazard (1980). Cada dispositivo de fermentación conteniendo 20 g de medio inoculado se incubó en baño maría regulado a 35°C. El flujo de aire administrado a razón de $4 \text{ L h}^{-1} \text{ columna}^{-1}$ fue prehumificado para evitar el desecamiento del medio de cultivo (Fig. 1). El muestreo se realizó tomando dos columnas cada 24 h.

Análisis

Se homogenizaron 4 g de muestra fermentada en 96 ml de agua con un Ultra-Turrax y posteriormente se centrifugaron a 5,000 rpm. El sobrenadante se

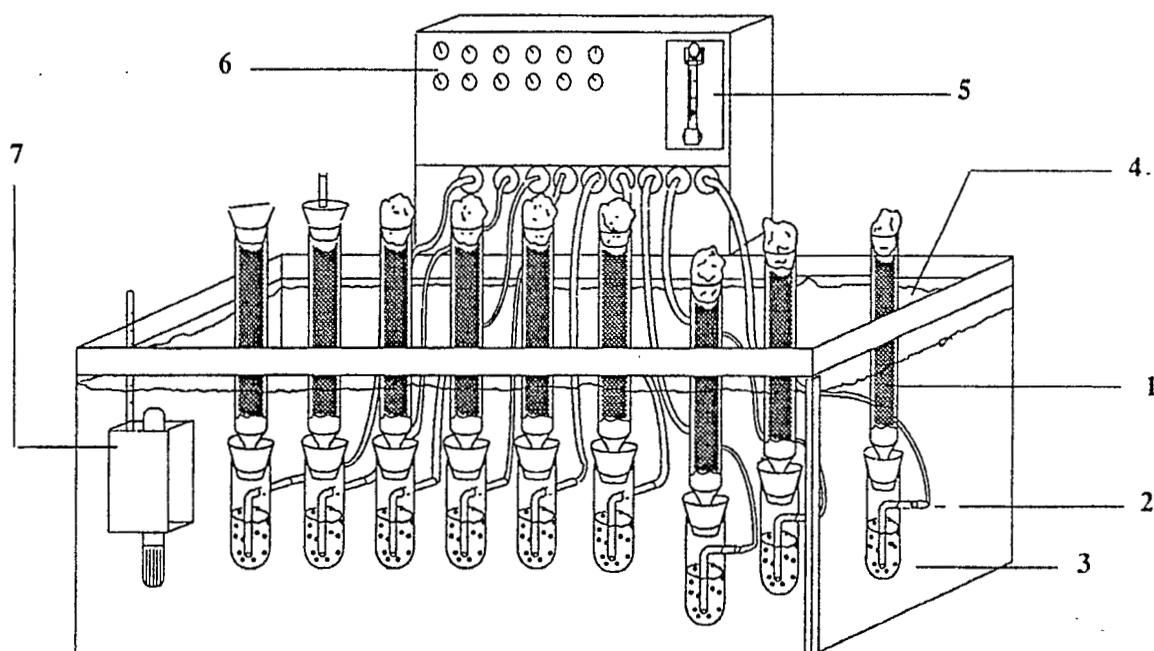


Fig. 1. Sistema de fermentación en medio sólido (FMS) a nivel laboratorio. 1: columna con soporte impregnado, 2: entrada del aire, 3: humificador del aire, 4: baño maría, 5: rotámetro, 6: microválvulas, 7: termostato.

separó y utilizó para los diferentes análisis efectuados (Fig. 2). El crecimiento micelial fue estimado a través de la determinación de ácidos nucleicos, según el método de Ogur y Rosen (1950), en el caso de cultivos en medio sólido. En medio líquido, el crecimiento se estimó directamente por la determinación del peso seco del micelio. Para la determinación de la sacarosa residual se realizó una hidrólisis previa, a partir del sobrenadante con invertasa en una solución amortiguadora de acetatos 0.01 M, pH= 4.5, a 55°C durante 10 minutos; los azúcares así liberados fueron determinados mediante la técnica de Miller (1959).

Las enzimas pécticas fueron recuperadas por prensado del medio sólido (Roussos, 1985), en tanto que la actividad pectinolítica (Endo) del extracto fue medida por viscosimetría en una solución de pectina al 1%, con un amortiguador de acetatos 0.01 M, pH=5 (Tuttobello y Mill, 1961). Una unidad de actividad PG (endo-poligalacturonasa) fue definida como la canti-

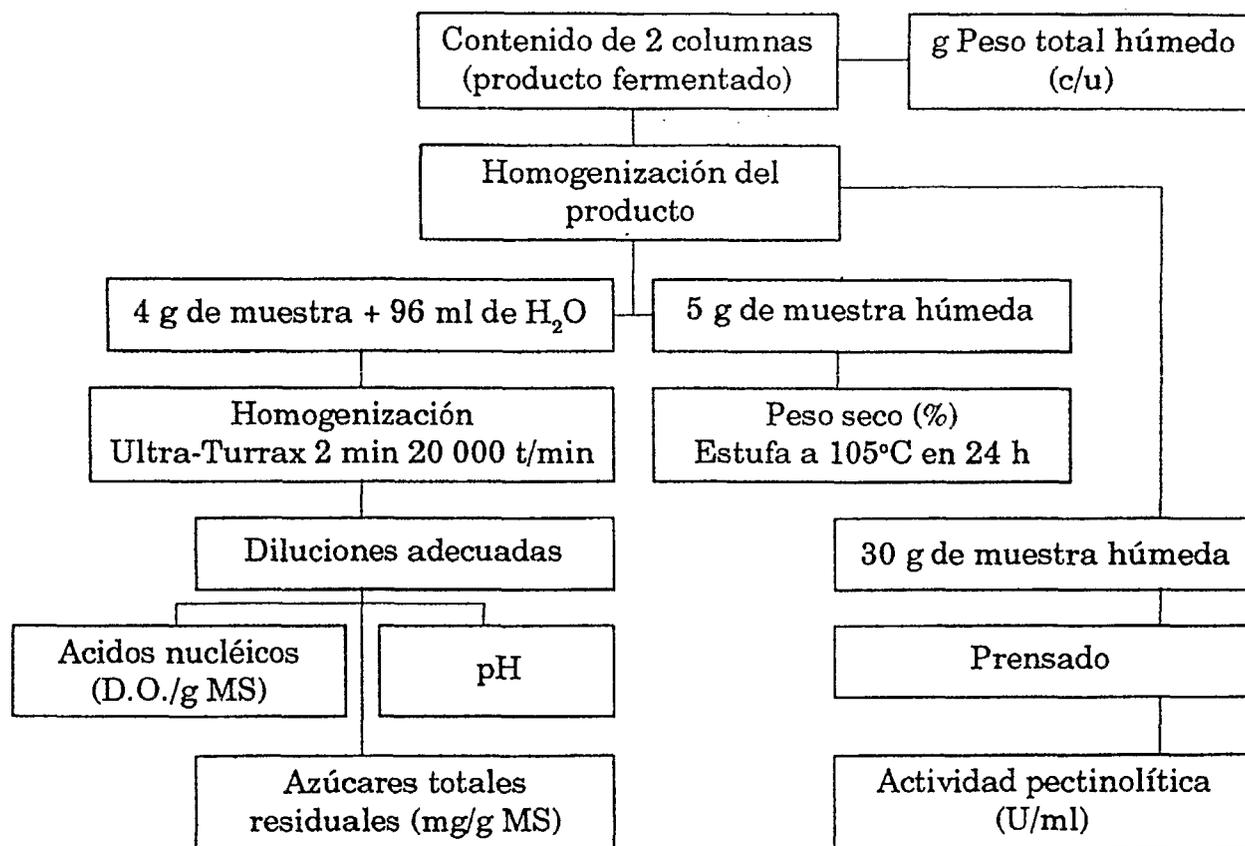


Fig. 2. Esquema de tratamiento y análisis de muestras provenientes de la fermentación en medio sólido sobre soporte.

dad de enzima necesaria para reducir la viscosidad inicial de un 25% en 20 minutos. La actividad pectinolítica (Exo) fue determinada por la medida de grupos reductores liberados de la hidrólisis enzimática de la pectina, utilizando la técnica de Miller (1959). El extracto enzimático fue aplicado a la clarificación del jugo de manzana y a la extracción del aceite de coco (Cintra *et al.*, 1986).

RESULTADOS Y DISCUSION

Selección de cepas

Se utilizaron 3 cepas de hongos filamentosos: *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. y *Rhizopus oryzae* en cultivo líquido. Se realizó un estudio comparativo de crecimiento y de producción de pectinasas a diferentes tiempos de incubación (48, 72, y 120 h). Se consideraron: la biomasa, el pH y la actividad pecti-

nolítica como criterios importantes para la selección. En la Tabla 1, se presentan los resultados del crecimiento para las tres cepas. Se observa que el comportamiento de los microorganismos es diferente. La cepa de *R. oryzae* presentó una mayor producción de biomasa con 18.3 g/L, después de 120 h de cultivo agitado. Con respecto a las otras dos cepas, únicamente *A. niger* presentó crecimiento rápido y abundante durante las primeras 48 h, contrariamente a la cepa de *Penicillium* sp. que tuvo un crecimiento bajo y lento durante las primeras 72 h. Para ambas cepas, la biomasa producida fue cercana a 6.5 g/L después de 120 h de cultivo. En relación a la producción de pectinasas, se observó que *R. oryzae*, se caracterizó por una baja producción. Al contrario, para *A. niger*, que su biomasa obtenida fue menor, la producción en pectinasas apareció a partir de las 48 h y fue más importante que la de *R. oryzae*. En la cepa de *Penicillium* sp., se observó que la producción de pectinasas era alta pero aparece mucho más tarde, alrededor de 120 h de cultivo. Por lo anterior, se podría pensar que la sacarosa presenta un efecto de represión catabólica de la síntesis de las enzimas pécticas para *Penicillium* sp. Esto no se observó con *A. niger*, dado que la actividad pectinolítica apareció en 48 h, antes de la utilización completa de dicha fuente de carbono. En consecuencia, se seleccionó *A. niger* por su mayor capacidad para sintetizar pectinasas en un medio a base de pectina y sacarosa.

Tabla 1. Crecimiento y producción de enzimas pécticas de tres cepas diferentes en medio líquido, agitado durante 5 días a 30°C.

Cepas	Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Actividad pectinolítica (U/ml)
<i>Aspergillus niger</i>	48	4.84	3.8	5
	72	7.7	3.7	5
	120	6.95	3.5	11
<i>Penicillium</i> sp.	48	0.788	4.4	0
	72	0.87	4.4	0
	120	6.45	5.5	20
<i>Rhizopus oryzae</i>	48	12.2	4.2	0
	72	16.55	4.1	1
	120	18.3	3.9	5

Considerando el efecto de diauxia como una característica interesante del sistema se utilizó, por un lado, la sacarosa como fuente de carbono para el desarrollo de *A. niger*, ya que ésta no presenta un efecto fuerte de represión catabólica sobre la biosíntesis de las enzimas. Por otro lado, se adicionó la pectina como inductor natural de pectinasas.

Efecto de la relación pectina / sacarosa en medio sólido sobre soporte

En esta parte, se presentan los resultados sobre el efecto de la composición del medio en cultivo sólido sobre soporte. Se utilizó la misma solución nutritiva del medio líquido, en la cual se estudiaron diferentes relaciones inductor (pectina)/ fuente de carbono (sacarosa), conservando constante la relación C/N de los diferentes medios. Las relaciones utilizadas fueron en: 1:1, 1:2 y 1:4 de pectina/sacarosa y en la figura 3, se muestran los resultados obtenidos con *A. niger*. La mejor relación pectina/sacarosa fue la 1:2, con un máximo de producción de 672 ± 0.5 U/g de substrato húmedo, después de 76 h. La

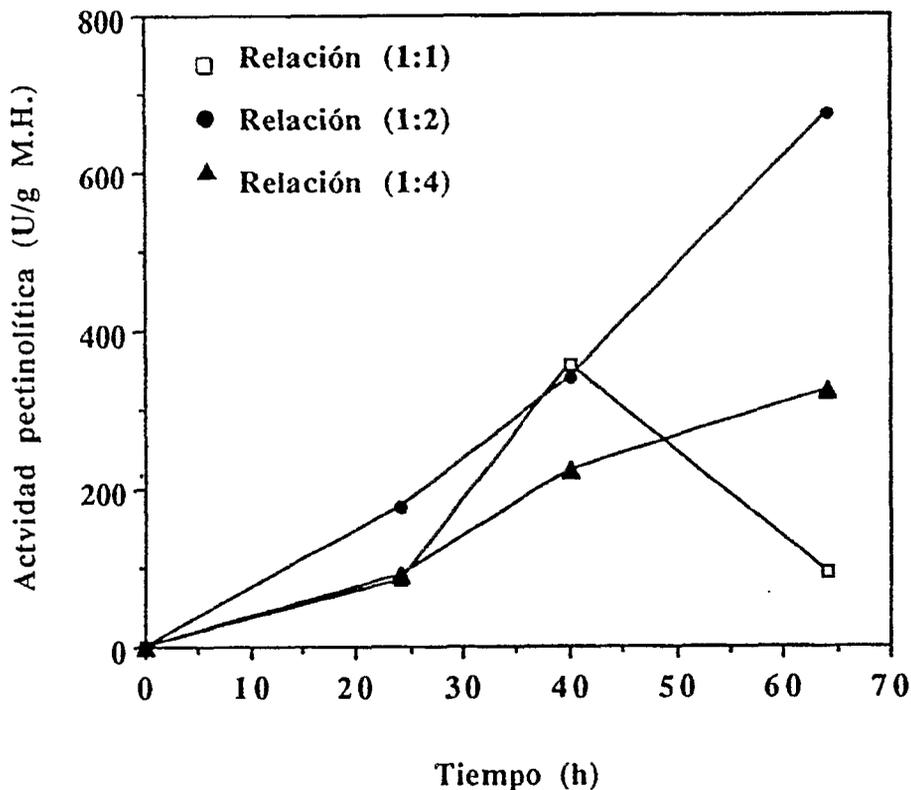


Fig. 3. Cinéticas de producción de pectinasas de *Aspergillus niger* en medio sólido, empleando bagacillo de caña de azúcar impregnado de una solución nutritiva con diferentes relaciones pectina/sacarosa a 30°C.

actividad "endo" pectinasa encontrada en los cultivos con pectina como sustrato fue muy importante con esta relación. Sin embargo, la actividad "exo" pectinasa determinada por la aparición de grupos reductores fue mínima. Esta relación permitió un crecimiento rápido sobre sacarosa y una producción importante de enzima inducida por la pectina. En la relación 1:4, el nivel de producción de enzima fue relativamente bajo, aunque se observó un fuerte crecimiento micelial y una esporulación temprana.

Un factor crítico en fermentación sólida cuando ésta se lleva a cabo en reactores estáticos, es el control del pH, el cual es difícil de regular en forma continua. Esto representa un serio problema, ya que en el transcurso de la fermentación el crecimiento micelial promueve una rápida acidificación del medio de cultivo, que inhibe por una parte el crecimiento y por la otra la síntesis de metabolitos. Para evitar variaciones fuertes del pH, Raimbault (1980) propuso la utilización de una mezcla de sales de amonio y de urea, que al ser utilizadas por el microorganismo como fuente de nitrógeno presentan un efecto amortiguador.

Cinéticas de producción de pectinasas en medio sólido sobre soporte

A partir de los resultados anteriores, se estableció un nuevo medio de cultivo para la producción de enzimas pectinolíticas sobre soporte con la relación pectina/sacarosa de 1:2 y una relación óptima de urea y sulfato de amonio. Para conocer el comportamiento de *A. niger* en estas condiciones, se realizaron cinéticas de crecimiento y de producción de enzimas. Las figuras 4-5, muestran la evolución de los diferentes parámetros en el transcurso de la fermentación (pH y de los ácidos nucleicos, consumo de sacarosa y actividad pectinolítica).

Con respecto al cambio del pH se observa una caída rápida desde el inicio de la fermentación, lo que corresponde a la germinación de las esporas y al inicio del crecimiento apical. Este valor de pH se mantiene constante y cercano de 3 ± 0.1 , hasta el final de la fermentación. A pesar de los valores bajos de pH, el crecimiento micelial no se ve afectado y esto se confirma con el cambio de la producción de biomasa, la cual es medida indirectamente por la determinación de los ácidos nucleicos (Fig. 4). En estas cinéticas, se observa que la producción de ácidos nucleicos de *A. niger* es de tipo exponencial entre 10 y 20 h, y coincide con valores bajos de pH. Asimismo, el consumo de la sacarosa por *A. niger* ocurre a las 15 h de fermentación en medio sólido, lo que se puede relacionar con la caída del pH. Por otra parte, se nota que la

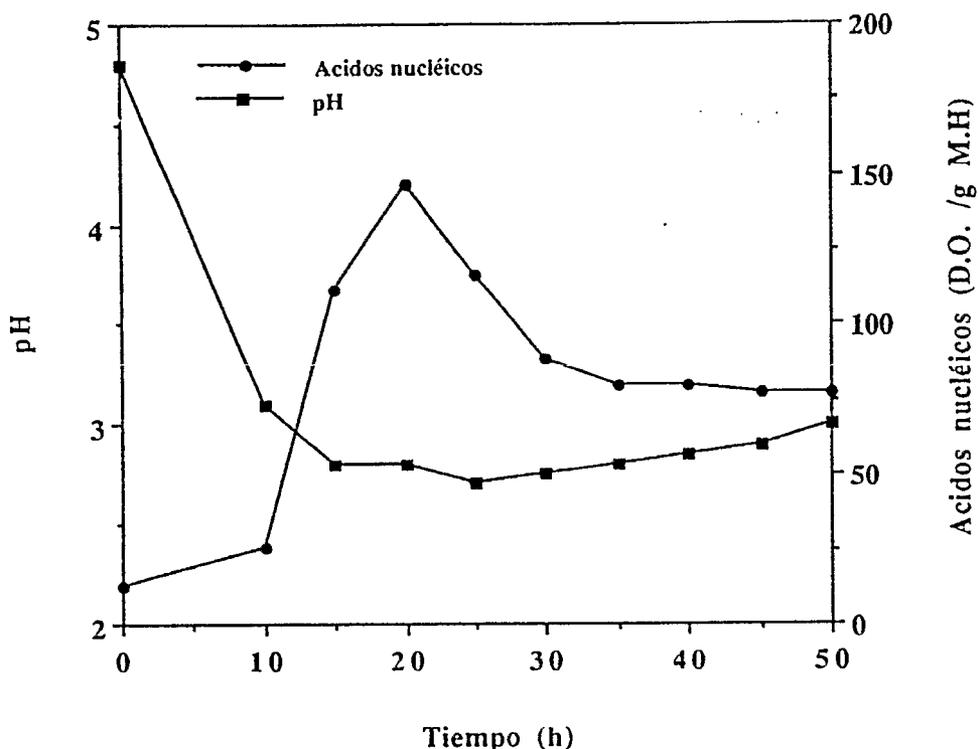


Fig. 4. Cinéticas de producción de ácidos nucleicos y evolución del pH durante el crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido (FMS) sobre soporte, con la relación 1:2 de pectina/sacarosa a 30°C.

producción de pectinasas aparece después de 15 h, lo que corresponde a la desaparición progresiva de la sacarosa. Se puede sugerir que la presencia de la sacarosa inhibe la biosíntesis de pectinasas, aunque el inductor esté presente.

En la Fig. 5, se observa después de 30 horas de fermentación, una completa asimilación de la sacarosa presente en el medio y por otro lado, en este momento comienza la síntesis de enzimas pécticas. Esto confirma el efecto diáuxico de la sacarosa junto con la pectina sobre el crecimiento de *A. niger*. La primera favorece el crecimiento micelial ya que ésta es una fuente de carbono más asimilable. La segunda comienza a ser degradada cuando la sacarosa se agota e induce la síntesis de las enzimas. Estos cambios en el metabolismo del hongo son una respuesta al efecto de la composición del medio de cultivo. Resultados similares fueron observados en cultivo líquido por Tuttobello y Mill (1961), que utilizaron fuentes de carbono dobles, tales

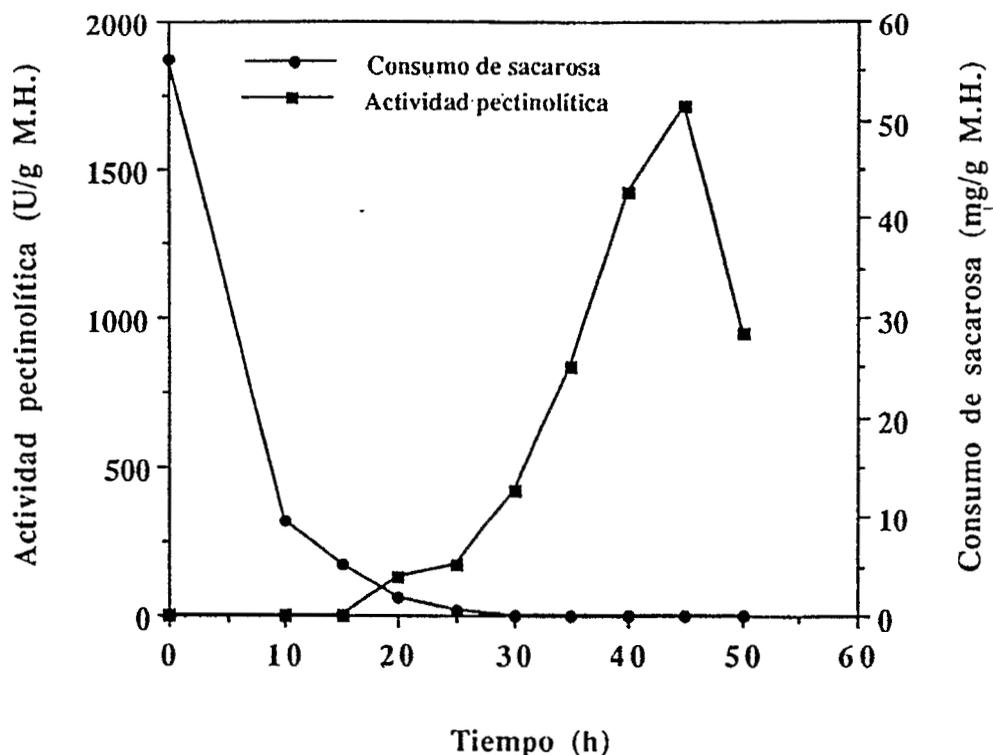


Fig. 5. Cinéticas de producción de pectinasas y consumo de sacarosa durante el crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido (FMS) sobre soporte, con la relación 1:2 de pectina/sacarosa a 30°C.

como glucosa-pectina, sacarosa-pectina y lactosa-pectina. La mayoría de los estudios realizados en medio líquido para la producción de enzimas pécicas emplean sustratos naturales (pulpa de remolacha, cáscara de cítricos, pulpa de henequén, etc.) con una alta concentración de pectina para estimular su síntesis. Sin embargo, debido a la complejidad de este tipo de sustratos, no se puede conocer con exactitud la influencia de la composición del medio de cultivo con respecto a la síntesis de las enzimas.

La producción máxima de enzimas pectinolíticas apareció a las 45 horas. Se pudo observar que las diferencias de producción de éstas y de los ácidos nucleicos durante la fermentación sólida sobre soporte, correspondía a un modelo de síntesis de enzimas parcialmente desacoplado del crecimiento micelial. El valor máximo de ácidos nucleicos fue alcanzado en 20 h. Este comportamiento resultó similar al caso de otros metabolitos secundarios como tetraciclinas y antibióticos producidos por *Streptomyces* (Behal,

1986). Por otra parte, el extracto enzimático producido fue empleado con éxito en la extracción del aceite de coco y en la extracción-clarificación del jugo de manzana con eficiencias comparables a los productos comerciales disponibles en México.

La cepa de *A. niger* (CH4) fue seleccionada por su capacidad para sintetizar enzimas pectinolíticas extracelulares, además de presentar características adecuadas para su desarrollo en medio sólido con soporte impregnado. El efecto de la composición del medio de cultivo fue confirmado, un efecto diáuxico se presenta con la adición de sacarosa como fuente de carbono y la pectina como inductor natural de las enzimas pécticas. Las concentraciones óptimas fueron 3 y 6% de pectina y sacarosa, respectivamente. La pectina indujo notablemente la síntesis de las enzimas, cuando el consumo de sacarosa fue total. La producción de enzimas pécticas alcanzó un máximo de actividad a las 45 h, reduciéndose dos veces el tiempo de fermentación con respecto al medio líquido. En cuanto a la cinética de la síntesis de las enzimas pécticas, ésta fue parcialmente desacoplada del crecimiento de *Aspergillus niger*.

La actividad pectinolítica obtenida fue más alta en cultivo en medio sólido, comparado con el cultivo sumergido. Se encontraron diferencias en rendimientos volumétricos de los dos sistemas de cultivo, de 11 U/ml en medio líquido y más de 600 U/g peso húmedo en medio sólido. Por otra parte, el tiempo de proceso se redujo en aproximadamente 50% con respecto al medio líquido, obteniéndose una productividad por unidad de volumen del cultivo líquido y del cultivo sólido de 0.92 y 7.95 U ml⁻¹ h⁻¹, respectivamente. La influencia de las fuentes de carbono dobles en medio sólido, presentó un efecto positivo sobre la producción de enzimas pécticas. El sistema de extracción de enzimas por prensado, resultó ser una operación eficiente de recuperación de las enzimas producidas mediante esta técnica. Por lo tanto el prensado del producto fermentado es una alternativa más en el proceso de producción de metabolitos de interés industrial vía fermentación en medio sólido (FMS) sobre soporte impregnado. Los resultados obtenidos en este estudio, permiten considerar la utilización posterior de desechos agroindustriales como sustratos para la producción de pectinasas en medio sólido. Estos podrán ser utilizados a la vez como soporte y como sustrato de la fermentación, lo que disminuirá el costo de producción de enzimas pécticas.

LITERATURA CITADA

- BEHAL, V., 1986. Regulation of tetracycline biosynthesis. In: Kleinkauf, H., H. V. Döhren, H. Dornauer y G. Neemann (Eds.). *Regulation of secondary metabolite formation*. Weinheim, Deerfield Beach. FL. VCH.
- BUDIATMAN, S. y B. K. LONSANE, 1987. Cassava fibrous waste residue: a substrate to wheat bran in solid-state fermentation. *Biotechnol. Letters* 9(8): 597-600.
- CARRIZALES, V., 1983. Producción de enzimas extracelulares en cultivos semisólidos. In: Huitrón, C. (Ed.). *Biotecnología de enzimas*. UNAM, México, D. F.
- CINTRA, M., C. GLONE, A. LOPEZ-MUNGUÍA y J. VERNON, 1986. Coconut oil extraction by a new enzymatic process. *J. Food Science* 51(3): 695-697.
- FOGARTY, W. M. y C. T. KELLY, 1983. Pectic enzymes. In: Fogarty, W. M. (Ed.). *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science Publisher, Londres.
- FOGARTY, W. M. y O. P. WARD, 1974. Pectinases and pectic polysaccharides. *Progress in Industrial Microbiology* 13: 59-119.
- GHILDYAL, N. P., S. V. RAMAKRISHNA, D. P. NIRMALA, B. K. LONSANE y H. N. ASTHANA, 1981. Large scale production of pectinolytic enzyme by solid state fermentation. *J. Food Science Technol.* 18: 248-251.
- HOURS, R. A., C. E. VOGET y R. J. ERTOLA, 1988. Apple pomace as raw material for pectinases production in solid state culture. *Biological wastes* 23: 221-228.
- HUITRON, C., S. SAVAL y M. E. ACUÑA, 1984. Production of microbial enzymes from agroindustrial by-products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 437: 110-114.
- ILCZUK, Z., 1976. The synthesis of pectinases by mutant of *Aspergillus niger* 36 in beet pulp medium. *Acta Microbiol. Polonica* 25(4): 401-411.
- JANDA, W., 1983. Fruit juice. In: Godfrey, T. y J. Reichelt (Eds.). *Industrial Enzymology. The application of enzymes in industry*. Macmillan Publisher LTD, Surrey.
- MILLER, G. L., 1959. Use of 3,5-dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chem.* 31: 426-428.
- NEUBECK, C. E., 1975. Fruits, fruits products and wines. In: Reed, G. (Ed.). *Enzymes in Food Processing*. Academic Press, Nueva York.
- OGUR, M. y G. ROSEN, 1950. Nucleic acids of plants tissues. (I). Extraction of desoxyribose nucleic acid and ribose nucleic acid. *Arch. Biochem.* 25: 262-276.
- ORIOLE, E., 1987. Croissance d'*Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l'eau. *Thèse Doctorat (U.P.S.)*, Toulouse, Francia.
- QADEER, M. A., J. IQBAL, S. K. AZIZ, M. HUSSAIN y H. HASSAN, 1985. Solid substrate fermentation for pectinase production by *Aspergillus foetidus*. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 28: 179-181.

- RAIMBAULT, M., 1980. Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé. *Thèse de Doctorat d'Etat*. Sciences Naturelles (Université Paul Sabatier), Toulouse, Francia.
- RAIMBAULT, M. y D. ALAZARD, 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 9: 199-209.
- RODRIGUEZ, J. A., W. BECHSTEDT, J. ECHEVARRIA, N. SIERRA, J. DELGADO, A. DANIEL y O. MARTINEZ, 1986. Optimisation of solid state fermentation of citrus dried peel by *Aspergillus niger* in a packed bed column. *Acta Biotechnol.* 6: 253-258.
- ROMBOULTS, F. M. y W. PILNIK, 1980. Pectic enzymes. In: Rose, A. H. (Ed.). *Economic Microbiology*. Academic Press, Londres.
- ROUSSOS, S., 1985. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases. *Thèse de Doctorat d'Etat*, Université de Provence, Francia.
- SAVAL, S., R. M. SOLORZANO, L. ALPIZAR, A. CEA y C. HUITRON, 1983. Producción de pectinasas microbianas a partir de la pulpa de henequén. In: Huitrón, C. (Ed.). *Biotecnología de enzimas*. UNAM, México, D. F.
- TUTTOBELLO, R. y P. J. MILL, 1961. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. 1. The production of active mixtures of pectic enzymes. *Biochem. J.* 79: 51-57.