

49

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



PRODUCCION DE AERODEHIDROGENASA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO QUIMICO
P R E S E N T A N

JOSE SANTOS GARCIA CRUZ
HILARION LUIS GONZALEZ RAMIREZ

1 9 8 0



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO.

PRESIDENTE: PROF. JORGE MARTINEZ MONTES.
VOCAL: PROF. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN.
SECRETARIO: PROF. GUILLERMO JOSE VALENZUELA.
PRIMER SUPLENTE: PROF. JOSE ANTONIO ORTIZ RAMIREZ.
SEGUNDO SUPLENTE: PROF. SALVADOR BADUI DERGAL.

Sitio donde se desarrolló el tema: FACULTAD DE QUIMICA.

SUSTENTANTES: JOSE SANTOS GARCIA CRUZ.
HILARION LUIS GONZALEZ RAMIREZ.

ASESOR DEL TEMA: GUILLERMO JOSE VALENZUELA.



HILARION LUIS GONZALEZ RAMIREZ.

JOSE SANTOS GARCIA CRUZ.

I N D I C E

	Página
INTRODUCCION.	1
CAPITULO I. GENERALIDADES.	2
I. I. Propiedades físicas, químicas y cinéticas,	
I. I. 1. Propiedades físicas.	4
I. I. 2. Propiedades químicas.	6
I. I. 3. Propiedades cinéticas.	12
I. II. Usos.	18
CAPITULO II. DESARROLLO DEL PROCESO.	28
II. 1. Métodos generales de producción.	28
II. I. 1. Selección del Microorganismo.	28
II. I. 2. Mantenimiento de los Cultivos.	29
II. I. 3. Preparación del Pie de Cultivo.	30
II. I. 4. Planta de Fermentación.	31
II. I. 5. Extracción.	34
II. I. 6. Clarificación.	35
II. I. 7. Evaporación.	36

	Página.	
II. I. 8.	Preservativos	37
II.I. 9.	Precipitación	37
II. I. 10.	Secado y molienda.	38
II. II.	Selección del Proceso.	40
II. III.	Análisis de las Variables de Proceso.	44
II. III. 1.	Microorganismo	44
II.III. 2.	Regimen de Flujo	50
II. III. 3.	Medio de Cultivo	51
II.III. 4.	Aereación y agitación	53
II. III. 5.	Espumación.	66
II. III. 6.	Potencial de Hidrógeno (pH).	70
II. III. 7.	Presión.	70
II. III. 8.	Temperatura.	74
II. IV.	Selección de los sistemas de separación	75
II. V.	Integración de Funciones.	78
	Descripción del Proceso	79
II. VI.	Técnica de operación.	81
CAPITULO III.	EVALUACION ECONOMICA.	86
III. 1.	Análisis de Mercado	86
III. 2.	Determinación de la Capacidad.	88

	Página
CAPITULO IV. DISEÑO PRELIMINAR DE LA PLANTA.	93
IV. 1. Balances de Materia y Energía.	93
IV. 2. Dimensionamiento del Equipo.	103
IV. 3. Cálculo de Servicios.	108
IV. 4. Resultados.	119
CAPITULO V. ESTUDIO DE VIABILIDAD.	121
V. 1. Costo de Materias Primas.	121
V. 2. Costo del Equipo	122
V. 3. Cálculo de la inversión fija y Capital de Trabajo.	124
V. 4. Costo Total del Producto.	127
V. 5. Cálculo de la rentabilidad.	132
CONCLUSIONES.	138
BIBLIOGRAFIA.	141

I N T R O D U C C I O N .

La importancia de las enzimas en los procesos industriales ha desarrollado métodos comerciales para su producción.

En este trabajo se presenta el estudio de viabilidad y el diseño preliminar de una planta para la producción de α -D-Glucopiranosas Aerodehidrogenasa.

En la actualidad la enzima que se consume en México es de importación, por lo que se plantea la posibilidad de su producción en nuestro País.

El estudio de viabilidad se hace en base a su consumo real (en mayonesa y en huevo en polvo) sin tomar en cuenta su mercado potencial.

I

GENERALIDADES.

Las enzimas son catalizadores específicos de origen biológico, de naturaleza proteínica y de elevado peso molecular, cuyo papel - consiste en acelerar las reacciones en las células. La catálisis se - produce por la acción conjunta de una sustancia químicamente diferen - ciada (grupo prostético, coenzima) y un acompañante proteínico (sopor - te, apoenzima) de constitución coloidal, la enzima se inactiva cuando se separa el grupo prostético de la parte proteínica. La enzima por lo tan - to es un complejo donde se conjuga una parte proteínica y una no protéica de origen orgánico, frecuentemente llamada holoenzima (1).

Las enzimas se dividen según su forma de acción y en una - manera más restringida según los sustratos o cuerpos que pueden atacar.

CLASIFICACION DE LAS ENZIMAS.

<u>Tipo</u>	<u>C l a s e</u>	<u>Características</u>
Hidrolasas	Estearasas	Separadores de ésteres de alco - holes monovalentes.
	Lipasas	Hidrolizadoras de grasas.
	Fosfatasas	Saponifican los ésteres del áci - do fosfórico.
	Carbohidrasas	Separan los hidratos de carbono.

<u>Tipo</u>	<u>Clase</u>	<u>características</u>
	Amidasas	Hidrolizan las amidas.
	Protidasas	Descomponen los polipéptidos en aminoácidos.
Hidroquinasas	Deshidrogenasas	Toman el hidrógeno de un donador durante la deshidrogenación y lo dan a un aceptor.
	Oxidasas	Activan el oxígeno y lo hacen captable para el hidrógeno.
Carboxilasas	Carboxilasa	Separan el dióxido de carbono de los ácidos cetónicos y lo transforma en el aldehído inmediatamente inferior.
Peroxidasas	Peroxidasa	Descomponen el peróxido de hidrógeno.

La enzima α -D-Glucopiranosas aerodeshidrogenada es una deshidrogenasa (oxido-reductasa) específica para la D-Glucosa. Es una glicoproteína de peso molecular de 150 000 a 180 000, que contiene dos moles de flavina adenina dinucleotido (FAD) por mol de enzima (1).

Esta enzima fué descubierta por Muller (1928) en *A. niger* y en *P. glaucum* y la denominó como glucosa oxidasa ya que creyó que se trataba de una oxidasa. Estudios posteriores de Franke (1944), demostraron que se trataba de una deshidrogenasa. En la Literatura puede encontrarse con los siguientes nombres: α -D-Glucopiranosas

Aerodehidrogenasa, glucosa oxidasa, penicilina B, notatina y penatina (2, 3, 4).

La propiedad comercial más importante de las enzimas es su actividad específica pues es una medida de su pureza, así como de su capacidad de reacción. La actividad se mide en unidades Sarrette (US), que se definen como la cantidad de enzima que causa el consumo de 10 mm^3 de oxígeno por minuto a temperatura estándar, medidos en manómetro de Warburg a 30°C y a presión atmosférica, con una concentración de 0.16 M de glucosa en una solución amortiguadora de 0.1 M de fosfato de potasio a PH de 5.9 , conteniendo un exceso de oxígeno y catalasa. La actividad específica se expresa en unidades de enzima por mg de proteína (apoenzima). La unidad como se definió anteriormente representa la oxidación de una micromol de D-Glucosa por minuto y está de acuerdo con la recomendación de la comisión de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (5).

I. - PROPIEDADES FISICAS, QUIMICAS Y CINETICAS DE LA α -D-Glucopiranososa Aerodehidrogenasa (Glucosa Oxidasa).

1. - Propiedades físicas (3, 6, 8, 9, 10, 11).

a) Peso molecular (apoenzima) = 83 000

b) Peso molecular (holoenzima) = 180 000

- c) Actividad de la Holoenzima. Con oxígeno a 30° C y $p^H = 5.6$.

$$Q_{O_2} = 148\,364 \text{ (100 mm}^3 \text{ de O}_2 \text{ consumido/mg proteína hr).}$$

- d) Espectro de absorción máxima. A p^H de 5.6 presenta los siguientes picos de absorción: 275, 337 y 451 nanómetros (nm).

- e) Coeficientes de absorción molar.

$$E_{275} = 272,57 \times 10^3 \text{ moles/cm.}$$

$$E_{337} = 21,45 \times 10^3 \text{ moles/cm.}$$

$$E_{451} = 22,34 \times 10^3 \text{ moles/cm.}$$

- f) Constante de sedimentación.

$$S_{20, w} = 7,93 \times 10^{-13} \text{ seg.}$$

- g) Difusividad.

$$D_{20, w} = 5,02 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg.}$$

- h) Punto isoeléctrico.

$$A \text{ } p^H = 4,35$$

- i) Volumen específico parcial

$$V_e = 0,75$$

- j) p^H de actividad

$$p^H = 3,5 - 8,0$$

- k) p^H óptimo

$$p^H = 5,6$$

- l) Color, olor y sabor.

Cristales con coloración amarilla, libres de olor y de sabor agradable.

- m) Altamente soluble en agua.
- n) Termolábil.
- o) Estabilidad.

En forma cristalina es estable. Soluciones entre p^H de 3.5 a 8.0 son estables durante largo tiempo a una temperatura de 0 a 4° C. Es inestable a temperaturas mayores a 40° C.

2. - Propiedades Químicas.

- a) Es una enzima de elevada especificidad. Actúa preferencialmente sobre la glucosa (5, 6).



En la tabla I.1 se presenta la especificidad de la glucosa oxidasa sobre varias hexosas (12).

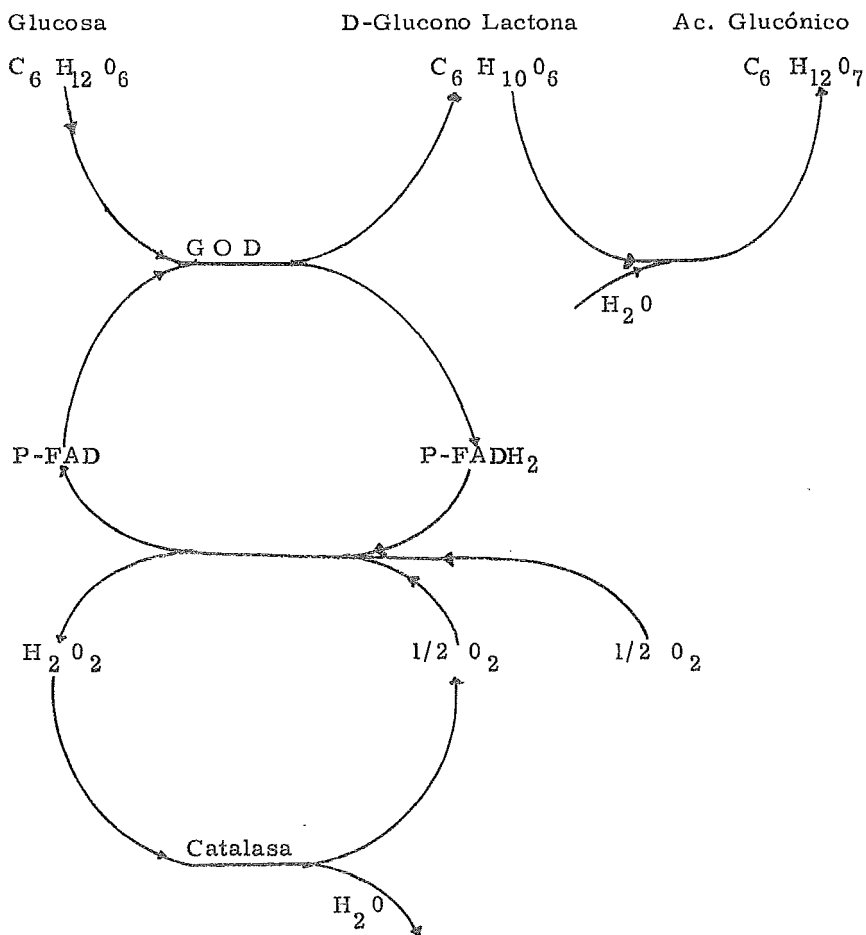
Tabla I. 1. Especificidad de la glucosa oxidasa.

Condiciones: 0.05 moles de sustrato, 0.1 ml de catalasa y 300 mg de glucosa oxidasa.

(Glucosa = 100)

Hexosa	Por ciento de inhibición
6-Metil Glucosa	1.85
4, 6-Dimetil Glucosa	1.22
Manosa	0.98
Xilosa	0.98
Maltosa	0.19
Melobiosa	0.11
Celobiosa	0.09
Ac. Glucurónico	0.05
Ac. Galacturónico	0.05

Mecanismo de Reacción (13).



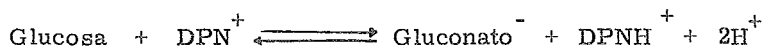
Donde:

P-FADH₂ = Forma reducida de la enzima.

P-FAD = Forma oxidada de la enzima.

GOD = Glucosa oxidada.

- b) Para el estudio termodinámico de la reacción, glucosa a ácido glucónico, se substituye el grupo prostético de la holoenzima (DPN: difosfo piridina nucleotido por FAD: flavina adenina dinucleotido).
(14).



- c) Fotoreducción de la glucosa oxidasa (reducción del grupo prostético). En la tabla I. 2 se presentan los tiempos de vida media sobre diferentes fotoreductores (15).

Tabla I. 2 Fotoreducción de la glucosa oxidasa.

Condiciones: 5 mg de enzima, 25 mM de fotoreductor, 0.1 M solución amortiguadora de pirofosfato de sodio (pH = 8.3), a 5° C y longitud de onda de 450 nm.

<u>Fotoreductor</u>	<u>Tiempo de vida media.en minutos</u>
EDTA	30
EDTP	90
Nicotina	15
L-Metionina	60
Dimetilamino propanol	90
Dimetilglicina etil éster	120
Trietilamina	180

d) Inhibidores.

Los Inhibidores respiratorios, como el ácido cianhídrico, monóxido de carbono, ácido sulfhídrico, azida de sodio y fluoruro de sodio, no actúan sobre esta enzima. En la tabla I. 3 se presentan una serie de inhibidores y su porcentaje de inhibición a cierta concentración (3, 7, 8, 10, 11).

Tabla I. 3 Inhibidores.

<u>Inhibidor</u>	<u>Concentración molar</u>	<u>Por ciento de Inhibición</u>
P-Cloromercuribenzoato	10^{-3}	100
8-Hidroxiquinoleina	10^{-2}	11
Sulfito ácido de sodio	10^{-3}	50
Nitrato de sodio	10^{-2}	13
Semicarbazida	10^{-2}	20
Cianida	5 x 10^{-1}	50
Fenilhidrazina	10^{-3}	30
Hidrazina	10^{-3}	30
Hidroxilamina	10^{-3}	30
D-Arabinosa	-	15
2-Deoxideglucosa	-	100

e) Potenciales de óxido reducción.

En la tabla I. 4 se presentan los potenciales de óxido reducción a dos potenciales de hidrógeno (16).

Tabla I. 4 Potenciales de óxido reducción.

A pH de 5.3

Reacción	Potencial (voltios)
$\text{EFI}'_{\text{ox}} + e^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{EFIH}'$	$E_{m1} = -0.063 \pm 0.011$
$\text{EFIH}' + e^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{EFI}_{\text{red}}\text{H}_2$	$E_{m2} = -0.065 \pm 0.007$

A pH de 9.3

Reacción	Potencial (voltios)
$\text{EFI}'_{\text{ox}} + e^- \rightleftharpoons \text{EFI}'^-$	$E_{m1} = -0.200 \pm 0.010$
$\text{EFI}'^- + e^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{EFI}_{\text{red}}\text{H}^-$	$E_{m2} = -0.240 \pm 0.005$

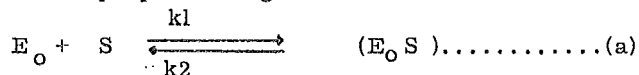
3. - Propiedades Cinéticas.

La reacción más estudiada es la oxidación de la glucosa a ácido glucónico catalizada por glucosa oxidasa.

La constante de Michelis es la base de la comparación de sistemas enzimáticos y es numéricamente igual a la concentración de sustrato que corresponde a la mitad de la velocidad máxima de reacción.

Se presentan a continuación algunos mecanismos propuestos - en la Literatura.

a) Laser (8) propone el siguiente mecanismo:



E_o = Enzima oxidada

S = Sustrato

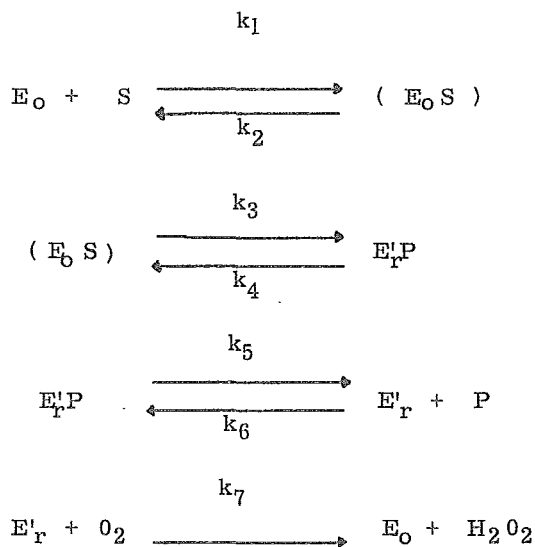
$(E_o S)$ = Complejo enzima oxidada-sustrato

Podemos decir que la reacción se lleva a cabo si K_3 es mayor que K_2 , en este caso se incrementa K_m . Slater obtuvo la siguiente expresión de K_m para este mecanismo.

$$K_m = k_2 + k_3 / k_1$$

En este mecanismo, se consideró que la reacción (a) es de primer orden, y la reacción (b) de orden cero.

- b) Dixon (8) propone un mecanismo en el que la primera reacción es con glucosa y procede en la siguiente forma:



$E'_R P$ = Complejo enzima reducida producto

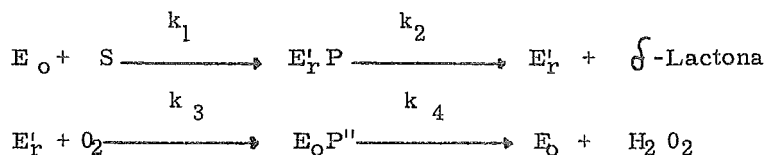
E'_R = Enzima reducida

De donde la constante de Michaelis es:

$$K_m = \frac{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5}{k_1 (k_3 + k_4 + k_5 + k_3 k_5 / k_7 C_{O_2})}$$

C_{O_2} = Concentración de oxígeno

- c) Q. H. Gibson, B. E. P. Swoboda y V. Massey (18) proponen el siguiente mecanismo:



$E_O P'' =$ Complejo enzima oxidada - producto

La ecuación de velocidad de este mecanismo es :

$$1/v = \frac{k_2 k_4}{k_1 k_3} + \frac{1}{k_1 C_S} + \frac{1}{k_3 C_{O_2}}$$

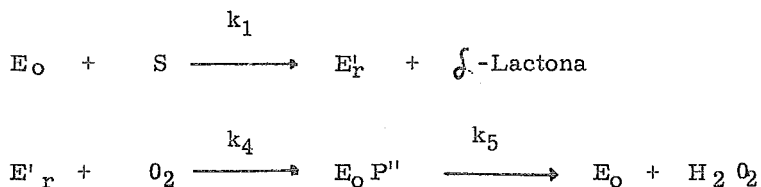
Para la obtención de este mecanismo de reacción se fijó el número de formas distinguibles de la enzima, obtenidas en el espectrofotómetro. Se les determinó estudiando la correlación entre el tiempo y la longitud de onda.

En la tabla I. 5 se presentan datos cinéticos de la enzima a varias temperaturas.

Tabla I. 5 Datos cinéticos.

Temperatura (° C)	0.00	13.00	27.00	38.00
Vel. máxima (m/seg)	235.00	590.00	1 150.00	2 000.00
K_m azúcar (M)	0.12	0.11	0.11	0.12
K_m oxígeno (M)	0.21	0.29	0.48	0.83
K_1 (1/M seg)	2 100.00	5 500.00	10 000.00	16 000.00
K_2 (1/seg)	650.00	3 300.00	-	-
K_3 (1/M seg)	1.3×10^6	1.7×10^6	2.1×10^6	2.4×10^6
K_4 (1/seg)	370.00	720.00	1 150.00	2 000.00

d) H. J. Bright y Appleby (19) proponen el siguiente mecanismo:



La ecuación de velocidad de reacción es:

$$C_T / v = 1/k_5 + 1/k_1 C_g + 1/k_4 C_{O_2}$$

Algunos datos de la cinética a pH de 5.6 y temperatura igual a 27°C se presentan a continuación:

$$k_1 = 12\,600 \text{ (1/M seg)} \quad pK_1 = 5.0$$

$$k_2 = 3\,400 \text{ (1/seg)}$$

$$k_4 = 2.5 \times 10^6 \text{ (1/M seg)} \quad pK_4 = 6.9$$

$$k_5 = 1\,200 \text{ (1/seg)} \quad pK_5 = 4.1 ; pK'_5 = 7.4$$

La siguiente ecuación de velocidad, en estado estable, describe la influencia del pH en el mecanismo de reacción.

$$C_T / v = \frac{(C_{H^+}/K_5 + K'_5/C_{H^+} + 1) \cdot k_2 k_3 + k_2 k_5 + k_3 k_5}{k_2 k_3 k_5} +$$

$$\frac{(C_{H^+}/K_1 + 1)}{k_1 C_g} + \frac{(k_4/C_{H^+} + 1)}{k_4 C_{O_2}}$$

C_g = Concentración de glucosa.

C_{O_2} = Concentración de oxígeno.

II. USOS DE LA GLUCOSA OXIDASA.

La glucosa oxidasa (7) generalmente se usa en la conservación de alimentos y refrescos, así como, en la producción de penicilina B. Las concentraciones más usadas industrialmente son:

Líquida : 750 a 1 500 unidades/ml

Sólida : 1 500/mg

La glucosa oxidasa tiene las siguientes aplicaciones:

1. - Formación de peróxido de hidrógeno
2. - Formación de ácido glucónico.
3. - Remoción de glucosa.
4. - Remoción de oxígeno.

Algunos ejemplos de las aplicaciones de la glucosa oxidasa en la industria son:

1. Formación de peróxido de hidrógeno:

- a) En combinación con catalasa y oxígeno forma un sistema llamado "Naseent" usado como agente conservador.
- b) Como material analítico en la determinación de glucosa, formando un sistema secundario con peroxidasa y un agente cromógeno (o-Dianisidina) (20).

- c) En tratamiento de harinas.
- d) En cloraciones biológicas.

2. Formación de ácido glucónico :

- a) Para formar sales y ácido de alta pureza.

3. Remoción de glucosa:

- a) Para determinar el poder reductor de mezclas de azúcares.
- b) Para la prueba de tolerancia de galactosa.
- c) Para prevenir la reacción de Maillard en los huevos, carne - seca y papas fritas.

4. Remoción de oxígeno.

- a) En los jugos cítricos y refrescos contra el efecto deteriorativo de la luz.
- b) En la determinación de glucosa en sistemas cerrados, por - medición polarográfica del oxígeno residual.
- c) Para prevenir el desarrollo de la rancidez, removiendo el - aire ocluido en emulsiones de aceite y agua.
- d) Prevención de la oxidación de la cerveza.
- e) Prevención de la oxidación del vino a vinagre.
- f) Prevención del obscurecimiento enzimático en el congela - miento de frutas frescas, incluyendo cerezas y duraznos.

- g) Prolongar el tiempo de almacenamiento del semen de toro.
- h) Prevención de la corrosión en latas, como en refrescos, y - para mantener el color.

5. U s o s D i v e r s o s .

- a) Como bactericida. En presencia de glucosa y oxígeno produce una fuerte cantidad de agua oxigenada.
- b) En la goma de mascar se usa como conservador activo.
- c) Para seguir el curso de las reacciones Glucogénicas, de azúcares tales como: maltosa, lactasa, fosfatasa, invertasa y amilasa.

Caracterización de las aplicaciones industriales más importantes de la glucosa oxidasa.

1. - Prevención de la Reacción de Maillard. (7, 21).

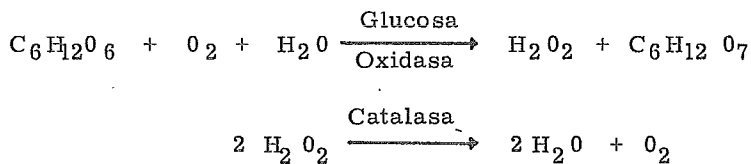
Esta reacción ocurre entre el grupo aldehído y el grupo amino. En los alimentos, el grupo aldehído se encuentra en forma de azúcares reducidos como la glucosa y el grupo amino en forma de proteínas. - Esta condición favorece la reacción de Maillard, en la que el producto de reacción pierde su solubilidad y consecuentemente hay un cambio en el - sabor, olor y color.

Esta reacción que no es deseable en la mayoría de los alimentos, se efectúa en la elaboración de pasteles y panes, lo mismo que en cereales, papas fritas y carnes asadas.

La glucosa oxidasa se usa conjuntamente con la catalasa para formar un sistema en el que la glucosa se oxida a ácido glucónico y la catalasa descompone el agua oxigenada en agua y oxígeno.

En la producción de huevo en polvo, las pequeñas cantidades de glucosa pueden causar la reacción de Maillard en el producto por lo que es necesario oxidar la glucosa con oxígeno y catalizar la reacción con glucosa oxidasa después de secar el huevo, para preservar el sabor y prevenir el obscurecimiento del producto. Después de agregar la glucosa oxidasa se añade agua oxigenada y catalasa, esto se hace con el fin de eliminar la glucosa totalmente.

Las reacciones que se llevan a cabo son:



En la tabla I. 6 se resumen las cantidades requeridas de reactivos, así como las condiciones de reacción.

Tabla I. 6 Cantidades requeridas de reactivos en base a -
1 000 lb de producto.

<u>Producto</u>	<u>Yema</u>	<u>Clara</u>	<u>Huevo</u>
Temperatura (° F)	80-100	55	90
Tiempo de agitación (hr).	4	12-16	6
Unidades de GOD Catalasa.	75 000	75 000	100 000
pH	7-7.5	6.8	-
H ₂ O ₂ al 35% (ml)	600	600	-

2. Maduración de Harinas (7).

Se añaden agentes oxidantes a la harina para producir los -
efectos de maduración. Esto se logra añadiendo glucosa oxidasa, -
catalasa libre y ácido ascórbico, produciéndose peróxido de hidrógeno
(agente oxidante).

La enzima facilita la remoción del oxígeno incorporado en -
las pastas hechas con harina.

3. - Leche en Polvo. (7).

La glucosa oxidasa se usa en la evaporación de leche como agente desoxigenante, esto significa que retarda el obscurecimiento del producto que ocurre durante su almacenamiento.

La enzima remueve la glucosa, deteniendo la reacción de Maillard.

4. - Protección de Grasas Animales contra la Oxidación. (7)

Existen varias formas de preparar soluciones acuosas para su protección, como son:

<u>Investigador:</u>	<u>Sistema :</u>	<u>Observaciones:</u>
Mitsyk	GOD-Glucosa-ácido ascórbico, en sol. amortiguado <u>ra</u> de acetato.	Se aplica en forma de película en la superficie de la grasa.
Osadhaya	GOD-Catalasa	Se agrega a la carne de cerdo y a la grasa de toro. Se envasa herméticamente a 20-25° C, y dura aproximadamente 18 meses.
-	Sol. Glucosa-GOD-Catalasa, y una amortiguado <u>ra</u> con 1.5% de agar. Se forma un gel.	Se aplica como material de sellado en bolsas de polietileno, pliofilm, interiores de latas de cerveza y de conservas.

<u>Investigador:</u>	<u>Sistema:</u>	<u>Observaciones:</u>
-	Sol. GOD-Catalasa 750 unidades /ml.	Se usan en la preservación de mantequilla y crema. Se añade de 2 a 20 ml. de sol. por 100 kg. de mantequilla. Tiempo máximo de almacenamiento: 9 meses.

5. - Desoxigenación de la Cerveza.
(7, 22).

La importancia comercial de la glucosa oxidasa favoreció el desarrollo de métodos comerciales para su aplicación, debido a su competencia con los cambios oxidativos de la cerveza, ya que se observan altos niveles de aire en las botellas de cerveza.

Los niveles usados son de 0.25 a 0.50 unidades por onza de cerveza. Se añaden después de la primera fermentación para dar protección a la cerveza en el proceso y en su envasado.

También se emplea el sistema GOD-Catalasa para proteger la cerveza, reemplazando los métodos de pasteurización. El uso de éste sistema depende de la cantidad de glucosa o materiales glucogénicos en la cerveza ya que es necesario que la cerveza contenga el sus - trato para la glucosa oxidasa.

6. - Protección de Emulsiones agua-aceite (7).

La mayonesa es una emulsión de aceite en agua que contiene de un 10 a un 12% de aire. El problema principal es el de eliminar el oxígeno ocluido y controlar la contaminación de iones metálicos.

Hoy en día se usa el sistema GOD-Catalasa que es muy efectivo ya que evita su oxidación. Para producir 60 Gal. de mayonesa se agregan 50 ppm de GOD-Catalasa. Con esto se prevee la rancidez de la mayonesa por un tiempo de 5 meses, también los efectos en el color debido al uso de clara de huevo (reacción de Maillard). Las cantidades de agua oxigenada y ácido glucónico son despreciables, ya que no tienen efecto en el color y el sabor.

7. - Estabilización de Concentrados y Refrescos Cítricos. (7, 21, 22).

Las bebidas cítricas generalmente con la luz del sol y la luz fluorescente sufren deterioro debido a que la luz cataliza la formación de peróxido, estos actúan como agentes oxidantes sobre los aceites cítricos, teniendo como resultado una variación en el sabor y una decoloración de la bebida. El oxígeno es necesario para la formación de estos peróxidos. Para prevenir estos cambios se recomienda el uso de bote

llas oscuras o el uso de agentes reductores como son: ácido ascórbico o el sistema GOD-Catalasa. Este sistema enzimático trabaja estequiometricamente y afecta solo al oxígeno ocluido. Es necesario que la bebida contenga glucosa para una remoción efectiva del oxígeno.

Se utilizan de 0.50 a 12.00 unidades de GOD-Catalasa por onza de refresco dependiendo del pH. El tiempo máximo de almacenamiento es de 5 meses.

8. - Tratamiento de Vino Blanco, (7).

El vino blanco sufre oxidación, que depende de un gran número de factores como son: hongos que atacan a las uvas, alta actividad de la polifenolasa y alto contenido fenólico en el pellejo de la uva. La adición de ácido ascórbico sin dióxido de azufre tiene un efecto temporal de preservación del color, el cual se neutraliza al exponerse al aire. El oxígeno tiene un efecto nocivo sobre el color del vino y si se remueve por depuración con nitrógeno se mejora substancialmente el producto.

Algunos estudios sobre la glucosa oxidasa en el vino blanco dieron como resultado el aumento en el tiempo de almacenamiento, siempre que hubiera suficiente catalasa en la GOD.

La adición de GOD-catalasa previene el obscurecimiento y acetificación de vinos blancos. La concentración necesaria de la enzi

ma para la remoción del oxígeno es de 20 a 40 unidades por litro de vino, cuando está presente suficiente cantidad de glucosa. Aproximadamente 0.1mg de glucosa por 100 ml de vino. El etanol en concentraciones de 11.3 a 14.4% tienen un pequeño efecto en el sistema enzimático a 25° C - por un período de pocas horas y a 30° C exhibe una inactivación completa después de 3 horas. El pH del vino tiene un efecto sobre la velocidad de remoción del oxígeno en un intervalo de 3 a 4 hay un rápido incremento en la actividad enzimática y a un pH igual a 2.8 la enzima parece ser rápidamente inactivada. El dióxido de azufre inhibe el sistema enzimático. El ácido ascórbico por sí solo no previene el obscurecimiento, pero incrementa la velocidad de remoción del oxígeno, cuando se usa conjuntamente con el sistema GOD- Catalasa.

I I

DESARROLLO DEL PROCESO.

I. - MÉTODOS GENERALES DE PRODUCCION.

El conocimiento de los métodos usados en la producción comercial de enzimas (23) es esencial para comprender las características del producto. Ciertas fases de la producción comercial de las enzimas se describen en patentes y en publicaciones científicas. Las fases exactas del proceso varían de un fabricante a otro, pero los métodos de cultivo de los microorganismos pueden clasificarse como: cultivo en medio líquido y cultivo en medio - semisólido.

Las etapas más importantes en la producción comercial de las enzimas son:

1. - Selección del Microorganismo.

La primera etapa en la fabricación de cualquier enzima comercial es la selección de un microorganismo que cuando se desarrolle en un cultivo puro produzca la enzima deseada con buen rendimiento (34).

Los criterios de selección son los siguientes:

- a) Velocidad de crecimiento.
- b) Toxicidad.

- c) Contenido proteínico.
- d) Eficiencia en la conversión de carbohidratos.
- e) Tolerancia a las altas temperaturas.
- f) Requerimiento de nutrientes.
- g) Rendimiento.
- h) Mutagénesis

El tipo específico del microorganismo que se emplee en la producción de enzimas debe obtenerse originalmente por aislamiento de fuentes naturales o de cultivos ya establecidos.

La enzima glucosa oxidasa puede producirse a nivel comercial (7) a partir de los siguientes microorganismos: *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* y *Penicillium amagasakiense*.

2. - Mantenimiento de los Cultivos.

En la producción de enzimas los cultivos del microorganismo deben mantenerse puros, eso se logra aplicando técnicas microbiológicas. Estas técnicas de cultivo incluyen las de agar inclinado y el almacenamiento de cultivos liofilizados y bajas temperaturas. El uso de estas técnicas evitan la contaminación de los cultivos por otros microorganismos, asegurando su pureza y el desarrollo de mutantes dentro del mismo cultivo, y por pruebas microscópicas realizadas regularmente

te. Una precaución adicional en la fabricación es el análisis de esporas simples o células aisladas a intervalos regulares, observando sus características bioquímicas para tener una máxima producción. De esta manera, los cultivos usados en la producción de la enzima tienen características uniformes.

3. - Preparación del Pie de Cultivo.

Todos los cultivos se preparan para usarse como pies de cultivo para la producción de la enzima, esto se logra controlando la pureza y las formas variantes, así como sus características fisiológicas (17).

Los pies de cultivo se preparan bajo rígidas técnicas asépticas. En el laboratorio los cultivos puros se utilizan para inocular matraces con nutriente líquido estéril o botellas con medio semisólido estéril. Los medio nutrientes que se emplean en el laboratorio son los mismos que los usados en la producción comercial de la enzima. Los matraces o botellas con los pies de cultivo se incuban bajo condiciones controladas de temperatura. Después de verificar su pureza se usan directamente en los medios de producción.

El crecimiento normal en los tanques de fermentación debe seguir los patrones previstos con respecto al crecimiento, estado fisiológico de los microorganismos, la desaparición de los nutrientes y al cambio de pH (23).

4. - Planta de Fermentación.

La composición exacta de los medios nutrientes empleados en la producción comercial de las enzimas varía de un fabricante a otro. El medio que se use debe ser el adecuado para las condiciones de fermentación y para la producción de la enzima deseada. Un estricto control en la composición del medio es vital para obtener la enzima con un rendimiento uniforme.

Los medios de cultivo más empleados son el cultivo sumergido y el cultivo semisólido (23).

a) Cultivo Sumergido.

Las fermentaciones efectuadas por el método del cultivo sumergido se realizan en fermentadores cerrados, equipados con agitadores, dispositivos para aereación (aire estéril) y chaquetas o serpentín para controlar la temperatura. Los fermentadores se lavan con álcali y/o soluciones de detergente y agua y se esterilizan con vapor vivo.

El medio líquido se esteriliza en el fermentador por calentamiento. La masa estéril en el fermentador se enfría hasta 25° C, bajo presión, usando aire esterilizado que pasa a través de los filtros esteriles de carbón activado, y lana de vidrio o un agente filtrante similar. El pH se ajusta después de la esterilización

con un álcali o un ácido. La esterilidad de la carga se verifica por técnicas bacteriológicas estandar (11, 17).

El medio, enfriado en el fermentador, se inocula con un pie de cultivo puro del microorganismo. Se aplica al cultivo en desarrollo una agitación y aereación adecuadas. La temperatura se mantiene por la circulación de agua en la chaqueta. Se toman muestras periódicamente durante la fermentación para llevar a cabo las pruebas de control, como son: controles continuos de temperatura, pH, consumo de nutrientes del cultivo, pureza del cultivo y actividad de la enzima.

El punto óptimo de producción es aquel en el que las pruebas de laboratorio muestran que se ha alcanzado la máxima actividad de la enzima. El período de fermentación puede ser de 12 a 120 hr. dependiendo del sistema enzimático producido (23).

b) Cultivo semisólido.

La producción de la enzima por éste método se lleva a cabo en grandes cámaras provistas de charolas, o en tambores rotatorios horizontales. Las cámaras, charolas y tambores se lavan con detergente y se esterilizan con hipoclorito de sodio o formaldehído y se tratan con vapor entre lote y lote. Los nutrientes que

están constituidos de cascarilla de trigo y otros ingredientes, se mezclan con agua y se someten a un tratamiento con vapor durante 70 minutos en promedio, la masa caliente se enfría hasta 25°C y se inocula con un pie de cultivo puro.

Cuando se usan tambores horizontales la masa se inocula en el tambor, la temperatura se controla con un flujo de agua sobre éste y la aereación por el paso de aire filtrado. El tambor gira lentamente durante el período de desarrollo del microorganismo.

Cuando se usan charolas el material inoculado se transporta a la cámara en carretillas y se trata con vapor antes de emplearse. Se esprea en capas sobre las charolas limpias de fondo perforado, éstas se colocan sobre los anaqueles y se incuban hasta obtener la máxima actividad de la enzima. El tiempo óptimo de producción varía de 1 a 7 días según el tipo de microorganismos. La temperatura de la cámara se mantiene por circulación de aire húmedo o por el paso de agua en el interior de las charolas. La estructura porosa del medio de cascarilla de trigo, permite al aire penetrar por todas partes.

Durante el crecimiento en los tambores o charolas la temperatura, el pH, el nivel de humedad, la pureza del cultivo y la acti

vidad de la enzima se determina cuidadosamente sobre las muestras. Durante el tiempo de crecimiento se observa una pérdida significativa en el peso del cultivo, debido a la oxidación del material orgánico a dióxido de carbono y agua.

5. - Extracción.

La extracción se aplica a medios líquidos cuando la enzima deseada es del tipo intracelular y no está presente en el licor libre. Las enzimas extracelulares están presentes en el licor libre y no es necesaria una extracción.

En el primer caso las células se remueven por filtración. El licor se descarga y la torta se sumerge en agua con cloruro de calcio y/o fosfatos. Las células sufren autólisis, y los residuos celulares se filtran o centrifugan, resultando un extracto claro del cual se obtiene la enzima deseada.

En el caso del medio semisólido la extracción de la enzima lleva a cabo sobre el material húmedo después de completar el crecimiento, también el medio de cultivo puede secarse y efectuarse extracciones sucesivas. Un procedimiento común es un sistema de extracción a contracorriente que filtra y extrae el material soluble relativamente libre de los microorganismos y partículas insolubles del medio.

6. - Clarificación.

El licor fermentado de cultivos líquidos y el extracto de cultivos semisólidos contienen las enzimas en solución en presencia de sólidos suspendidos, que incluyen material del medio y células o micelios.

Se agregan materiales diversos al licor con el propósito de obtener una estabilización o activación; para ajustar el pH, flocular o para mejorar la velocidad de filtración.

En la tabla II. 1 se enlistan los agentes clarificantes empleados en la industria.

Tabla II. 1. AGENTES CLARIFICANTES.

Fosfato diámonico	Gelatina
Fosfato monoámonico	Goma arábica
Acido ascórbico	Cal hidratada
Cloruro de calcio	Acido Clorhídrico
Sulfato de calcio	Acido fosfórico
Fosfato de calcio	Nitrato de sodio
Fibra de celulosa	Gluconato de sodio
Cisteína	Fosfato monosódico
Tierras diatomáceas	Sulfito de sodio

7. - Evaporación.

El filtrado claro se usa para precipitar directamente a la enzima o se concentra antes de precipitarla, o bien, se emplea en la formulación del producto líquido. Cuando se requiere concentrar, la concentración se efectúa en un evaporador al vacío a baja temperatura, esta operación se limita a soluciones en las que el producto deseado no forma pastas viscosas que incrusten los equipos o que impidan obtener la enzima en forma cristalina.

8. - Preservativos.

Durante el proceso de purificación se emplean pequeñas cantidades de preservativos para inhibir la contaminación por organismos extraños. Algunos de los preservativos empleados son tolueno, ácidos orgánicos o sus sales, compuestos fenólicos y fluoruro de sodio. Ciertos preservativos son enteramente transitorios, esto es, que no dejan residuos en el producto final, otros pueden dejar residuos en la enzima concentrada no excediendo las ppm. En los alimentos el nivel final nunca debe exceder las 0.05 ppm.

9. - Precipitación.

La enzima se precipita por la adición de uno o más precipitantes o coprecipitantes al filtrado o licor concentrado. Se aplican controles precisos en la cantidad de ingredientes, el modo de adición y la temperatura. Después de la precipitación el material se filtra o centrifuga.

En la tabla II.2 se presentan algunos precipitantes de uso común.

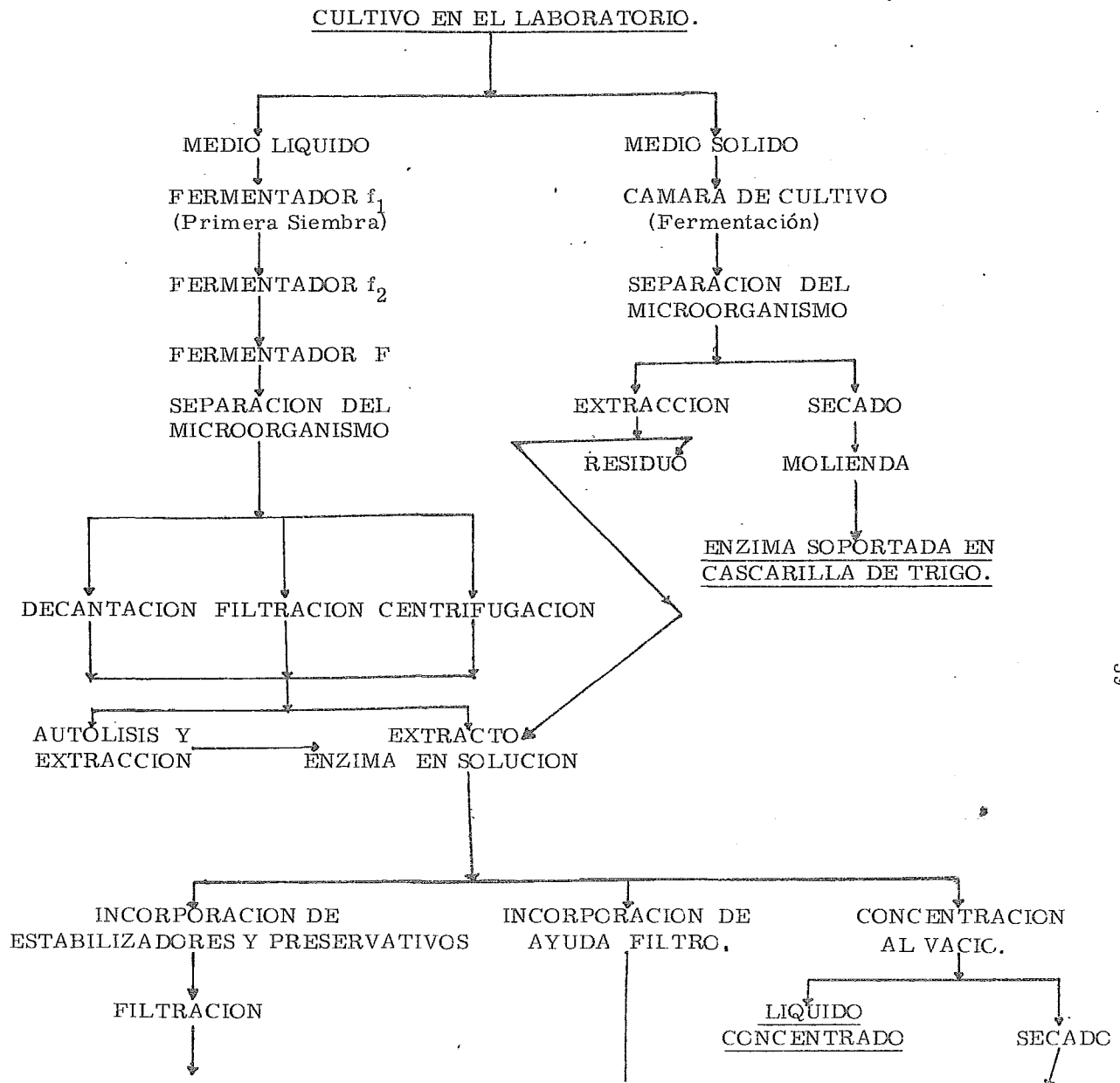
Tabla II. 2. AGENTES PRECIPITANTES.

Acetona	Gelatina
Sulfato de amonio	2-Propanol
Caseína	Lactosa
Tierras diatomáceas	Metanol
Fosfato disódico	Sulfato de sodio
Acetato de etilo	Almidón
Alcohol etílico	

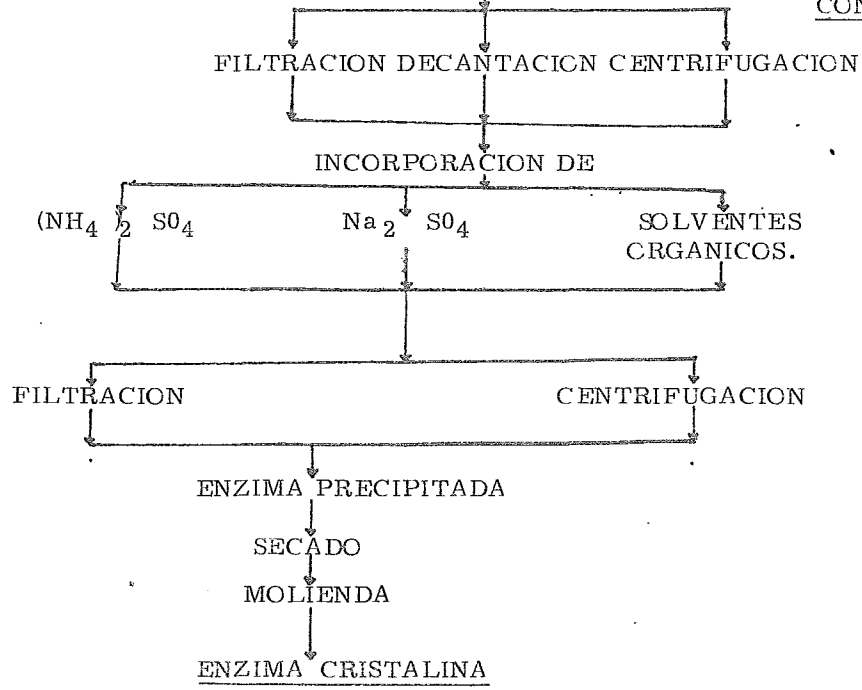
10. - Secado y Molienda.

La torta se seca a presión atmosférica o al vacío, a baja - temperatura. Después que todas las trazas de solvente han sido removidas el producto se muele a un tamaño de partícula adecuado y se emplea en la formulación de la enzima.

I. 1 DIAGRAMA GENERAL PARA LA PRODUCCION DE UNA ENZIMA :



ENZIMA
CONCENTRADA



I I. SELECCION DEL PROCESO.

Para la selección del proceso se toman en cuenta los siguientes criterios:

- a) Técnico
- b) Económico.
- c) Facilidad de operación.

En los diversos procesos, así como, en sus diferentes etapas se debe buscar el máximo equilibrio entre los criterios antes mencionados. El proceso óptimo es aquel que satisface lo mejor posible estos criterios; es decir, que la factibilidad técnica debe estar aunada a la accesibilidad económica, así como, a la facilidad de operación.

Del diagrama general de producción de enzimas, se hace una selección primaria en base al medio de cultivo.

Dentro de las consideraciones que podríamos catalogar como técnicas está el de la facilidad de difusión de oxígeno y dióxido de carbono en el medio, presentándose una mayor difusión en un medio líquido que en un sólido. Este factor es de gran importancia ya que una mayor o menor difusión del oxígeno influye en el crecimiento del microorganismo.

La disponibilidad de materia prima, así como el costo de ésta, caen dentro de los factores económicos considerados para la selección del medio. Los ingredientes más comunes en un medio líquido son: agua destilada, fosfatos de potasio o sodio, nitrato de potasio, sales de amonio, glucosa o sacarosa, productos de desecho del molido de harina, licor de fécula de maíz y extracto de levadura. El medio sólido está constituido generalmente por: agar, sulfatos de potasio y amonio, fosfatos de amonio y potasio, licor de fécula de maíz, extracto de levadura, subproductos del molido de cereales y harinas, peptona y urea. La composición del medio líquido es muy similar a la del sólido excepto en su componente más abundante, que en el medio líquido es agua y en el medio sólido es agar agar. La diferencia de costos es evidente por lo que en la industria se prefiere el medio líquido.

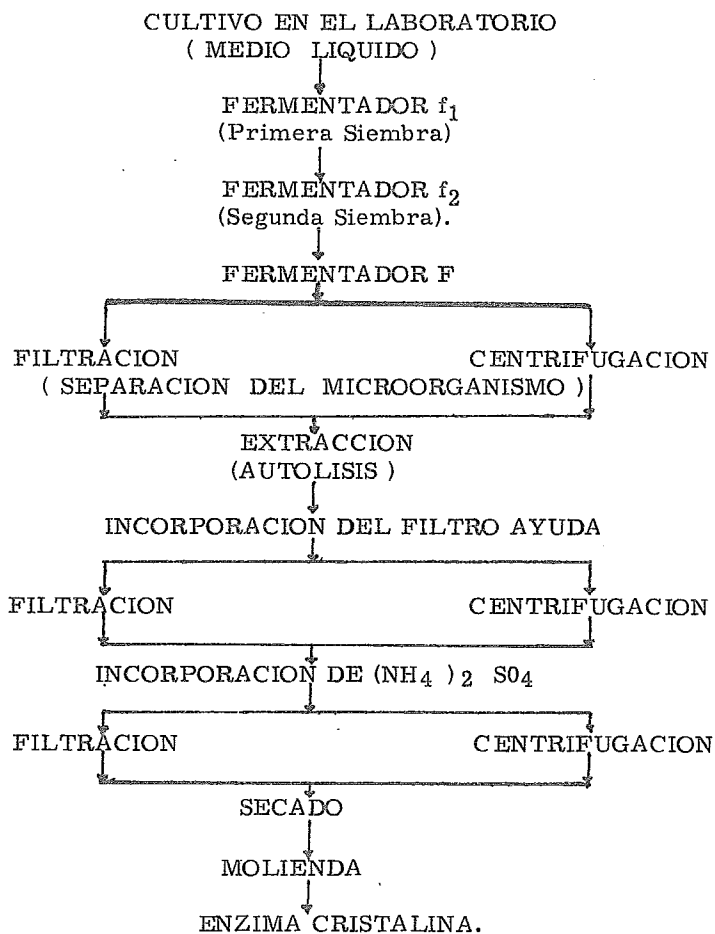
En cualquier proceso se prefiere utilizar los materiales líquidos sobre los sólidos, debido a su facilidad de manejo.

Las fermentaciones en medio líquido se efectúan en tanques cerrados y en el medio semisólido se efectúan en tambores rotatorios o en cámaras con charolas. Es claro que en el tanque fermentador es de más fácil manejo.

En esta parte del desarrollo del proceso se puede efectuar -

también la selección del agente precipitante. Se selecciona el sulfato de amonio como precipitante ya que presenta una mayor solubilidad y produce una máxima precipitación de la enzima (11).

En base a las consideraciones anteriores se determinó el proceso que se presenta en la figura II. 1.

II. 1. Diagrama del Proceso Seleccionado.

III. ANALISIS DE LAS VARIABLES DE PROCESO.

Las variables consideradas en la producción de glucosa oxidasa son las siguientes:

1. Microorganismo
2. Regimen de flujo.
3. Medio de Cultivo.
4. Aereación y Agitación.
5. Espumación.
6. Potencial de Hidrógeno (pH).
7. Presión.
8. Temperatura.

1. Microorganismo.

La glucosa oxidasa se produce industrialmente a partir de los siguientes microorganismos: *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* y *Penicillium amagasakiense* (9).

La enzima producida a partir de *A. Niger* es del tipo intracelular, no así la obtenida a partir de las especies *Penicillium*, la cual es extracelular (7).

Cuando la enzima es extracelular se le encuentra en el medio de cultivo y no es necesario el paso de extracción puesto que la solución se separa de los microorganismos por filtración o centrifugación. Cuando la enzima es intracelular se obtiene por la ruptura de la pared celular ya sea por medio mecánico o por autólisis natural o inducida.

Durante el ciclo de fermentación la actividad enzimática presenta una distribución Gaussiana en la cual la autólisis natural se localiza después del máximo de la curva (24, 25) y, por ende, su actividad es menor a la actividad máxima. Por esto es preferible inducir la ruptura de la pared celular cuando la actividad enzimática es máxima. En la autólisis inducida se deja crecer al microorganismo hasta obtener la mayor actividad enzimática, se regula el pH en el cual la enzima es estable y se incrementa la temperatura para aumentar la velocidad de ruptura. Previo al incremento de temperatura se adicionan agentes químicos que condicionan la autólisis. Algunos de estos agentes son: cloruro de calcio, cloruro de sodio, azúcares, glicerol, ácido láctico, ácido fosfórico, ácido Clorhídrico, ácido sulfúrico, hidróxido de Potasio e hidróxido de amonio (21).

Puede suponerse, en principio, que las especies *Penicillium* son ideales para la producción de la enzima debido a que ésta se en-

cuentra en el licor libre y puede eliminarse un posible proceso de extracción. Sin embargo, el *A. Niger* puede tolerar altas concentraciones osmóticas así como mayores temperaturas que las especies *Penicillium* (26).

La selección del *A. niger* como fuente de producción de la glucosa oxidasa se ve favorecida por el hecho de que la enzima obtenida a partir de éste presenta mejores propiedades que las obtenidas de las especies *Penicillium*. A continuación se presenta una tabla de propiedades (9).

<u>Propiedad</u>	<u>A. niger.</u>	Fuente de la enzima <u>P. amag.</u>	<u>P. not.</u>
máx. (nm)	278, 383, 452	278, 380, 460	275, 377, 455
Inhibición	nula	90% con 10^{-5} M	-
mercúrica		de $HgCl_2$ o p-Clomercuribenzoato	
K_m glucosa, en aire, catalasa presente, pH - de 5.6)	0.33 M a 25°C.	0.015 M a 30°C.	0.0096 M a 20°C.
Coef. de sedimentación ($S_{20,w}$)	8.00	7.93	8.27
Difusividad (cm^2/seg)	4.12×10^{-7}	5.02×10^{-7}	5.13×10^{-7}
Peso molecular	186 000	154 000	152 000
Actividad específica std. a 25°C (M/min mg) base seca	80	77	64

Condiciones: la concentración de glucosa se considera infinita; la concentración de oxígeno es igual a 0.25 mM; se tiene un exceso de catalasa; se mantiene el pH igual a 5.6 con una sola solución reguladora a base de fosfatos.

Otra característica importante de la glucosa oxidasa de *Aspergillus* es que presenta una mayor actividad sobre varios azúcares en relación a las especies *Penicillium*.

<u>Sustrato</u>	<u>Fuente de la enzima</u>		
	<u>A. niger.</u>	<u>P. amag.</u>	<u>P. not.</u>
Glucosa	100.00	100.00	100.00
2-Deoxi-D-Glucosa.	3.30	-	-
Manosa	0.90	-	1.00
Galactosa	0.55	-	0.14

(Medidas en actividad relativa)

Existen algunas sustancias que a elevadas concentraciones actúan sobre el microorganismo, inhibiéndolo. Los fungicidas que inhiben al *A. niger* son: fenol, ácido benzóico, hidroxibenzoatos, tiosemicarbazonas, arsenito de sodio y metil, etil, propil y butil parabenos (27).

Para propósitos analíticos es necesario seguir el curso de la fermentación mediante modelos matemáticos.

Un ciclo de fermentación a regimen discontinuo consta de - cuatro etapas (28), que son:

- a) Fase inicial: se inocula y se observa un incremento mínimo en el número de células.
- b) Fase logarítmica: en la que existe un crecimiento rápido y un incremento considerable en el número de células.
- c) Fase estacionaria: el nivel de las células no varía ya que éstas no se pueden multiplicar indefinidamente.
- d) Fase de muerte: el número de células decrece en forma exponencial.

En una fermentación la fase de crecimiento (logarítmica) es la más importante ya que ésta depende el tiempo de fermentación.

En el caso de la fermentación de mohos o de organismos filamentosos se ha encontrado que la velocidad de crecimiento se incrementa con diferente pendiente que en el caso general (crecimiento lo-garítmico) ya que se encontró que presenta una relación cúbica con el tiempo.

Extrapolando el crecimiento para una partícula esférica en un cultivo sumergido se asume:

$$dR/dt = k_g = \text{Constante} \dots \dots \dots (1).$$

R = radio de la partícula.

$$M = 4/3 \pi \rho R^3 \dots \dots \dots (2)$$

M = masa del microorganismo.

ρ = Densidad del microorganismo.

Combinando la ecuación (1) y (2) se obtiene:

$$dM/dt = 4 \pi \rho R^2 dR/dt = k_g 4 \pi \rho R^2 \dots \dots \dots (3)$$

De (2) y (3) se tiene:

$$dM/dt = \alpha M^{2/3} \dots \dots \dots (4).$$

$$\alpha = k_g (6 \pi^{1/2} / \rho)^{2/3} \dots \dots$$

Integrando (4).

$$M = (M_0^{1/3} + \alpha t)^3 \dots \dots \dots (5)$$

Donde M_0 es la masa inicial del microorganismo.

2. - Regimen de Flujo.

El regimen continuo se aplica a procesos físicos o reacciones químicas relativamente rápidas y a demandas elevadas del producto.

Por otra parte, algunos microorganismos, bajo condiciones de cultivo continuo desarrollan mutaciones bioquímicas y morfológicas, además, se presentan problemas físicos como la separación del micelio y la contaminación accidental. El rendimiento del producto en el cultivo continuo es comparativamente bajo en relación con el obtenido en un proceso discontinuo (17).

En el caso particular de la producción de glucosa oxidasa a partir de *A. niger*, se tiene que la velocidad de formación del producto es relativamente baja y la demanda no es muy elevada por lo que se prefiere el regimen discontinuo sobre el regimen continuo (24, 25).

El regimen discontinuo presenta ciertas ventajas adicionales tales como una instrumentación simple, un mínimo de personal técnico para su operación, costos de operación y mantenimiento bajos, flexibilidad y facilidad de operación

3. - Medio de Cultivo.

Los medios de cultivo más utilizados en las fermentaciones son: líquido y semisólido (agar en placas, agar inclinado o suero gelificado) (23).

En la producción de glucosa oxidasa a partir de *A. niger* se utiliza el medio líquido (cultivo sumergido), debido a que la difusión - del oxígeno y la del dióxido de carbono, (para su eliminación) son mayores que en un medio semisólido.

Por lo general la elección del sustrato depende del nutriente, de su disponibilidad y precio. En la industria han de vencerse grandes dificultades para hacer uso de materias primas baratas y de ser posible se eligen aquellas que contengan no sólo los carbohidratos precisos sino también otros factores de crecimiento, por ejemplo, un producto de desecho como es la cascarilla de maíz obtenido del macerado de - maíz antes de convertirlo en harina y el jarabe de dextrina, que son excelentes medios de cultivo (17).

La composición exacta de los medios empleados varían de un fabricante a otro.

En la tabla I I I. 1. se presenta la formulación de cultivo - (24, 25).

Tabla I I I. 1. MEDIO DE CULTIVO.

<u>Substancia:</u>	<u>Porcentaje:</u>
Sacarosa	5.000
Nitrato de calcio	0.200
Acido Cítrico.	0.750
Fosfato monopotásico	0.025
Cloruro de potasio	0.025
Sulfato de Magnesio	0.025
Cloruro Férrico	0.001
Licor de cáscara de maíz.	2.000
Agua destilada.	91.974

Dos elementos indispensables en todos los medios de cultivo son el fósforo y el nitrógeno (17). El fósforo juega un papel esencial en los mecanismos de transferencia de energía (42) la mayoría de los microorganismos pueden utilizarlo directamente en forma de sales - inorgánicas y suele incorporarse como sal potásica o amónica. El nitrógeno es un componente específico de las proteínas y debe suminis - trarse siempre que se requiera un proceso de multiplicación, algunos microorganismos pueden asimilarlo como ión amonio y otros como nitrato.

4. - Aereación y Agitación.

La transferencia de oxígeno y la agitación son importantes en el mantenimiento de un medio ambiente deseable para el crecimiento micelar y la producción de la enzima en cultivos sumergidos (29). El diseño de tanques fermentadores y el establecimiento de condiciones de fermentación óptimas dependen sobre todo de la elección apropiada de las variables de control. El problema de suministrar oxígeno adecuadamente al fermentador, surge debido al límite de solubilidad de éste en agua. La solubilidad del oxígeno puro en agua pura es de 48ppm a 14°C y la del aire en agua saturada es de sólo 10 ppm a las mismas condiciones (17).

El oxígeno suministrado para el crecimiento micelar en las fermentaciones industriales se surte por la difusión de burbujas de aire que ascienden a través del medio. El aire se introduce usualmente mediante dispersores colocados cerca del fondo del fermentador. En el fermentador se encuentran presentes tres fases : gas, líquido y sólidos suspendidos.

Teoría relativa al transporte de masa (17). Teniendo en cuenta que las características de difusión varían de punto a punto en

una burbuja, por ejemplo, la parte de enfrente al ascender por el medio estará sometida a un intenso frotamiento y mostrará una mayor facilidad para la transferencia de masa.

Existen tres teorías principales:

1. Teoría laminar de Whitman. En la que supone que la transferencia de masa viene regida por la difusión molecular a través de una película estacionaria de espesor lo suficientemente pequeño para que la difusión alcance el estado estacionario.

2. Teoría de Higbie o de la renovación superficial sistemática. Se aplica al transporte a través de una película que desciende a lo largo de una torre empecada.

3. Teoría de Danckwerts o de renovación irregular de la superficie (30). No establece relación alguna entre el tiempo de exposición y la probabilidad de mezcla.

ecuaciones

Whitman $R = (C_s - C_b) D/x_1 \dots\dots\dots(6)$

Higbie $R = (C_s - C_b) 2 (D/\theta)^{1/2} \dots\dots\dots(7)$

Danckwerts $R = (C_s - C_b) (Ds)^{1/2} \dots\dots\dots(8)$

$$k_1 = (Ds)^{1/2}$$

R = Velocidad de difusión (g/seg), C_b = Conc. del gas en el líq.

C_s = Concentración de gas disuelto en la superficie.

D = Difusibilidad.

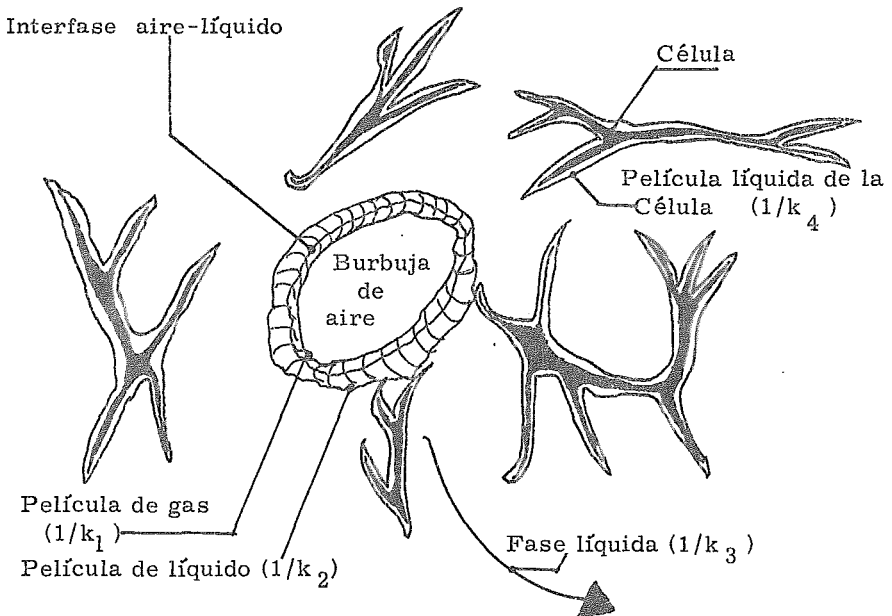
x_1 = Espesor de la película estacionaria.

θ = Tiempo de exposición en la superficie.

s = Velocidad de renovación superficial.

k_1 = Coeficiente de difusión.

Teoría de Absorción de Oxígeno. - La transferencia de oxígeno desde el gas al microorganismo se divide en una serie de pasos; que se ilustran en el siguiente esquema (29).



La resistencia total entre la burbuja de gas y la pared de la célula se describe como la suma de las resistencias individuales.

$$1/k_0 = 1/k_1 + 1/k_2 + 1/k_3 + 1/k_4 \dots \dots \dots (9)$$

- k_1 = Conductancia de la película de gas a la interfase aire-líquido
- k_2 = Conductancia de la película líquida a la interfase aire-líquido
- k_3 = Conductancia de la fase líquida.
- k_4 = Conductancia de la película líquida a la superficie adyacente a la célula.

Se define $1/k_2 = 1/k_d$. $1/k_d$ representa a la resistencia a la difusión, desde las burbujas de gas a la otra interfase. La constante de transferencia del oxígeno a través de los agregados celulares y a través de la película del líquido a la pared de la célula es $1/k'_d$.

La ecuación de velocidad para la difusión es la siguiente:

$$r_d = k_d (p - p') = k'_d (p' - p_c) \dots \dots \dots (10)$$

- r_d = Velocidad de absorción del oxígeno (gmol O_2 /ml hr).
- k_d = Coeficiente de difusión entre el intervalo de presiones p a p' (gmol O_2 /ml hr atm).

k'_d = Coeficiente de difusión entre el intervalo de presiones p' a p_c ($\text{gmol } O_2 / \text{ml hr atm}$).

p = Presión parcial del oxígeno en la corriente gaseosa (atm).

p' = Presión parcial del oxígeno en equilibrio con la solución.

p = Presión parcial del oxígeno en equilibrio con el oxígeno en solución en la superficie celular (atm).

La velocidad de absorción del oxígeno está expresada por:

$$r_r = k_r C_M \dots\dots\dots (11).$$

r_r = Velocidad de absorción del oxígeno ($\text{gmol } O_2 / \text{ml hr}$).

k_r = Coeficiente de absorción específico del microorganismo - ($\text{gmol } O_2 / \text{g micelio hr}$).

C_M = Concentración de micelio a cualquier tiempo (g micelio/ml).

El valor de k_r es constante en pequeños intervalos de tiempo a lo largo de la fermentación, pero, estos cambios dependen de la edad de las células y de la variación de las condiciones del ciclo.

La expresión final que representa el ciclo micelar de crecimiento en pequeños intervalos de tiempo se puede considerar a condiciones contínuas, esto es:

$$r_r = r_d \dots\dots\dots (12)$$

El balance de masa se expresa como:

$$r_d = G (C_i - C_o) / P V \dots \dots \dots (13)$$

Durante el crecimiento las velocidades de difusión y absorción del oxígeno están relacionadas. Para tanques fermentadores se pueden interrelacionar las variables que se muestran en las ecuaciones (10, 11, 12 y 13), integrándolas, tenemos como resultado la siguiente solución:

$$k_r = \frac{2 G H (C_i - C')}{P V C_M (2G / V P k_d + 1)} \dots \dots \dots (14)$$

- H = Constante de Henry (atm ml/gmol O₂).
- C' = Concentración promedio de O₂ en cualquier punto (gmol O₂/ml).
- C_i = Concentración de saturación de O₂ en el líquido (gmol O₂/ml).
P_i = H C_i
- G = Gmol totales de gas/hr (valor constante).
- V = Volumen del Fermentador.
- P = Presión total promedio (atm).

El coeficiente de difusión se determina por titulación (con solución de tiosulfato de sodio).

$$k_d = \frac{n (R_2 - R_1)}{mvP_i (C_i - C')/C_i (\theta_2 - \theta_1)} \dots\dots\dots (15)$$

n = Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

R₁ y R₂ = Volumen de titulante a θ_1 y θ_2 (ml).

v = Volumen de la muestra (ml).

C_i = Concentración de saturación del O₂ en la muestra (gmol O₂/ml).

C' = Concentración corregida del O₂ en la muestra (gmol O₂/ml).

P_i = Presión parcial del O₂ en la corriente (atm).

m = 4x10³ miliequivalentes/gmol O₂.

θ = Tiempo (hr).

Agitación.

La agitación del medio en el fermentador se produce por medios mecánicos y por la ascensión de las burbujas de aire a través de la unidad. La agitación mecánica se suministra por propelas rotatorias, por turbinas o por dispositivos similares (17, 31).

La ecuación de White para el consumo de potencia en un tanque agitado mecánicamente es:

$$HP = K N^3 D^5 (D^2 N \rho / \mu)^n \dots\dots\dots (16)$$

HP = Potencia

K y n = Constantes.

ρ = Densidad del líquido

N = Velocidad del impulsor.

D = Diámetro del impulsor.

μ = Viscosidad del líquido.

Para tanques con mamparas, a regimen turbulento, $n = 0$ y queda la siguiente ecuación:

$$HP = K \rho N^3 D^5 \dots \dots \dots (17)$$

Para tanques sin mamparas, a regimen turbulento, $n = 0$ y queda la siguiente ecuación:

$$HP = K \rho^{0.85} N^{2.85} D^{4.7} \mu^{0.15} \dots \dots \dots (18)$$

El aire que pasa a través del fermentador efectúa un trabajo sobre el líquido, éste puede calcularse por el teorema de Bernoulli.

$$X_1 + P_1 V_1 + u_1^2 / 2g_c + \int_1^2 P dV = X_2 + P_2 V_2 + u_2^2 / 2g_c + W \dots \dots (19).$$

Para un gas ideal se tiene:

$$P_1 V_1 - P_2 V_2 = 0$$

$$X_1 - X_2 = 0$$

$$u_2^2 / 2g_c = 0$$

Integrando la ecuación (19), tenemos:

$$W = u_1^2 / 2g_c + RT \ln P_1 / P_2 \dots\dots\dots (20)$$

u_1 = Velocidad lineal del gas a la entrada (ft/seg).

g_c = 32.2 ft/seg².

R = Constante de los gases.

T = Temperatura.

P_1 = Presión absoluta a la entrada (atm).

P_2 = Presión del fermentador (atm).

W = Trabajo mecánico dado por el aire al líquido.

La aereación y la agitación en la producción de glucosa oxidasa en cultivos sumergidos son muy importantes ya que de estos factores depende el crecimiento del microorganismo, así como la formación de la enzima. La aereación de un cultivo influye en su crecimiento, debido a que suministra el oxígeno requerido durante la fermentación, y al mismo tiempo remueve los productos de desecho. La eficiencia de la aereación depende fundamentalmente de la velocidad de agitación, tamaño de la burbuja, tipo de dispersión, velocidad del aire, y propiedades físicas de la fase líquida como viscosidad, densidad y tensión superficial. Con la agitación también se disminuye el tamaño de los agregados micelares, facilitando el acceso del oxígeno a la célula.

En experimentos realizados se encontró que a un incremento de la velocidad de agitación corresponde una mayor concentración del oxígeno disuelto, dando como resultado un aumento en la velocidad de crecimiento, así como una mayor producción de la enzima (24).

En las tablas siguientes se presentan datos a escala semi-industrial, que denotan la influencia de la velocidad de agitación sobre la actividad glucosa oxidasa y sobre la velocidad de crecimiento del *A. niger*.

Tabla I I I. 2. Actividad de la Glucosa oxidasa (SU/g) contra tiempo a diferentes velocidades de agitación.

<u>Tiempo (hr)</u>	<u>153 RPM</u>	<u>230 RPM</u>	<u>306 RPM.</u>
4	300	-	305
8	330	400	1 000
12	710	735	1 220
16	530	1 220	1 280
20	280	1 180	1 330
24	650	1 180	920
28	280	1 110	830
32	195	1 130	505
36	28	975	780
40	150	750	750

Tabla III. 3. Concentración de A. niger (% de micelio seco) contra tiempo, a diferentes velocidades de agitación.

<u>Tiempo (hr)</u>	<u>153 RPM</u>	<u>230 RPM</u>	<u>306 RPM.</u>
4	0.167	0.222	0.222
8	0.250	0.361	0.361
12	0.792	0.542	0.903
16	1.000	1.194	1.250
20	1.099	1.389	1.556
24	0.958	1.333	1.250
28	1.222	1.528	2.250
32	1.250	1.889	2.417
36	1.195	1.778	2.417
40	1.125	2.139	2.000

Tabla III. 4. Actividad total de Glucosa oxidasa (SU/100 ml) contra tiempo, a diferentes velocidades de agitación.

<u>Tiempo (hr)</u>	<u>153 RPM</u>	<u>230 RPM.</u>	<u>306 RPM.</u>
4	80	140	80
8	250	250	320
12	540	390	1 110
16	530	1 470	1 560
20	320	1 670	2 000
24	610	1 560	1 150
28	320	1 695	2 000
32	235	1 890	2 075
36	30	1 695	1 930
40	140	1 540	1 360

El suministro de oxígeno al medio, puede ser con aire o con oxígeno puro, esto repercute en la actividad de la glucosa oxidasa, - siendo mayor en los cultivos oxigenados (24). No obstante obtenerse mejores resultados con la oxigenación que con la aereación, se prefiere ésta industrialmente, debido a que la oxigenación incrementa notablemente los costos.

5. Espumación.

La espuma se presenta en sistemas coloidales. El sistema está compuesto por una fase dispersa y un medio de dispersión; el tamaño de las partículas que forman estos sistemas se encuentran entre 10^{-7} y 10^{-5} cm (32).

Debido al contacto entre la fase líquida y el gas, se presentan fenómenos en la interfase que se caracterizan por una relación alta de superficie/volumen. La variable principal que afecta a este fenómeno, es la tensión superficial (γ), que es la fuerza que tiende a hacer que el líquido asuma un estado de mínima energía.

Una burbuja es un líquido hace que la tensión superficial - produzca una diferencia de presión, Δp , en toda la superficie curva. Se puede evaluar el trabajo que se efectúa para formarla a una pre -

sión P del gas para una burbuja de radio r en equilibrio con el líquido. Para tener un aumento de volumen en la burbuja dV , debe efectuarse un trabajo $W = (\Delta P \, dV)$, este trabajo es igual al aumento de energía de superficie $W = \gamma \, dA$. Igualando los dos trabajos queda:

$$\Delta P \, dV = \gamma \, dA \dots \dots \dots (21)$$

Para una esfera:

$$A = 4/3 \pi r^2$$

$$V = 4/3 \pi r^3$$

Substituyendo A y V en (21), y diferenciando, se obtiene:

$$\gamma (8 \pi r \, dr) = \Delta P (4 \pi r^2 \, dr) \dots \dots \dots (22)$$

$$\Delta P = 2 \gamma / r \dots \dots \dots (23)$$

Para evitar la espumación se aplica un agente antiespumante, el cual provoca una disminución en la tensión superficial. Analizando la ecuación (23), se observa que al disminuir la tensión superficial, disminuye el radio de la burbuja para una misma ΔP . Esto -

favorece a los fenómenos de difusión ya que al tener las burbujas un radio menor se obtiene una mayor superficie por unidad de volumen.

La espumación es producida por la agitación y el burbujeo del aire en el cultivo. La espumación es un fenómeno indeseable debido a que disminuye la difusión del oxígeno en el medio.

La espuma se puede eliminar por destrucción mecánica o mediante un agente antiespumante. El dispositivo mecánico puede ser una simple pala. Los agentes antiespumantes de mayor uso en el caso de cultivos de *A. niger* se muestran en la siguiente tabla (33).

<u>Polimero</u>	<u>tipo</u>	(μ/μ_0)	(σ/σ_0)	(ρ_f/ρ_i)
Polyhall	Poliacrilamida	1.48	0.90	0.66
Reten-205	Poliacrilamida	1.39	1.00	0.93
Separon	Poliacrilamida	2.78	0.89	0.58
Carbowax-400	Polietilenglicol	2.04	0.88	1.20
Elvanol	Alcohol polivinilico	1.85	0.91	1.25
Polyox-205	Oxido de Polietileno	0.37	0.97	1.00
Jaguar	Poliglicóxido	0.85	0.96	0.32
Carbopol-934	Carboxipolimetileno	2.65	0.91	1.21
Reten A-1	Poliacrilato	1.69	0.94	1.22
Goodrite K714	Poliacrilato	2.10	0.98	1.03

' concentración de los polímeros: 3 g/l.

μ = Velocidad máxima de crecimiento específico.

μ_0 = Velocidad de crecimiento en la incubación.

σ = Tensión superficial del medio celular.

σ_0 = Tensión superficial del medio.

η_f = Viscosidad aparente del medio celular al final de la fermentación.

η_i = Viscosidad aparente del medio celular al inicio de la fermentación.

De los polimeros anteriores se ha estudiado el carbopol y se encontró que mejora las velocidades de respiración de *A. niger*, tanto como un 200%, pues influye sobre el agrupamiento de las esporas y - agregados micelares. En el agrupamiento de esporas los grupos carboxílicos del carbopol son ionizados e inducen repulsiones electrostáticas entre las esporas que se encuentran en el medio de crecimiento e incrementan el area interfacial de contacto entre el hongo y el medio - nutriente. En los agregados micelares el carbopol forma una película delgada que se fija en la superficie y es responsable del incremento de la velocidad de transporte del potasio por lo que aumenta el rendimiento de la fermentación.

La característica principal del carbopol es que no produce cambios fisiológicos al cultivo.

6. Potencial de Hidrógeno (pH).

Los microorganismos siguen la misma línea general de -
mostrar una velocidad máxima de crecimiento en un intervalo limita-
do de pH, con inactivación completa o muerte en cualquiera de los -
extremos. Generalmente el valor óptimo se encuentra entre un pH -
de 4.5 a 7.0. Sin embargo no se debe entender que todo el proceso
debe realizarse al nivel de crecimiento óptimo, sino que, como en el
caso de la temperatura se tienen dos fases: la fase de crecimiento y
la fase de formación y liberación del producto, las cuales se llevan a
cabo a potenciales de hidrógeno diferentes (17).

En el caso de la producción de glucosa oxidasa, como en ca-
si todas las fermentaciones, es difícil mantener el pH constante ya -
que el proceso genera dióxido de carbono y diversos ácidos orgánicos.

7. Presión.

Siendo la presión una medida de la concentración del oxíge-
no en el medio, al incrementarla se aumenta la solubilidad del oxíge-
no en el cultivo; esta variación influye en la síntesis rápida de la en-
zima y en la velocidad de crecimiento grande para la primera etapa -
de la fermentación, aumentando la calidad del producto. (25).

En los datos siguientes, obtenidos a escala semi-industrial, se advierte el efecto del aumento de la presión en la actividad de la - GOD y en la velocidad de crecimiento del *A. niger*.

Tabla III. 5. Actividad de la glucosa oxidasa (SU/g) contra tiempo, a dos presiones diferentes y una velocidad de agitación de 306RPM.

<u>Tiempo (hr)</u>	<u>P = 1 atm.</u>	<u>P = 2 atm.</u>
4	305	580
8	1 000	1 220
12	1 220	1 445
16	1 280	1 670
20	1 330	970
24	920	860
28	830	860
32	505	500
36	780	140
40	750	80

Tabla III. 6. Concentración de A. niger (% de micelio seco) contra tiempo, a dos presiones diferentes y una velocidad de agitación de 306 R.P.M.

<u>Tiempo (hr)</u>	<u>P = 1 atm.</u>	<u>P = 2 atm.</u>
4	0.222	0.111
8	0.361	0.167
12	0.903	0.667
16	1.250	1.250
20	1.556	1.472
24	1.250	2.250
28	2.250	2.000
32	2.417	2.194
36	2.417	2.167
40	2.000	2.000

Tabla III. 7. Actividad total de glucosa oxidasa (SU/100 ml) contra - tiempo, a dos presiones diferentes y a una velocidad de agitación de 306 RPM.

<u>Tiempo (hr)</u>	<u>P = 1 atm.</u>	<u>P = 2 atm.</u>
4	80	55
8	320	220
12	1 110	1 085
16	1 560	2 250
20	2 000	1 920
24	1 150	2 000
28	2 000	1 860
32	2 075	1 110
36	1 930	280
40	1 360	195

8. - Temperatura.

La temperatura de operación influye en el metabolismo del microorganismo ya que la velocidad de un proceso enzimático es función de la temperatura. Esto sin embargo, se verifica en un estrecho intervalo de temperaturas, pues, la velocidad disminuye al aproximarse a la temperatura de inactivación del microorganismo (17).

En las fermentaciones industriales es ventajoso un crecimiento rápido, el que se logra aproximadamente a 28° C en el caso de *A. niger*, pero esta temperatura no es constante a lo largo del proceso ya que existe una fase de crecimiento que se lleva a esta temperatura y otra de formación y liberación del producto que se efectúa a una temperatura mayor. La influencia de la temperatura en el crecimiento de los microorganismos se debe a la relación que tiene ésta con los procesos energéticos de su metabolismo (25).

IV. SELECCION DE LOS SISTEMAS DE SEPARACION.

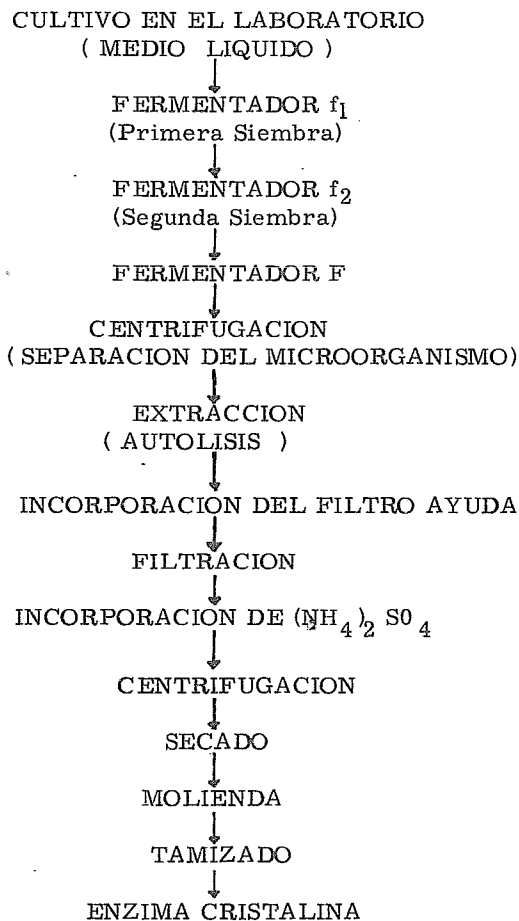
En este punto de la síntesis del proceso es necesario desarrollar la secuencia de las separaciones físicas que se llevan a cabo. En cada parte del proceso en que los materiales van a ser separados es necesario tener datos de propiedades físicas y químicas de los elementos a separar; estos datos incluyen, entre otros, tamaño de partícula, densidad, fase, adsorción en superficies y solubilidad en distintos solventes (35). La diferencia de estas propiedades debe ser explotada en la selección de los sistemas de separación; se deben utilizar las propiedades que presenten un mayor gradiente, siempre y cuando sea económicamente factible.

En el diagrama de proceso II. 1. se presentan tres etapas de separación en las que se tienen sólo dos alternativas; filtración y centrifugación. Se trata de separaciones simples, en las cuales se aprovecha la diferencia en el tamaño de partícula.

La primera separación es la del microorganismo del medio, una vez finalizada la fermentación. En esta separación el producto deseado es el microorganismo, debido a esto se prefiere el empleo de una centrífuga, ya que en caso de un filtro se incorporaría a la masa un agente extraño (filtro ayuda).

La segunda separación se efectúa después de realizada la extracción. Ahora el producto deseado es el extracto y resulta conveniente el empleo de un filtro.

En la última etapa de separación se obtiene la enzima ya cristalizada. Dada esta situación no es conveniente mezclarla con contaminantes, como sucedería en el caso de una filtración, prefiriéndose sobre ésta la centrifugación.

IV.1. Diagrama del Proceso.

V. INTEGRACION DE FUNCIONES.

En esta parte del proceso se debe visualizar la posibilidad de disminuir el número de etapas de éste. Esta disminución se refleja necesariamente en una reducción en el consumo de energía y en el costo de equipos (35).

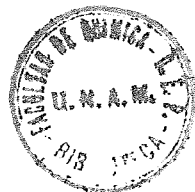
Lo que denominamos integración de funciones no es otra cosa que la factibilidad de efectuar dos o más operaciones en un mismo equipo o etapa del proceso, ya sean operaciones del proceso mismo, o bien actividades auxiliares.

Analizando el diagrama IV. 1. para la fabricación de la glucosa oxidasa bajo el principio de integración de funciones se pueden visualizar una serie de simplificaciones. En el tanque fermentador no sólo puede efectuarse la fermentación, sino que, se pueden llevar a cabo la extracción y la clarificación. Esto se debe a que tanto para la extracción como para la clarificación sólo es necesaria la adición de agentes que inducen la autólisis para la extracción y de agentes clarificantes.

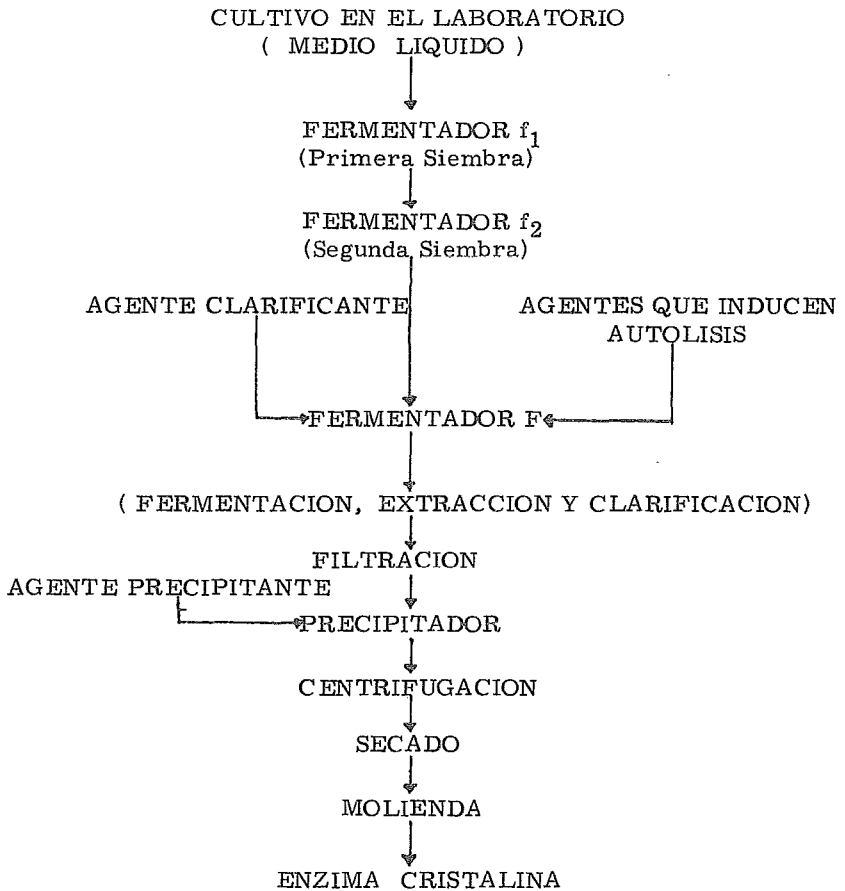
DESCRIPCION DEL PROCESO.

En el laboratorio se inoculan 100 ml de medio con 4×10^8 esporas de *Aspergillus niger* y se mantienen en incubación durante - 24 hr a 28°C. Antes de alimentar al fermentador se efectúan dos ampliaciones del cultivo con una relación de 10 ml de pie de cultivo por - cada 100 ml de medio y en el fermentador se guarda la misma relación. Tanto el fermentador como las ampliaciones se mantienen a 28°C con - agitación y aereación adecuadas.

Se detiene la fermentación en el punto de actividad máxima - de la enzima; se ajusta el pH, se aumenta la temperatura y se añaden agentes químicos para inducir la autólisis de las células y se añaden - agentes clarificantes. Se lleva a cabo una filtración para separar el extracto de los desechos celulares. El extracto se transfiere a un tanque precipitador, la torta se lava con agua destilada y se desecha. Al extracto se le añaden agentes precipitadores ($(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$) y se centrifuga. El producto se seca y se muele.



V. 1. Diagrama de proceso para la fabricación de glucosa oxidasa.



VI. TECNICA DE OPERACION.

- 1) Para la primera, segunda siembra y la fermentación se debe esterilizar todos los equipos y conexiones con vapor de 15 psig durante 30 minutos (36), enfriándose hasta 25° C con aire.
- 2) El tanque con el medio se esteriliza con vapor de 15 psig durante 30 minutos. Se carga la primera siembra con medio esterilizado y se siembra como se indica en la descripción del proceso, se agita y se alimenta aire, manteniéndose la temperatura en 28° C aproximadamente 16 hr. (24).
- 3) Se pasa la masa del tanque de la primera siembra al de la segunda siembra, y se alimenta el medio esterilizado, con aereación y agitación constante durante aproximadamente 16 horas, manteniendo la temperatura en 28° C.
- 4) Se alimenta el medio esterilizado al fermentador y se pasa la carga del tanque de la segunda siembra, manteniéndose a 28° C, con aereación y agitación durante aproximadamente 16 horas.
- 5) Se ajusta el pH del fermentador a 5.6 con sosa cáustica, se agrega el agente autolítico (CaCl₂) y tierras diatomáceas (filtro ayuda y agente clarificante) con un aumento de tempe

ratura para acelerar la autólisis, con agitación constante.

- 6) Se filtra el producto del paso (5) y se lava la torta del filtro. El extracto se transfiere al tanque precipitador.
- 7) Se agrega el agente precipitante ($(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$) y se espera a que la enzima se sedimente.
- 8) Se centrifuga el producto de la precipitación, separando la enzima del extracto.
- 9) Se seca la enzima, y se muele.

DIAGRAMA DE BLOQUES

LABORATORIO
(pie de cultivo)

FERMENTACION
(extracción y
clarificación)

FILTRACION
Y LAVADO

PRECIPITACION

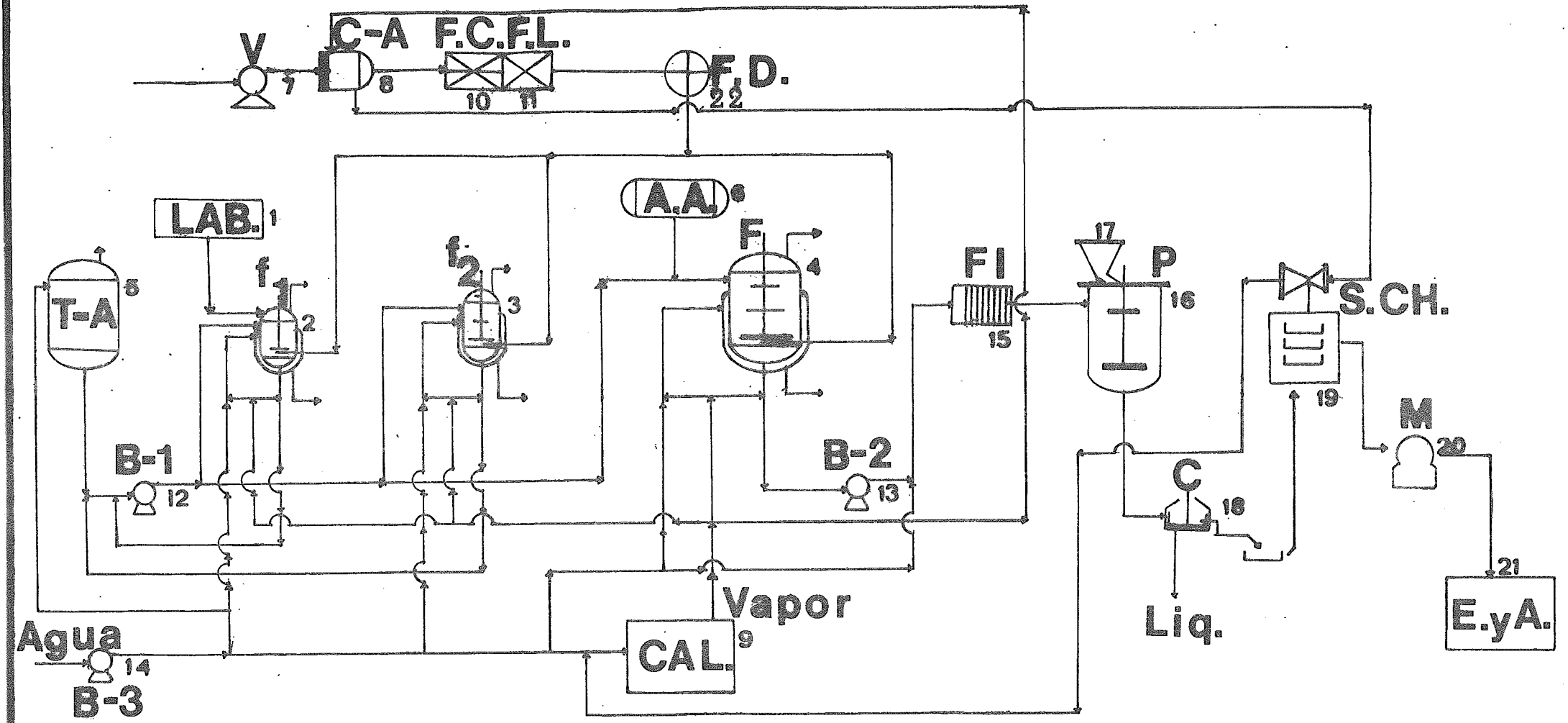
CENTRIFUGACION

SECADO
Y MOLIENDA

ENZIMA
(cristalina)



DIAGRAMA DE FLUJO



VII. DIAGRAMA DE FLUJO.

- 1) Laboratorio (LAB.).
- 2) Fermentador (f_1). Primera siembra.
- 3) Fermentador (f_2). Segunda siembra.
- 4) Fermentador (F). Fermentación, extracción y clarificación.
- 5) Tanque de almacenamiento del medio de cultivo (T-A).
- 6) Tanque de almacenamiento del agente autolítico (A.A.).
- 7) Ventilador (V).
- 8) Calentador de aire (C-A).
- 9) Caldera (CAL.).
- 10) Filtro de carbón activado (F.C.)
- 11) Filtro de lana de vidrio (F.L.)
- 12) Bomba (B-L).
- 13) Bomba (B-2)
- 14) Bomba (B-3).
- 15) Filtro de placas (FI).
- 16) Tanque precipitador (P).
- 17) Tolva.
- 18) Centrífuga (C).
- 19) Secador de charolas (S.CH.)
- 20) Molino de engranes (M).
- 21) Envasado y almacenamiento del producto.
- 22) Filtro diferencial.

III

EVALUACION ECONOMICA.

1. - Análisis de Mercado.

El mercado de las enzimas en México se está desarrollando debido al aumento y diversificación de sus usos. La GOD se usa actualmente en nuestro País en la producción de mayonesa y huevo en polvo (ver tabla III. 1), por lo que la cantidad importada es baja y su mercado lo cubre un sólo importador (ENMEX, S.A.) distribuyéndolo con el nombre de Dee0 que es un producto que tiene una actividad de 1 500 US/g, pero el mercado puede incrementarse en caso de promover su aplicación en otras áreas como conservador y agente antiséptico.

Tabla III. 1. Producción de mayonesa y huevo en polvo.

<u>Año.</u>	<u>Mayonesa (Ton)</u>	<u>Huevo en Polvo (Ton)</u>
1975	14 364	490
1976	9 074	338
1977	25 940	1 120
1978	36 800	1 480
1979	46 890	2 186

NOTA: Las cantidades usadas de GOD en estos productos es de --
75 000 US/ton para mayonesa y 225 000 US/ton para huevo en polvo.

La fracción arancelaria (39) es la 29.40-A 999 y fija los derechos aduanales como 950.00 pesos por kilogramo legal, siempre y cuando el valor del kilogramo legal, no exceda el precio señalado como máximo, en caso contrario se pagará el 60% sobre el valor de facturación.

En la tabla III. 2 se presentan los datos de importación y consumo aparente (basado en la producción de mayonesa y huevo en polvo) de la GOD en los últimos años (41).

Tabla III. 2. Importación y Consumo aparente de GOD.

<u>AÑO</u>	<u>IMPORTACION</u> (Ton)	<u>CONSUMO</u> (ton)
1975	0.78	0.79
1976	0.48	0.50
1977	1.44	1.47
1978	2.04	2.06
1979	2.46	2.67

La diferencia entre la importación y el consumo aparente es debido a que no todos los productores de mayonesa emplean este producto. Para la determinación de la capacidad se emplearán los datos de importación.

2. - Determinación de la Capacidad.

Se hará una estimación de la demanda a 5 años y se considerará la capacidad de la planta como aquella que satisfaga la demanda al quinto año.

La determinación de la capacidad de la planta se basa en el estudio de mercado efectuado en el punto anterior y descansa sobre la base de que cualquier proceso comercial está determinado por la oferta y la demanda. Se debe considerar, además, que el crecimiento de la demanda sigue la tendencia de los años precedentes.

Se emplea el método de mínimos cuadrados para determinar el comportamiento del consumo de GOD en función del tiempo; para hacer proyecciones a futuro.

La ecuación base de este método es :

$$S = (y - y_c)^2 \dots\dots\dots (21)$$

S = Desviación estandar.

y = Consumo corregido.

y_c = Consumo conocido

Considerando una tendencia lineal, se tiene:

$$y_c = a + b x \quad \dots\dots\dots (22)$$

x = Años

a y b = Constantes.

Aplicando el método en las ecuaciones (21) y (22) se obtiene:

$$\sum y_c = aN + b \sum x \quad \dots\dots\dots (23)$$

$$\sum x y_c = a \sum x + b \sum x^2 \quad \dots\dots\dots (24)$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones se obtiene :

$$a = \frac{\sum x \sum x y_c - \sum x^2 \sum y_c}{(\sum x)^2 - N \sum x^2} \quad \dots\dots\dots (25)$$

$$b = \frac{N \sum x y_c - \sum x \sum y_c}{N \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad \dots\dots\dots (26)$$

Tabla III. 3. Cálculo de las sumas.

<u>AÑO.</u>	<u>Producción (Ton/Año)</u>		
x	y _c	x ²	xy _c
1	0.78	1	0.78
2'	0.48	-	-
3	1.44	9	4.32
4	2.04	16	8.16
5	2.46	25	12.30

' Nota: El año de 1976 se eliminó.

$$\sum x = 13$$

$$(\sum x)^2 = 169$$

$$\sum y_c = 6.72$$

$$\sum x^2 = 51$$

$$\sum xy_c = 25.56$$

Substituyendo los valores de las sumas en las ecuaciones (25)

y (26), se obtiene :

$$a = 0.2983$$

$$b = 0.4251$$

Substituyendo a y b en (22), se obtiene la ecuación de comportamiento del consumo en función del tiempo.

$$y_c = 0.2983 + 0.4251 x \dots\dots\dots (27)$$

Ver gráfica III. 1.

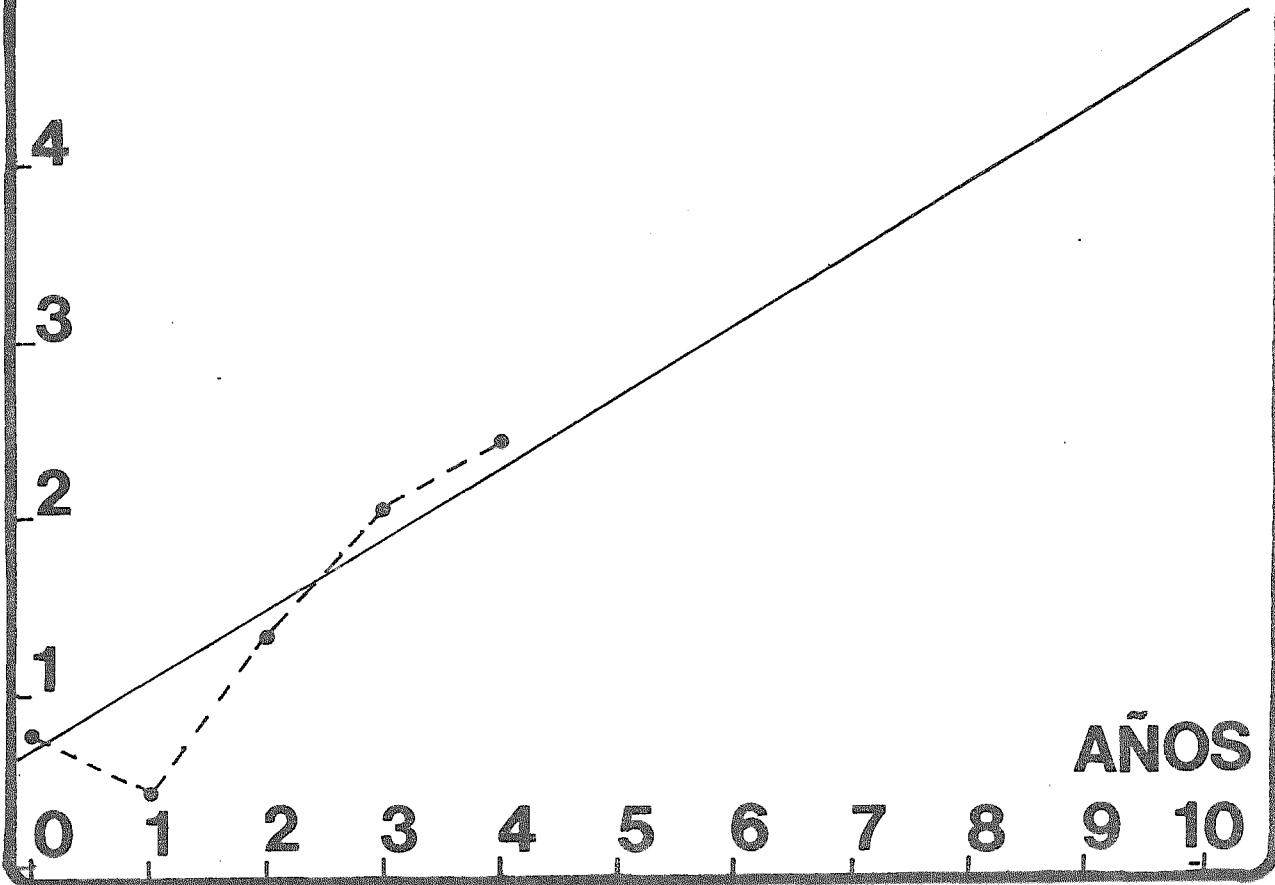
Para el año de 1985 ($x = 10$), de la ecuación (27) se ob - tiene:

$$y_c = 4.55 \text{ Ton. de GOD (1 500 US/g)}$$

Se fija la capacidad de la planta en 5 Ton. /año.

Grafica III.1: CONSUMO

5 TON. ENZIMA



I V

DISEÑO PRELIMINAR DE LA PLANTA.

1. BALANCES DE MATERIA Y ENERGIA.

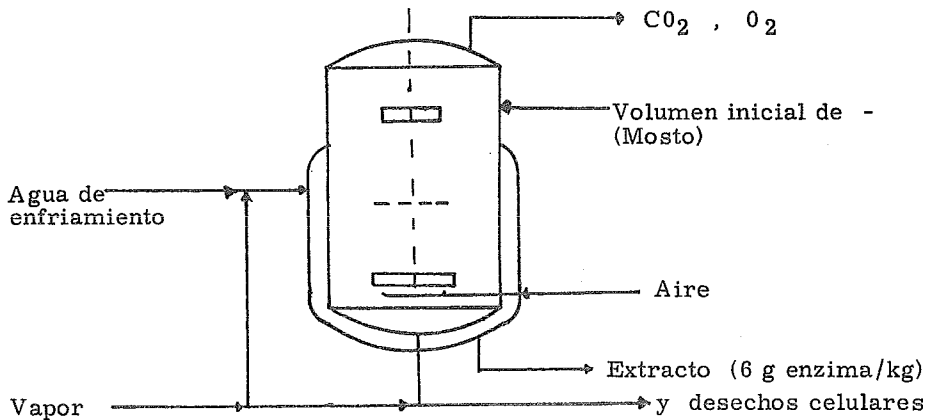
a) Balance de Materiales.

En el capítulo anterior se estableció la capacidad de la planta en 5000 kg/año.

Considerando 300 días hábiles al año, se tiene una producción diaria de 16.67 kg. de enzima.

La planta operará a regimen discontinuo con una sola corrida por día.

El balance se efectuará en la parte del proceso donde se cuenta con mayor información.



El balance se inicia después de efectuada la extracción, ya que se sabe que la eficiencia mínima del proceso es de 6 g de enzima - por kilogramo de extracto (9).

Cálculo de la masa de extracto.

$$M_{enzima} = 16\ 670\ \text{g/día.}$$

$$C_{enzima} = 6\ \text{g enzima/kg de extracto.}$$

$$M_{enzima} = M_{enzima} / C_{enzima}$$

$$M_{extracto} = \underline{2\ 778\ \text{kg extracto/día.}}$$

Debido a que en el fermentador no sólo se efectúa la fermentación, sino que, también la extracción, se debe considerar la masa de los desechos celulares; se fija como el 4% de los sólidos totales del fermentador (25). La masa de mosto calculada bajo estas condiciones será la correspondiente al final de la fermentación.

Cálculo de la masa final de mosto.

$$M_{mosto} = M_{extracto} + M_{desechos\ celulares.}$$

$$\% \text{ Desechos Celulares} = \frac{M_{desechos\ celulares}}{M_{desechos\ celulares} + M_{extracto}} \times 100$$

Substituyendo la masa de extracto y el por ciento de desechos celulares, se obtiene:

$$0.04 = \frac{M_{\text{desechos celulares}}}{2\,778 \text{ kg extracto/día} + M_{\text{desechos celulares}}}$$

$$M_{\text{desechos celulares}} = 115.8 \text{ kg/día}$$

$$M_{\text{mosto}} = 2\,778 \text{ kg extracto/día} + 115.8 \text{ kg desechos cel./día.}$$

$$M_{\text{mosto}} = 2\,893.8 \text{ kg/día.}$$

$$\rho_{\text{mosto}} = 1.15 \text{ kg/l (densidad)}$$

$$V_{\text{mosto}} = M_{\text{mosto}} / \rho_{\text{mosto}}$$

$$V_{\text{mosto}} = \underline{2\,516 \text{ l/día}}$$

Para conocer la cantidad de material al inicio de la fermentación, es necesario tomar en cuenta la cantidad de oxígeno consumido así como el dióxido de carbono emitido. Para tal fin se emplean una serie de datos obtenidos a escala semi industrial (25), que se presentan en la Tabla IV. 1.

La siguiente ecuación representa el balance de masa en el fermentador.

$$M_o = M_f + \int_0^t M_{CO_2}(t) dt - \int_0^t M_{O_2}(t) dt$$

Tabla IV. 1. DATOS EXPERIMENTALES DE LA FERMENTACION.

(P=2 atm., velocidad de agitación = 306 RPM)

<u>Tiempo</u> <u>(hr)</u>	<u>CO₂ emitido</u> <u>(ml/100 ml hr)</u>	<u>O₂ consumido</u> <u>(ml/100 ml hr)</u>	<u>Sacarosa.</u> <u>(%W/ V).</u>
0	-	-	5.00
2	8	5	4.95
4	20	15	4.80
6	30	25	4.50
8	50	40	3.95
10	71	57	3.00
12	95	75	1.75
14	99	78	0.55
16	92	76	0.00

Como se puede observar en la Tabla IV. 1 los datos de oxígeno consumido y dióxido de carbono producido varían a lo largo de la fermentación.

Para realizar el balance de masa es necesario conocer el consumo total de oxígeno, así como la cantidad de dióxido de carbono producido durante las 16 hr. que dura la fermentación.

Para obtener las cantidades totales de oxígeno consumido y dióxido de carbono producido se efectúa una integración por el método de la regla de Simpson (basada en la suma de las áreas bajo la curva).

De la integración se obtiene:

$$\int_0^{16} V_{CO_2}(t) dt = \underline{953.33 \text{ ml } CO_2 / 100 \text{ ml de mosto.}}$$

$$\int_0^{16} V_{O_2}(t) dt = \underline{766.00 \text{ ml } O_2 / 100 \text{ ml mosto.}}$$

La masa y el volumen del gas se relacionan por la siguiente ecuación.

$$\int_0^t M_{T \text{ gas}}(t) dt = \rho_{\text{gas}} \int_0^t V_{T \text{ gas}}(t) dt$$

Para las condiciones de fermentación (28° C y 2 atm), las densidades del oxígeno y del dióxido de carbono son 2.593 kg/m³ y -- 3.565 kg/m³ respectivamente.

Cálculo de los volúmenes totales de oxígeno y dióxido de car bono.

$$\int_0^{16} V_{T \text{ gas}}(t) dt = V_{\text{mosto.}} \int_0^{16} V_{\text{gas}}(t) dt$$

$$V_{\text{mosto.}} = 2.52 \times 10^6 \text{ ml/ día.}$$

$$\int_0^{16} V_{T O_2}(t) dt = 24 \text{ m}^3 / \text{ día}$$

$$\int_0^{16} V_T \text{CO}_2 (t) dt = 19.3 \text{ m}^3/\text{día}$$

Cálculo de la masa total de oxígeno y de dióxido de carbono.

$$\int_0^{16} M_T \text{O}_2 (t) dt = \underline{49.96 \text{ kg/día.}}$$

$$\int_0^{16} M_T \text{CO}_2 (t) dt = 85.52 \text{ kg/día}$$

Substituyendo la masa total de oxígeno y dióxido de carbono en la ecuación de balance de masa, se obtiene:

$$M_O = 2894 \text{ kg/día} + 85.52 \text{ kg/día} - 49.96 \text{ kg/día.}$$

$$M_O = \underline{3029.5 \text{ kg/día}}$$

Cálculo del volumen inicial en el fermentador.

$$V_O = M_O / \rho_o ; \rho_o = 1.059 \text{ kg/l}$$

$$V = 2860.7 \text{ litros.}$$

Del volumen inicial, el 10% (v/v) (24, 25) corresponde al -
pie de cultivo.

$$V_{\text{pie de cultivo}} = \underline{286.07 \text{ litros.}}$$

$$V_{\text{medio}} = \underline{2574.63 \text{ litros.}}$$

Debido a que los balances en los fermentadores f_1 y f_2 son idénticos al fermentador F, sólo se efectuó este balance para ejemplificar. A continuación se presentan los balances de masa tabulados.

<u>Concepto</u>	<u>Fermentador F</u>	<u>Fermentador f_2</u>	<u>Fermentador f_1</u>
M_F mosto (kg/día)	2 894.0	329.0	33.3
V_F mosto (l/día)	2 516.0	286.0	28.9
M_{O_2} (kg/día)	50.0	5.7	0.6
V_{O_2} (l/día)	19 270.0	2 191.3	221.7
M_{CO_2} (kg/día)	85.5	9.5	1.0
V_{CO_2} (l/día)	23 990.0	2 669.0	270.0
M_o mosto (kg/día)	3 029.5	332.8	33.7
V_o mosto (l/día)	2 860.7	289.4	31.8
V_{medio} (l/día)	2 574.6	260.5	28.6
$V_{pie\ cultivo}$ (l/día)	286.1	28.9	3.2

Del laboratorio se obtiene el pie de cultivo : 3.2 litros por -
corrida, con una concentración de 4×10^8 esporas por 100 ml.

Una vez determinada la cantidad total de medio de cultivo tan
to para los fermentadores f_1 y f_2 , así como para el fermentador F,
es necesario calcular las cantidades de los componentes del medio por -
separado.

En la tabla IV. 3 se presentan las cantidades que se deben usar en cada fermentador, y en la tabla IV. 4 las cantidades que se consumen por día, mes y año.

Tabla IV. 3. Balance de material en el medio de cultivo, en kg/día.

<u>Sustancia</u>	<u>Laborato- rio.</u>	<u>Fermenta- dor f₁</u>	<u>Fermenta- dor f₂</u>	<u>Fermenta- dor F</u>	<u>%</u>
medio	3.3670	30.3020	275.830	2 726.53	100
Sacarosa	0.1680	1.5150	13.792	136.33	5
Nitrato de Ca.	0.0070	0.0610	0.552	5.45	0.20
Acido Cí- trico.	0.0250	0.2270	2.069	20.45	0.75
Fosfato de Potasio	0.0010	0.0080	0.069	0.68	0.025
Cloruro de Potasio.	0.0010	0.0080	0.069	0.68	0.025
Sulfato de Magnesio.	0.0010	0.0080	0.069	0.68	0.025
Cloruro fe- rrico	0.00003	0.0003	0.003	0.03	0.001
Cascarilla de Maíz	0.0670	0.6060	5.517	54.53	2
Agua desti- lada.	3.0970	27.8690	253.692	2 507.70	91.974

Tabla IV. 4. Cantidad de Componentes que se emplean diaria, mensual y anualmente.

<u>Substancia</u>	<u>kg/día</u>	<u>kg/mes</u>	<u>kg/año</u>
Sacarosa	151.8	3 795.0	45 540.0
Nitrato de Calcio	6.1	152.0	1 822.0
Acido Cítrico	22.8	570.0	6 831.0
Fosfato de Potasio	0.8	19.0	228.0
Cloruro de Potasio	0.8	19.0	228.0
Sulfato de Magnesio	0.8	19.0	228.0
Cloruro férrico	0.03	0.8	9.6
Cascarilla de Maíz.	60.7	1 518.0	18 217.0
Agua destilada	2 792.4	69 809.0	837 708.0

Cálculo de los agentes antiespumantes, autolíticos y clarificantes.

En las tablas IV. 5 (a y b) se presentan las dosificaciones recomendadas de estos agentes, así como su consumo diario.

Tabla IV. 5a. Dosificación y consumo diario de los agentes antiespumantes, autolítico y clarificante en el fermentador F.

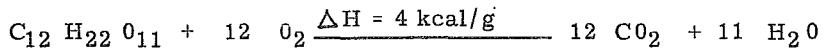
<u>Agente</u>	<u>Dosificación</u>	<u>M o s t o .</u>		<u>Cantidad</u> (kg/día)
		<u>Volumen(l)</u>	<u>Masa (kg)</u>	
Antiespumante (35) Carbopol 934 (Caxboxipolimetileno)	3 g/l	3181.9	3659.2	9.55
Autolítico (24) CaCl ₂	4% W/W	3181.9	3659.2	146.37
Clarificante y filtro ayuda. Tierra de - diatomeas (24).	1% W/W	3181.9	3659.2	36.59
Precipitante (5, 27) (NH ₄) ₂ SO ₄	0.62 kg/l	3635.0	5379.2	1 720.00

Tabla IV. 5b. Dosificación y consumo diario del agente antiespumante en los fermentadores f₁ y f₂.

<u>Concepto:</u>	<u>Fermentador f₁</u>	<u>Fermentador f₂</u>
Antiespumante	Carbopol 934	Carbopol 934
Dosificación	3 g/l	3 g/l
V _{m o s t o} (1/día)	31.80	289.40
M _{antiespumante} (kg/día)	0.10	0.87

b).- Balance de Energía.

En la fermentación se genera calor debido a la respiración - del microorganismo. La reacción que se efectúa es la siguiente:



Cálculo del calor generado en los fermentadores.

$$Q_{\text{generado}} = \Delta H \times M_{\text{sacarosa}}$$

En la Tabla IV. 6 se presentan las cantidades de calor generado en los fermentadores (f_1 , f_2 y F).

Tabla IV. 6. Calor Generado.

<u>Equipo</u>	<u>Sacarosa (kg)</u>	<u>Q_{tot} (kcal)</u>	<u>Q_{generado} Q (kcal/hr)</u>
Fermentador F	136.33	5.45×10^5	34 082.5
Fermentador f_2	13.79	5.52×10^4	3 448.0
Fermentador f_1	1.52	6.06×10^3	378.8

2. - Dimensionamiento de Equipos.

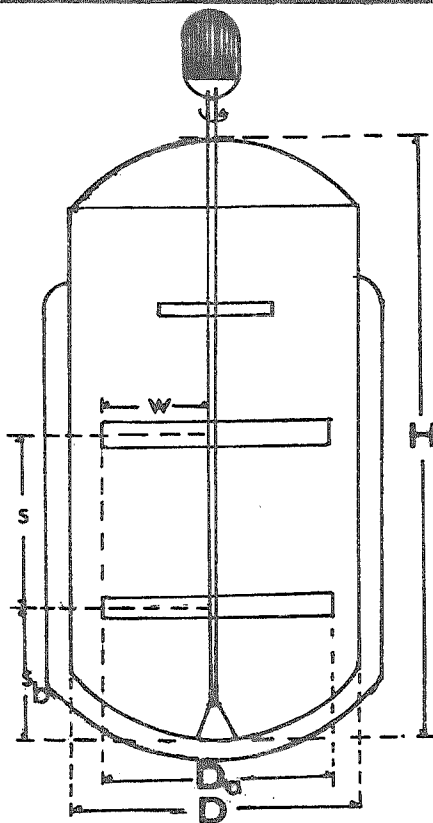
a) Fermentadores (f_1 , f_2 y F), precipitador y tanque de almacenamiento del medio.

Para el dimensionamiento de fermentadores, se tiene como criterio de diseño, que la relación del volumen del fermento a volumen del fermentador es de 0.7 (40). Esto es debido a que se toma en cuenta la expansión del fermento y la espumación. En el diseño previo del precipitador y del tanque de almacenamiento se utilizan las mismas relaciones.

Otras relaciones de diseño importantes en el dimensionamiento de fermentadores se encuentran en la tabla IV. 7 (17, 40).

Para el dimensionamiento de los fermentadores (f_1 , f_2 y F), precipitador y tanque de almacenamiento se seleccionan las relaciones de diseño más empleadas. La información se presenta en la tabla IV. 8.

FERMENTADOR (VARIABLES DE DISEÑO)



SIMBOLOGIA :

H : altura

D_g : diámetro paletas.

D : diámetro fermentador.

w : longitud del asa.

s : distancia entre paletas.

s_b : distancia entre impulsor principal y fondo fermentador.

Tabla IV. 7. Relaciones de Diseño.

<u>De :</u>	<u>A</u>	<u>relación:</u>
Altura	Diametro	$H/D : 2.0 - 5.0$
Diametro	Distancia entre el fondo del tanque y el impulsor principal.	$D/s_b : 3$
Diametro	Longitud de aspa.	$D/w : 4.0 - 8.0$
Diametro	Diametro del agitador	$D/D_a : 2.0 - 3.25$
Altura	Distancia entre el impulsor principal y el agitador auxiliar.	$H/s : 2.0 - 8.0$

Tabla IV. 8. Selección de Relaciones de Diseño. Dimensiones de los Equipos.

Equipo	f_1	f_2	F	P	T A
Volumen (l)	50.000	500.000	4 000.000	4 500.000	3 500.000
H/D	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500
D/s_b	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000
D/s	4.000	4.000	4.000	4.000	-
D/D_a	2.000	2.000	2.000	2.000	-
H/s	5.000	5.000	5.000	5.000	-
D (m)	0.317	0.683	1.370	1.420	1.210
H (m)	0.793	1.710	3.413	3.550	3.030
s_b (m)	0.106	0.228	0.457	0.473	-
w (m)	0.079	0.171	0.343	0.355	-
D_a (m)	0.158	0.342	0.686	0.710	-
s (m)	0.159	0.342	0.683	0.710	-

b). Filtro y Centrifuga.

Filtro.

Se selecciona un filtro de placas. El cálculo de su área se -
presenta a continuación.

$$s = Q / W$$

Q = Gasto del líquido a filtrar (gph).

Q = Volumen de líquido/tiempo de filtración.

Volumen de líquido = 2.52 m³

Tiempo de filtración = 30 min.

Q = 2.52 m³ / 30 min = 0.084 m³ / min = 1 327.5 gph.

W = 60 gal/ft² hr (recomendado, (43))

s = 1 327.5 gph/60 gal/ft² hr.

s = 22.125 ft²

Centrifuga.

En la separación de los cristales de la enzima de tamaño -
(x 450), se emplea una centrifuga de discos con una velocidad de rota -
ción de 6 000 RPM (11).

3. - Cálculo de Servicios.

a) Aire y vapor.

Aire.

El flujo recomendado de aire es de un volumen de aire por volumen de medio por minuto (24, 25, 36).

Cálculo del aire en el fermentador F.

$$Q_{\text{aire}} = 60 V_{\text{aire}} / V_{\text{medio}} \text{ hr} \times V_{\text{medio}}$$

$$Q_{\text{aire}} = 60 \text{ l}_{\text{aire}} / \text{l}_{\text{medio}} \text{ hr} \times 2\,574.6 \text{ l}_{\text{medio}}$$

$$Q_{\text{aire}} = 154\,476.00 \text{ litros de aire/hr.}$$

En la tabla IV. 9 se resume la información del gasto de aire en los fermentadores.

Tabla IV. 9. Consumo de Aire.

<u>Equipo.</u>	<u>Gasto de aire (l/hr).</u>	<u>Gasto de aire (l/día)</u>
Fermentador F	154 476.00	2 471 616.00
Fermentador f ₂	17 364.00	277 824.00
Fermentador f ₁	1 716.00	27 456.00

Volumen total del aire.

$$V_{\text{T aire}} = V_{\text{F}} + V_{\text{f}_2} + V_{\text{f}_1}$$

$$V_{\text{T aire}} = \underline{173\,556 \text{ litros/hr}}$$

Cálculo de la masa de aire.

La densidad del aire a 28° C y 2 atm. de presión es de -
235 kg/m³

$$M_{\text{aire}} = V_{\text{aire}} \rho_{\text{aire}}$$

$$M_{\text{aire}} = \underline{407.9 \text{ kg/hr}}$$

Vapor.

Cálculo de vapor para la esterilización del medio.

Características del vapor:

Presión = 1.06 kg/cm² (manométricos).

Temperatura = 117.15° C

Calor latente de vaporización (λ) = 527.91 Kcal/kg

Tiempo de esterilización = 30 minutos.

Condiciones de Esterilización del Medio :

Temperatura máxima de esterilización (23) = 40° C

Temperatura inicial + 18° C

Balance de calor en el fermentador F.

$$(M C_p \Delta T)_F = W_{\text{vapor}} \lambda_{\text{vapor}} + pq$$

Las pérdidas de calor por radiación y convección natural - se desprecian por considerarse pequeñas.

Cálculo del gasto de vapor.

$$W_{\text{vapor}} = \frac{(M C_p \Delta T)_F}{\lambda_{\text{vapor}}}$$

$$W_{\text{vapor}} = 250 \text{ kg de vapor/hr}$$

En la tabla IV. 10 se presentan los gastos de vapor para la esterilización del medio.

Tabla IV. 10. Vapor de Esterilización.

<u>Equipo</u>	<u>W_{vapor} total(kg)</u>	<u>W_{vapor} (kg/hr)</u>
Fermentador F	125.00	250.00
Fermentador f ₂	12.60	25.20
Fermentador f ₁	1.40	2.80

Cálculo del Vapor para la Esterilización del Aire.

Condiciones del aire :

	Temperatura (° C)	Entalpía (kcal/kg) (i)
Inicial	18	8.33
Final	60	26.67

Balance de Calor.

$$M_{\text{aire}} (i_2 - i_1) = W_{\text{vapor}} \lambda_{\text{vapor}}$$

$$W_{\text{vapor}} = M_{\text{aire}} (i_2 - i_1) \lambda_{\text{vapor}}$$

$$W_{\text{vapor}} = \underline{14.2 \text{ kg/hr.}}$$

Cálculo del Vapor para la Esterilización de los Equipos.

La cantidad de vapor para la esterilización de los equipos se estima en 150 kg/día; con un gasto de 10 kg/min por un tiempo de 15 minutos (36).

b). Agua de Enfriamiento.

Cálculo de la cantidad de agua de enfriamiento del medio esterilizado.

Condiciones del medio y del agua de enfriamiento:

	<u>medio</u>	<u>agua</u>
T_1 (°C)	40	18
T_2 (°C)	28	24

Balace de calor en el fermentador F.

$$(M_o C_p \Delta T_o)_{\text{medio}} = (M C_p \Delta T)_{\text{agua}}$$

$$M_{\text{agua}} = (M_o C_p \Delta T_o)_{\text{medio}} / (C_p \Delta T)_{\text{agua}}$$

$$M_{\text{agua}} = \frac{2\,726 \text{ kg} \times 1.1 \text{ kcal/kg } ^\circ\text{C} \times (40 - 28) ^\circ\text{C}}{1 \text{ kcal/kg } ^\circ\text{C} \times (24 - 18) ^\circ\text{C}}$$

$$M_{\text{agua}} = \underline{5\,998.4 \text{ kg}}$$

Cálculo del Volumen de agua.

$$V_{\text{agua}} = M_{\text{agua}} / \rho_{\text{agua}}$$

$$\rho_{\text{agua}} = 997.51 \text{ kg/m}^3 \text{ (21}^\circ\text{C)}$$

$$V_{\text{agua}} = \underline{6.00 \text{ m}^3}$$

Cálculo del flujo de agua.

$$\text{Velocidad de flujo recomendada} = 1.83 \text{ m/seg}$$

$$\text{Tiempo de enfriamiento} = 0.5 \text{ hr}$$

$$Q_{\text{agua}} = V_{\text{agua}} / t_{\text{enfriamiento}}$$

$$Q_{\text{agua}} = \underline{3.33 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{seg}}$$

$$s = Q_{\text{agua}} / \text{velocidad recomendada}$$

$$s = \underline{18.21 \text{ cm}^2} ; D = 4.8 \text{ cm} \longrightarrow \underline{2 \text{ pulgadas.}}$$

Cálculo de la cantidad de agua de enfriamiento durante la fermentación.

Balance de calor en el fermentador F.

Condiciones del aire y del agua de enfriamiento:

	<u>Aire.</u>	<u>Agua.</u>
T_1 (° C)	60	18
T_2 (° C)	28	24
i_1 (kcal/kg)	26.67	-
i_2 (kcal/kg)	13.89	-
M_{aire} (kg/hr)	363.02	-

Calor generado durante la fermentación (ver tabla IV. 6)

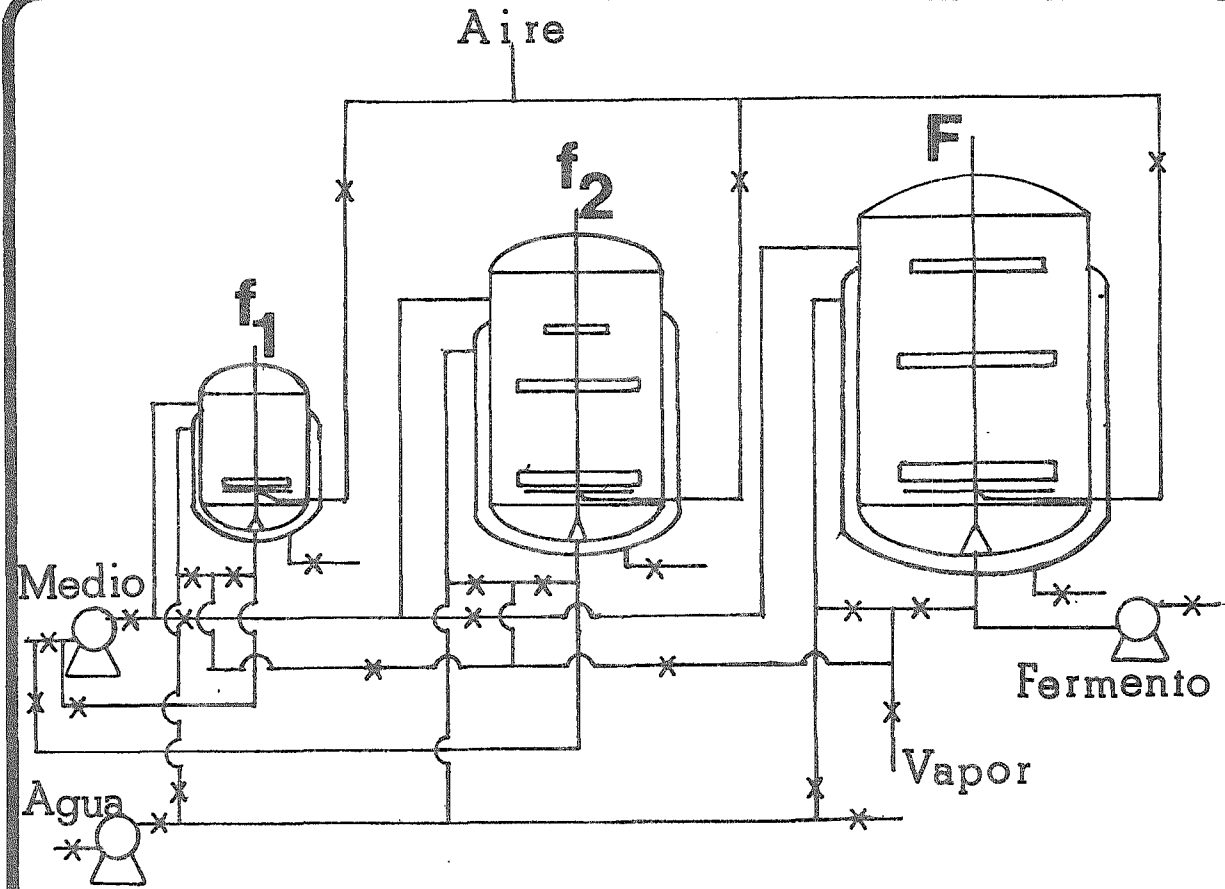
$$Q_{\text{generado}} = 3.41 \times 10^4 \text{ kcal/hr}$$

Ecuación de balance:

$$(M C_P \Delta T)_{\text{agua}} = Q_{\text{generado}} + M_{\text{aire}} (i_1 - i_2)$$

$$M_{\text{agua}} = (Q_{\text{generado}} + M_{\text{aire}} (i_1 - i_2)) / (C_p \Delta T)_{\text{agua}}$$

EQUIPO DE FERMENTACION



$$M_{\text{agua}} = \underline{6\,496.42 \text{ kg/hr}}$$

Cálculo del Volumen de Agua.

$$V_{\text{agua}} = M_{\text{agua}} / \rho_{\text{agua}}$$

$$V_{\text{agua}} = \underline{1.81 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{seg.}}$$

Cálculo de la velocidad del Agua.

$$v_{\text{agua}} = V_{\text{agua}} / s$$

$$v_{\text{agua}} = \underline{1 \text{ m/seg.}}$$

En la tabla IV. 11 se presenta el balance de masa para el agua de enfriamiento del medio. En la tabla IV. 12 se tabula el balance de masa para el aire durante la fermentación.

Tabla IV. 11. Balance del agua de enfriamiento del medio esterilizado.

<u>Concepto</u>	<u>F</u>	<u>f₂</u>	<u>f₁</u>
M _{medio} (kg)	2 726.5	275.80	30.30
V _{agua} (m ³)	6.0	0.61	0.07
Q _{agua} (m ³ /hr)	12.0	1.22	0.134
V _{agua} (m/hr)	6 588.00	5 486.0	4 389.00
s (cm ²)	18.21	2.5	0.50

Tabla IV. 12. Balace del agua de enfriamiento durante la fermentación: calor generado por la respiración y disminución de la temperatura del aire de alimentación (de 60 a 28°C).

<u>Concepto.</u>	<u>F</u>	<u>f₂</u>	<u>f₁</u>
Q _{generado} (kcal/hr)	34 082.5	3 448.00	378.8
M _{aire} (kg/hr)	381.7	38.60	4.2
(i ₂ - i ₁) (kcal/kg)	12.78	12.78	12.78
(M i) _{aire} (kcal/hr)	4 878.10	493.30	53.70
M _{agua} (kg/hr)	6 493.40	656.90	72.10
Q _{agua} (m ³ /hr)	6.49	0.66	0.072
v _{agua} (m/hr)	3 607.40	3 284.40	2 403.30

Cálculo del agua de lavado en el filtro.

Gasto recomendado de agua (41) = 3 gpm/ft²

Tiempo de lavado = 10 minutos.

Q_{agua} = Gasto recomendado x tiempo x área del marzo

Q_{agua} = 0.114 m³

Gasto total de agua : (ver tablas IV. 11 y IV. 12.) :

Q_{T agua} = 122.35 m³/día.

4. R e s u l t a d o s .a) Balace de materiales.

<u>Substancia.</u>	<u>kg/día.</u>
Sacarosa	151.8
Nitrato de Calcio	6.1
Acido Cítrico	22.8
Fosfato de Potasio	0.8
Cloruro de Potasio	0.8
Sulfato de Magnesio	0.8
Cloruro Férrico	0.03
Cascarilla de Maíz.	60.7
Agua destilada	2 792.40
Carbopol 934	10.55
Cloruro de Calcio	146.37
Tierra de diatomeas	36.59
Sulfato de Amonio	1 720.0

b) Servicios.

<u>Substancia.</u>	<u>kg/día.</u>
Aire	6 526.40

agua	122 045.40
Vapor	4 783.20

c) Equipos.

<u>Equipo</u>	<u>Símbolo</u>	<u>Capacidad.</u>
Tanque de almacenamiento del medio.	T-A	3 500 l.
Fermentador	f_1	50 l.
Fermentador	f_2	500 l.
Fermentador	F	4 000 l.
Tanque Precipitador	P	4 500 l.
Bomba	B-1	15 gpm
Bomba	B-2	25 gpm
Bomba	B-3	35 gpm
Filtro	FI	24 ft ²
Centrífuga	C	6 000 RPM
Secador	S	0.73 m ³
Molino	M	
Ventilador	V	190 cfm std.
Caldera	CAL	5 kg/cm ²

V

ESTUDIO DE VIABILIDAD .

1. Costo de Materia Prima.

<u>Substancia</u>	<u>\$ /kg</u>
Sacarosa	11.00
Nitrato de Calcio	35.80
Acido Cítrico	45.00
Fosfato Monopotásico	55.00
Cloruro de Potasio	6.55
Sulfato de Magnesio	6.55
Cloruro Férrico	33.55
Licor de Cáscara de Maíz.	19.80
Cloruro de Calcio	45.00
Sulfato de Amonio	3.20
Carbopol (carboxipolimetileno)	104.50
Tierra de Diatomeas	8.70

¹ En todos los precios está incluido el Impuesto sobre el valor agregado.

2. Costo de Equipos.

<u>E q u i p o :</u>	<u>capacidad</u>	<u>Precio (\$)</u>
Fermentador F de acero inoxidable 304 con motor Westinhouse de 15 HP.	4 000 1	318 131.00
Fermentador f ₂ de acero inoxidable 304 con motor Westinhouse de 2 HP.	500 1	169 587.00
Fermentador f ₁ de acero inoxidable 304 con motor Westinhouse de 1/4 HP.	50 1	56 870.00
Tanque precipitador de acero al carbón con motor Westinhouse de 10 HP.	4 500 1	225 445.00
Tanque de almacenamiento de medio, de Polipropileno.	5 000 1	26 500.00
Centrífuga de acero inoxidable - 304.	6 000 RPM	96 250.00
Filtro de placas de acero inoxidable 304.	24 ft ²	192 500.00
Ventilador axial con motor Westinhouse de 2 HP.	200 cfm std.	16 180.00

<u>E q u i p o :</u>	<u>Capacidad:</u>	<u>Precio (\$)</u>
Molino de engranes con motor - Westinhouse de 1/4 de HP.	1 kg/min.	27 500.00
Secador a vacío	1.5 m ³	202 400.00
Caldera de tubos con tanque para combustible.	5 kg/cm ²	286 000.00
Bomba DURCO de acero inoxidable 304 con motor Westinhouse - de 3/4 de HP.	15 gpm	8 804.00
Bomba DURCO de acero inoxidable 304 con motor Westinhouse de 1HP	25 gpm	14 674.00
Bomba DURCO de acero inoxidable 304 con motor Westinhouse de 2 HP	35 gpm	20 543.60
Filtro Diferencial.	Mallas de 10 ⁻² a 10 ⁻⁴ cm.	125 000.00
COSTO TOTAL DEL EQUIPO:		<u><u>\$ 1 776 385.00</u></u>

3. Cálculo de la Inversión Fija y Capital de Trabajo.

Para estimar la inversión fija se empleará el método de los porcentajes derivados del costo del equipo (44, 45).

3.1. Costos Directos:

a)	Costo del Equipo.	1 776 385.00
b)	Instalación del equipo y auxiliares. Esto incluye el costo de mano de obra, cimentación y otros factores relacionados con el equipo. El porcentaje debido a este concepto, es aproximadamente del 43%.	763 846.00
c)	Instrumentación (instalada). Para una planta química con una instrumentación no excesiva, se usa normalmente un valor del 10% del costo del equipo instalado.	254 032.00
d)	Tubería (instalada). Dentro de este concepto se incluyen costos de válvulas, uniones, tubos soportes y mano de obra de la instalación del mismo. Se considera un 15% del costo del equipo instalado.	381 035.00
e)	Instalación eléctrica (instalada). - En este factor se incluye sub-estación eléctrica, alumbrado e instalaciones en general. Se incluye además el contrato con la Comisión Federal de Electricidad para contar con una planta de generación de corriente. Se aplica el 20% del costo del equipo instalado.	508 460.00

- | | | |
|----|---|------------|
| f) | Edificio. Se estima que el costo del edificio será el 25% del costo del equipo instalado. | 635 058.00 |
| g) | Terreno. Localizado en un parque Industrial de Querétaro, donde se cuenta con todos los servicios necesarios - 500 m ² a 750 \$ m ² . | 375 000.00 |

TOTAL DE COSTOS DIRECTOS DE LA PLANTA:	<u>\$ 4 693 393.00</u>
--	------------------------

3.2. Costos Indirectos.

- | | | |
|----|--|------------|
| a) | Ingeniería y Construcción. Se considera el 20% del costo directo de la planta. | 938 679.00 |
|----|--|------------|

TOTAL DE COSTOS DIRECTOS E INDIRECTOS:	<u>\$ 5 632 072.00</u>
--	------------------------

3.3. Factor de Contingencia.

Este factor se incluye para compensar algunos eventos impredecibles, como las pérdidas de algunos lotes que afectan la inversión. Se aplica un 10% del costo total directo e indirecto.	563 207.00
---	------------

INVERSION FIJA:	<u>\$ 6 195 279.00</u>
-----------------	------------------------

3. 4. Capital de Trabajo. 2 785 800.00

Esta cantidad se determina tomando en cuenta tres meses de gastos en la planta.

3. 5. Sistemas de Esterilización. 309 764.00

Se le considera un factor de suma importancia en este proceso y se determina - como un 5% de la inversión fija.

3. 6. Control de la Contaminación. 619, 528.00

En este tipo de proceso se tiene un cuidado excesivo en cuanto a la contaminación y pérdida del producto, por lo que se considera un 10% de la inversión fija.

INVERSION TOTAL:

\$ 9 910 371.00

4. Costo Total del Producto.

Se tomará como base de cálculo un día de operación de la planta, para determinar los costos de operación.

4.1. Costos de Manufactura.

4.1.1. Costos Directos de Producción.

a) Materia prima

151.8 kg de sacarosa a 11.0 \$ /kg.	1 669.80
6.1 kg de Nitrato de calcio a 35.8 \$ /kg.	218.40
22.8 kg de Ac. cítrico a 45.0 \$/kg.	1 026.00
0.8 kg de Fosfato monopotásico a 55.0 \$/kg.	44.00
0.8 kg de Cloruro de potasio a 6.55 \$/kg.	5.24
0.8 kg de sulfato de magnesio 6.55 \$ /kg.	5.24
0.03 kg de cloruro férrico a 33.55 \$/kg.	1.01
60.7 kg de licor de Maíz a 19.80 \$/kg.	1 201.86
146.37 kg de cloruro de calcio a 45.0 \$/kg.	6 586.65
1720 kg de sulfato de amonio a 3.20 \$/kg.	5 504.00
10.55 kg de carbopol a 104.50 \$/kg.	1 102.48
36.59 kg de tierra de diatomeas a 8.7 \$/kg.	318.33
COSTO TOTAL DE MATERIA PRIMA:	\$ <u>17 673.00</u>

d) Mano de Obra Indirecta.

Un electricista. Tres turnos.	600.00
-------------------------------	--------

Un mecánico de mantenimiento. Tres turnos.	900.00
--	--------

COSTO TOTAL DE MANO DE OBRA INDIRECTA: \$ 1 500.00

e) Supervisión.

Un Ingeniero Químico. Un turno.	1 250.00
---------------------------------	----------

f) Laboratorio de Control de Calidad.

Un Q. F. B. especialista en fermentación Un turno.	2 000.00
---	----------

Un ayudante de laboratorio. Tres turnos.	1 050.00
--	----------

Gastos de Laboratorio.	500.00
------------------------	--------

g) Mantenimiento y reparación.

Se considera un 8% de la inversión fija.	1 652.00
--	----------

TOTAL DE COSTOS DIRECTOS DE PRODUCCION: \$ 25 361.00

b) Servicios.

Agua: 123 m ³ /día a 4 \$/m ³	492.00
Energía Eléctrica: 480 KW-Hr. a 0.6 \$/KW-Hr.	288.00
Combustible: 300 l de diesel por día a 1 \$/litro.	300.00

COSTO TOTAL DE SERVICIOS: \$ 1 080.00

c) Mano de Obra Directa.

Un encargado de alimentación del medio y m.a.s.t.o, así como de la esterilización. Un turno.	225.00
Un encargado de extracción y filtración. Un turno.	225.00
Dos encargados de precipitación, centrifugación, secado y molido del producto. Un turno.	500.00
Dos ayudantes. Un turno.	400.00
Dos encargados de la fermentación. Dos turnos.	1 000.00

COSTO TOTAL DE MANO DE OBRA DIRECTA: \$ 2 350.00

4.1.2. Costos Fijos.

a) Depreciación.

Se considera 10% anual de la inversión fija.	2 065.00
--	----------

b) Impuesto Predial.

Se considera 6.5% anual de la inversión - fija.	1 118.00
--	----------

c) Seguros de la Planta.

Se considera 8% anual de la inversión fija.	1 360.00
---	----------

TOTAL DE COSTOS FIJOS:	<u>\$ 4 543.00</u>
------------------------	--------------------

4.1.3. Costos Diversos de la Planta.

a) Prestaciones.

Se considera 35% sobre los sueldos totales (15% seguro social, 5% infonavit, - vacaciones, educación, etc.)	3 263.00
--	----------

b) Gastos de Empaque.

Se considera 0.6% sobre materias primas.	1 000.00
--	----------

TOTAL DE COSTOS DIVERSOS:	<u>\$ 4 263.00</u>
---------------------------	--------------------

4.2. Gastos Generales.

4.2.1. Gastos de Administración.

a)	Un gerente general. Un turno.	2 250.00
b)	Un contador. Un turno.	700.00
	Un ayudante de contador. Un turno.	400.00
c)	Dos secretarias bilingues. Un turno.	1 600.00
d)	Gastos de oficina (papelería y control)	300.00

GASTOS TOTALES DE ADMINISTRACION: \$ 5 250.00

4.2.2. Gastos de Distribución y Ventas.

a)	Tres agentes de ventas. Un turno	2 700.00
	Más 3% sobre ventas.	112.00
b)	Dos secretarias. Un turno.	1 000.00
c)	Distribución del producto y gastos de representación.	2 000.00
d)	Impuesto al valor agregado, 10% de la venta del producto.	250.00
e)	Impuesto al valor agregado, 10% de la compra de materias primas.	-1 767.00

TOTAL DE GASTOS DE DISTRIBUCION Y VENTA: \$ 3 295.00

COSTO TOTAL DEL PRODUCTO: \$ 42 712.00

5. Cálculo de la Rentabilidad.

Para determinar la rentabilidad se toma como base un año, considerando 300 días hábiles.

<u>Costo de Manufactura:</u>	<u>\$/ año.</u>
a) Costos directos de producción.	7 608 300.00
b) Costos fijos.	1 362 900.00
c) Costos diversos de la planta.	<u>1 278 900.00</u>
	<u>\$ 10 250 100.00</u>
Gastos Generales.	
a) Gastos de Administración.	1 575 000.00
b) Gastos de Distribución y Ventas.	<u>988 000.00</u>
	<u>\$ 2 563 500.00</u>
COSTO TOTAL DEL PRODUCTO:	<u>\$ 12 813 600.00</u>

El costo total del producto determinado anteriormente está dado para el 100% de la capacidad de operación de la planta.

Para determinar la rentabilidad a cualquier capacidad, se debe tomar en cuenta que los gastos fijos no varían con ésta.

Para la operación de la planta al 100% de su capacidad, se tienen los siguientes gastos fijos y variables:

<u>Gastos Fijos:</u>	<u>\$/año.</u>
Mano de obra indirecta	450 000.00
Supervisión.	375 000.00
Depreciación.	619 500.00
Impuesto predial.	123 900.00
Seguros de la planta	619 500.00
Mantenimiento y reparación.	495 600.00
TOTAL DE GASTOS FIJOS:	<u>\$ 2 683 500.00</u>
<u>Gastos Variables:</u>	
Materia prima.	5 301 900.00
Servicios	280 800.00
Mano de Obra directa.	705 000.00
Prestaciones.	978 900.00
Laboratorio de Control de Calidad.	1 065 000.00
Gastos de empaque.	300 000.00
Administración.	1 575 000.00
Gastos de Distribución y Ventas.	988 500.00
TOTAL DE GASTOS VARIABLES:	<u>\$ 11 195 100.00</u>
TOTAL DE GASTOS FIJOS Y VARIABLES:	<u><u>\$ 13 878 600.00</u></u>

Se toma como el primer año de operación 1981, con una demanda esperada de 2.85 ton/año, operando al 56.98% de su capacidad.

El precio internacional del producto (Glucosa oxidasa) es de --
5 000.00 \$/kg L.A. México. Los ingresos por ventas serán:

	<u>\$/año.</u>
Ingresos brutos por ventas	14 250 000.00
Menos 5% por devoluciones y descuentos.	712 500.00
INGRESOS NETOS POR VENTAS:	\$ <u>13 537 500.00</u>
Gastos fijos.	2 683 500.00
Gastos variables.	6 378 968.00
GASTOS TOTALES:	\$ <u><u>9 062 468.00</u></u>
UTILIDAD BRUTA:	\$ <u><u>4 475 032.00</u></u>
Impuesto sobre la renta (50%)	2 237 516.00
UTILIDAD NETA:	\$ <u><u>2 237 516.00</u></u>

Ecuación para determinar la rentabilidad:

$$\text{Rentabilidad} = \frac{\text{Utilidad neta}}{\text{Inversión total}} \times 100$$

$$\text{Rentabilidad} = \frac{2\,237\,516.00}{9\,910\,371.00} \times 100$$

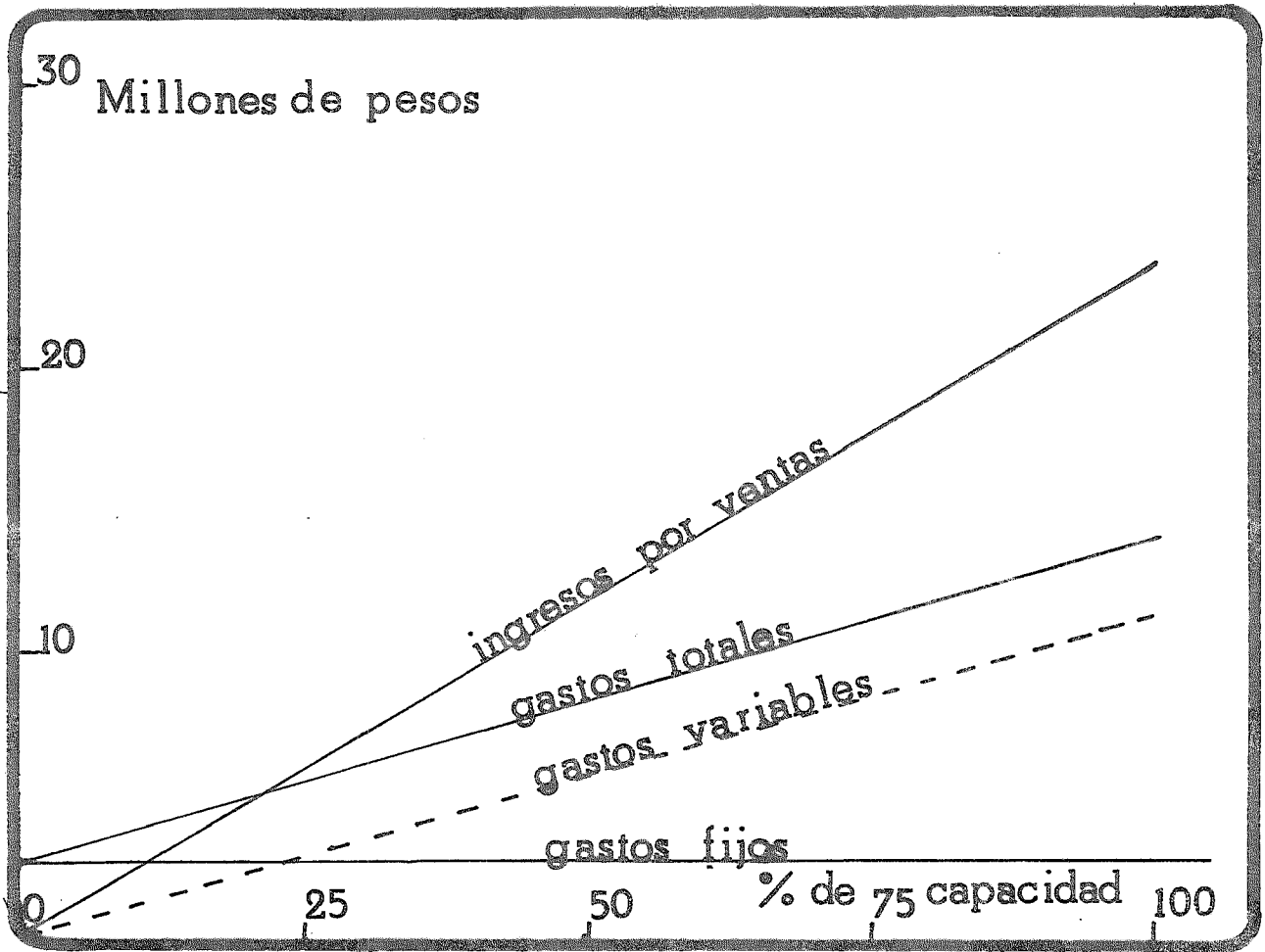
$$\text{Rentabilidad} = 22.60\%$$

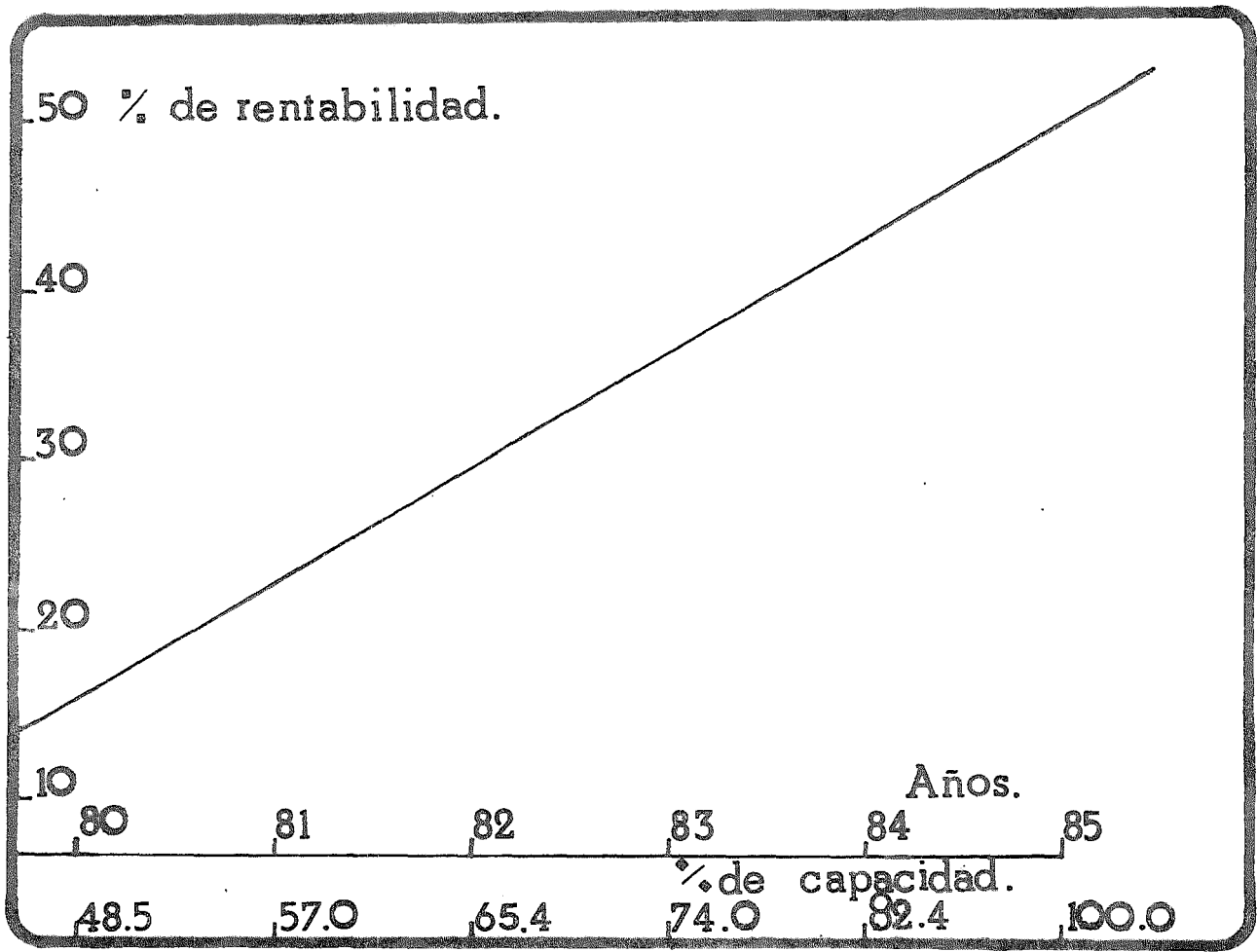
En la tabla siguiente se presentan los datos de rentabilidad.

Año	1981	1982	1983	1984	1985
Demanda (Ton/año)	2.85	3.27	3.70	4.12	5.00
Por ciento de capacidad	56.98	65.40	74.00	82.40	100.00
Por ciento de rentabilidad	22.60	27.72	33.33	38.66	49.80

En la gráfica V.1 se presentan los datos de ingresos y egresos, y en la gráfica V.2 se presenta la variación de la rentabilidad con el tiempo.

V.I : INGRESOS Y EGRESOS.





V.2: VARIACION DE LA RENTABILIDAD.

C O N C L U S I O N E S .

La glucosa oxidasa se emplea básicamente en la industria alimenticia como conservador.

En el análisis de variables se compararon diversos microorganismos como fuentes de obtención de la enzima; *A. niger*, *P. notatum* y *P. amagasa* Kiense. Se determinó que la GOD obtenida a partir de *A. niger* en cultivos sumergidos presenta mejores propiedades, básicamente a su actividad, la cual es de 1 670 US/g. El rendimiento del proceso es de 6g enzima/kg de extracto. Además, el *A. niger* resiste condiciones más drásticas que las especies de *Penicillium*.

Una vez realizado el estudio técnico-económico para la producción de la GOD se observó que la rentabilidad promedio anual es de 34.42% (en base a los primeros 5 años de operación) y la inversión inicial es de 9 910 371.00 pesos. A pesar que la rentabilidad es baja, la inversión se recupera en 3.5 años. Se debe considerar que en este estudio se empleó el precio internacional de venta y no el que tiene comercialmente en México. Además este trabajo es sólo un estudio preliminar y aún así presenta cierto atractivo, por lo que es conveniente hacer un análisis más profundo; tanto a nivel laboratorio como a nivel planta piloto.

Por otra parte, si el estudio de viabilidad no sólo se concretara al mercado, sino que también se considerara su mercado potencial, su rentabilidad aumentaría considerablemente. Esto es debido a que en México sólo se emplea en la conservación de mayonesa y huevo en polvo y no se explota la totalidad de sus usos principalmente debido a que existen en el mercado otros productos de menor costo. Sin embargo, la mayoría de estos productos son nocivos a la salud.

Los conceptos mencionados anteriormente son de carácter puramente económico, sin embargo existen otros factores de tipo técnico que pueden influir en la producción de la enzima y por ende en la rentabilidad del proceso. Dentro de este tipo de factores se encuentran; el control de la contaminación durante la fermentación y el uso de precipitantes líquidos (etanol y gluconato de sodio).

En cuanto a la contaminación ambiental este proceso tiene una contribución mínima ya que sólo produce dióxido de carbono, desechos celulares y solución saturada de precipitante ($(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$). Estos dos últimos, empleados conjuntamente con fosfatos pueden servir como fertilizantes.

En este trabajo se analizó la posibilidad de instalar una planta de producción de glucosa oxidasa, empleando materias primas y mano de obra nacionales. Con esto se buscó básicamente evitar la salida de divisas por la importación de este producto.

B I B L I O G R A F I A .

1. - HANS BLUCHER.
Enciclopedia de Química Industrial.
Pág. 493-494.
Edit. TECNOS. Madrid.
1 9 5 8.

2. - D. KEILIN, E. F. HARTREE.
Biochemical Journal, 42, 221-228.
1 9 4 8.

3. - D. KEILIN, E. F. HARTREE.
Biochemical Journal, 50, 331-334
1 9 5 2.

4. - J. H. BIRKINSHAW, H. RAISTRICK.
Journal of Biological Chemistry, 148, 459-460
1 9 4 3.

5. - JOHN H. PAZUR.
Methods in Enzymology.
Vol. XI, pag. 83-87
Edit. Academic Press Inc. U. S. A.
1 9 6 7.

6. - JAMES G. BOUIN, MOKHTAR T. ATALLAH, HERBERT
O. HULTIN.
Methods in Enzymology.
Vol. XLIV, pag. 478-479.
Edit. Academic Press Inc. U. S. A.
1 9 7 6.

7. - GERARD REED.
Enzymes in Food Processing.
Pag. 219-231, 519-547
Edit. Academic Press Inc. U. S. A.
1 9 7 5.
8. - PAUL D. BOYER, HENRY LARDY, KARL MYRBACK.
The Enzymes.
Vol. 7, pag. 567-586.
Edit. Academic Press Inc. U. S. A.
1 9 6 3.
9. - BENNETT E. P. SWOBODA, VINCENT MASSEY.
Journal of Biological Chemistry, 240, 2209-2215
1 9 6 5.
10. - HANS ULRICH BERGMAYER.
Methods of Enzymatic Analysis.
Section D, pag. 974-975.
Edit. Verlag Chemie. Germany.
1 9 6 3.
11. - KIYOSHI KUSAI
Biochemical et Biophys Acta, 40, 43-74
1 9 6 0.
12. - NATAN O. KAPLAN.
Methods in Enzymology.
Vol. III, pag. 109.
Edit. Academic Press Inc. U. S. A.
1 9 5 7 .

13. - D. P. H. HSIEH, R. S. SILVER, R. I. MATELES.
Biotechnology and Bioengineering, XI, 1-18
1 9 6 9.
14. - HAROLD J. STRECKER, SEYMOUR KORKES.
Journal Biological Chemistry, 196, 769-783
1 9 5 2 .
15. - C. VEEGER, J. F. KOSTER, D. B. Mc CORNICK.
Methods in Enzymology.
Vol. XVIII, Pag. 511
Edit Academic Press Inc. U. S. A.
1 9 7 2.
16. - MARIAN T. STANKOVICH, LAWRENCE M. SCHOPFER,
VICENT MASSEY.
The Journal of Biological Chemistry. 253, 4971-4979.
1 9 7 8.
17. - F. C. WEBB.
Ingeniería Bioquímica.
Pág. 62-71, 168-171, 181-185, 212-253, 260-271.
Edit. ACRIBIA. España.
1 9 6 5.
18. - QUENTIN H. GIBSON, BENNETT E. P. SWOBODA, VINCENT
MASSEY.
The Journal of Biological Chemistry, 239, 3927-3934.
1 9 6 4.

19. - HAROLD J. BRIGHT, MARYANNE APPLEBY.
The Journal of Biological Chemistry, 244, 3625-3634
1 9 6 9.
20. - H. RICHARD LEVI, FRANK A. LOEWUS, BIRGIT
VENNESLAND.
Methods in Enzymology.
Vol. VIII, pag. 9-10. U.S.A.
Edit. Academic Press Inc.
1 9 6 6.
21. - RAYMOND E. KIRK, DONALD F. OTHMER.
Encyclopedia of Chemical Technology,
Vol. 8, pag. 173-197, 208-219
Edit. The Intersciencie Encyclopedia, Inc. U.S.A.
1 9 6 9.
22. - SAMUEL CATE PRESCOTT AND C.G. DUNN.
Industrial Microbiology.
Pag. 669-671
Edit. McGraw Hill. U.S.A.
1 9 5 9.
23. - E. J. BECKHORN, M. D. LABBEE, L. A. UNDERKOFLEK.
Journal Agric. Food Chem. 13, 30-34.
1 9 6 5.
24. - KORNELIA ZETELAKI, KAROLY VAS.
Biotechnology and Bioengineering, X, 49-59.
1 9 6 8.

25. - KORNELIA ZETELAKI.
Biotechnology and Bioengineering. XII, 379-397.
1 9 7 0.
26. - MORRIS B. JACOBS, MAURICE J. GERSTEIN.
Handbook of Microbiology.
Pag. 15-17
Edit. D. Van Nostrand Co. Inc. Princeton. U.S.A.
1 9 6 0.
27. - W. B. HUGO.
Inhibition and Destruction of the microbial Cell.
Pag. 647, 652, 655.
Edit. Academic Press Inc. U. S. A.
1 9 7 1.
28. - JAMES E. BAILEY, DAVID F. OLLIS.
Biochemical Engineering Fundamentals.
Pag. 334-406
Edit. McGraw Hill Book Co. U. S. A.
1 9 7 7.
29. - W. H. BARTHOLOMEW, E.O. KAROW, M. R. SFAT.
Industrial and Engineering Chemistry. 42, 1801-1809.
1 9 5 0.
30. - GEORGE T. TSAO, DOUGLAS D. LEE.
AIChE Journal. 21, 979-985
1 9 7 5.

31. - ARTHUR W. HIXSON, ELMER L. GADEN.
Industrial and Engineering Chemistry. 42, 1810-1815.
1 9 5 0.
32. - M. T. TORAL.
Fisicoquímica de Superficies y Sistemas Dispersos.
Pág. 25-27, 62-65.
Edit. URMO. España.
1 9 7 3.
33. - H. ELMAYERGI, J.M. SCHARER, M. MOO_YOUNG.
Biotechnology and Bioengineering. XV, 845-859.
1 9 7 3.
34. - TANNENBAUN AND WANG D.
Single Cell Protein II.
Pag. 228-229
Edit. The Mit Press. U.S.A.
1 9 7 5.
35. - DALE F. RUDD, GARY J. POWERS, JEFFREY J. SIROLA.
Process Synthesis.
Pag. 106-111, 155-159.
Edit. Prentice Hall Inc. U.S.A.
1 9 7 3.
36. - J. J. STFANIAK, F. B. GAILEY, C. S. BROWN, M. J. JOHNSON.
Industrial and Engineering Chemistry, 38, 666-671.
1 9 4 6.

37. - NUEVA TARIFA DEL IMPUESTO GENERAL DE IMPORTACION.
Edit. Información Aduanera de México.
Tomo I, Pág. 310 México.
1 9 7 5.
38. - FOOD INGREDIENTS DIRECTORY OF U. S.
Pag. 35
Edit. Division of Becton U. S. A.
1 9 7 5.
39. - U. S. EXPORTS.
Pag. 2-203.
Edit. Department of Commerce U. S. U. S. A.
1 9 7 4 - 1 9 7 9.
40. - HAROLD B. REISMAN, JAMES H. GORE, JOHN T. DAY.
Bioengineering Food (Chemical Engineering Progress Symposium Series).
Vol. 64. pag. 26-36
Edit. American Institute of Chemical Engineering. U. S. A.
1 9 6 8.
41. - ROBERT H. PERRY, CECIL H. CHILTON.
Chemical Engineers' Handbook.
Pag. 3-153, 19-63 a 70
Edit McGraw Hill Book Co. U. S. A.
1 9 7 3.
42. - ALBERT L. LEHNINGER.
Bioenergetics.
Pag. 22-23
Edit. W. A. Benjamin Inc. U. S. A.
1 9 7 3

43. - HOWARD F RASE.

Chemical Reactor Desing for Process Plants.
Vol. II, pag. 161-178
Edit. John Wiley and Sons. U. S. A.
1 9 7 7.

44. - R. S. ARIES Y R. D. NEWTON.

Chemical Engineering Cost Estimation.
Edit. McGraw Hill Book, Co. U. S. A.
1 9 6 5.

45. - F. C. VILBRANT, C. E. DRYDEN.

Chemical Engineering Plant Desing.
Pag. 189-195
Edit. McGraw Hill Kogakusha, LTD. Japan.
1 9 5 9 .