

Adviene

15



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

PRODUCCION DE PECTINASA Y PROTEASA
POR ASPERGILLUS NIGER.

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a n

EDGARDO BEST GUZMAN

SERGIO ANDRES HERNANDEZ SANDOVAL

México, D.F.

1978



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.

LAO. TESIS 1978
ADE M. G. 60
PROMA _____
TITULO _____
AUTOR _____



PRESIDENTE: ENRIQUE GARCIA GALEANO

VOCAL: EMILIO BARRAGAN HERNANDEZ

SECRETARIO: FIDEL FIGUEROA MARTINEZ

1er. SUPLENTE: EDUARDO BARZANA GARCIA

2do. SUPLENTE: WENCESLAO FUENTES SOLIS

Sitio donde se desarrolló el tema: LAB. 202 FACULTAD DE QUIMICA

Nombre completo y firma de los sustentantes: EDGARDO BEST GUZMAN
y SERGIO ANDRES HERNANDEZ SANDOVAL.

Nombre completo y firma del asesor del tema:

EMILIO BARRAGAN HERNANDEZ.

INDICE

I INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1. Introducción.....	2
2. Objetivos.....	3

II GENERALIDADES

1. Generalidades.....	5
2. Substancias pécticas.....	6
Enzimas pécticas.....	11
Mecanismo de acción de las pectinasas.....	15
3. Proteínas.....	19
Enzimas proteolíticas.....	28
Mecanismo de acción de las proteasas ácidas.....	32
4. <i>Aspergillus niger</i>	35
Características.....	35
Clasificación.....	36
Importancia.....	37
Patología.....	40
Producción de pectinasas por <i>Aspergillus niger</i>	40
Producción de proteasas por <i>Aspergillus niger</i>	43
Fermentación.....	44

√ III DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

1. Diseño del medio de cultivo.....	47
2. Materias primas.....	47
3. Fuentes de energía.....	48
4. Fuentes de carbono.....	48
5. Fuentes de nitrógeno.....	48
6. Fuentes de minerales y agua.....	49

√ V CALCULOS

1. Diseño del medio de cultivo.....	51
2. Solución reguladora.....	59

√ VI INDUCCION

1. Obtención de la cepa.....	66
2. Aislamiento y cultivo.....	66
3. Inducción.....	69
4. Fermentación en matraces con agitación.....	70
5. Evolución de la etapa de inducción.....	75

√ VI MATERIALES Y METODOS EMPLEADOS

1. Determinación de actividad pectolítica. Método General Volumétrico de Lane-Eynon.....	77
2. Determinación de actividad pectolítica. Método del ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS)....	83
3. Determinación de actividad proteolítica Método de Sorensen.....	88

4. Determinación del número total de microorganismos - por conteo en placa.....	91
--	----

VII GRAFICAS

1. Determinaciones con pectinasas.....	95
2. Determinaciones con proteasas.....	96

√ VIII FERMENTACION

1. Descripción del fermentador Microferm Serie MF 200.	102
2. Determinación de las condiciones de trabajo fija-- das durante la fermentación.....	105
3. Determinación de las condiciones efectuadas duran-- te la fermentación. Resultados.....	106

√ IX PRECIPITACION DE LAS ENZIMAS

1. Resultados de la precipitación de las enzimas.....	109
---	-----

√ X DISCUSION

1. Discusión.....	110
2. Inducción.....	112
3. Gráficas.....	114
4. Extracción de las enzimas.....	118

√ XI CONCLUSIONES

√ XII BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

OBJETIVOS

INTRODUCCION

Desde comienzos de la humanidad, se observan contactos del hombre con algún producto en el que va involucrada alguna etapa fermentativa. Así, se presentan el vino, el vinagre, quesos y panes por citar algunos ejemplos.

Estas etapas fermentativas se aceptan como un fenómeno natural y sin trascendencia, pasando a formar parte de un trabajo artesanal o de un núcleo pequeño de personas que "cultivaban" el arte de elaborar algún producto fermentado.

Los microorganismos aparecen a los ojos del hombre - entre los siglos XVII y XVIII gracias al paciente trabajo de Antonio Van Leeuwenhoek, quien de manera empírica elabora técnicas de observación empleando para ello rústicos instrumentos de trabajo, bajo la severa mirada de las sociedades científicas de esa época.

Pese a muchas dificultades, el avance científico siguió su marcha apareciendo grandes personalidades que dejaron una huella imborrable en este campo, tales como Spallanzani, Pasteur, Raistrick y Fleming entre otros.

Hoy en día, las técnicas microbiológicas empleadas - en procesos industriales fermentativos han evolucionado, y - aunque el campo es amplio aún, los avances de la Química, Biología, Bioquímica e Ingeniería han ayudado a realizar este trabajo en el desarrollo de ésta área.

OBJETIVOS.

El primer objetivo de este trabajo es contribuir al estudio de dos enzimas con actividad proteolítica ya que éstas tienen múltiples usos en la industria.

El segundo objetivo es el de tratar de cubrir las deficiencias que aquejan a nuestra industria en el campo de la Enzimología, puesto que la información en nuestro País sobre este campo no es abundante. Son pocas las industrias que producen enzimas y en diversas ocasiones los industriales las tienen que importar, siendo la producción insuficiente en este campo.

El tercero y último es el de hacer llegar esta información de una manera sencilla y concreta al estudiante, durante su preparación.

II GENERALIDADES

- 1. Generalidades.....
- 2. Substancias pécticas

 - Enzimas pécticas.....
 - Mecanismo de acción de las pectinasas.....

- 3. Proteínas

 - Enzimas proteolíticas
 - Mecanismo de acción de las proteasas ácidas..

- 4. Aspergillus niger.....

 - Características.....
 - Clasificación
 - Importancia.....
 - Patología.....
 - Producción de pectinasas por Aspergillus ni--
ger.....
 - Producción de proteasas ácidas por Aspergi- -
llus niger.....
 - Fermentación.....

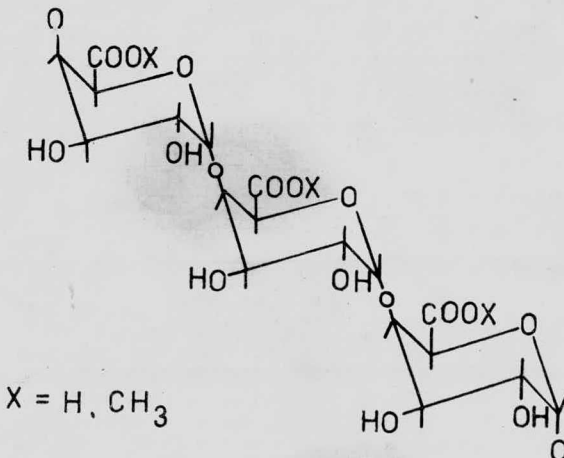
GENERALIDADES

SUBSTANCIAS PECTICAS.

Las sustancias pécticas son complejos coloidales - compuestos por carbohidratos, se presentan junto con otros - constituyentes como la celulosa en las plantas superiores formando parte de la capa intercelular llamada lamela media. Está compuesta de ácido polianhidrogalacturónico, los grupos - carboxilo del ácido pueden estar parcialmente esterificados - por grupos metoxilo y parcial o totalmente neutralizados por una o más bases. (8, 13, 23 y 29). *← hoy esta en carboxe- 10-110.*

La estructura de las sustancias pécticas es una cadena formada por ácido galacturónico en forma piranosida, unida por enlaces glucosídicos alfa-1, 4. (11 y 13).

ESTRUCTURA DE LAS SUBSTANCIAS PECTICAS.



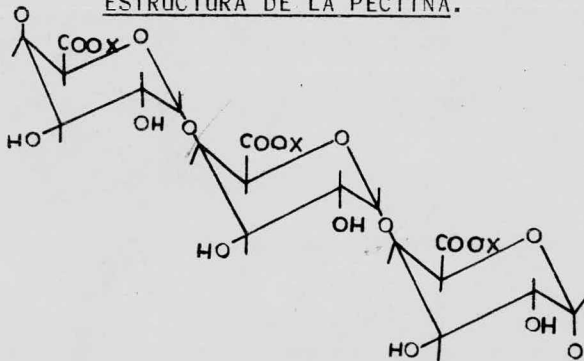
Las sustancias pécticas se dividen en 4. [(8, 13, 23, 29)]. como sigue:

Protopectina.- Porción insoluble de las sustancias pécticas asociada a la celulosa que por hidrólisis forma pectina o ácidos pectínicos.

Acidos Pectínicos.- Son polímeros coloidales del ácido anhidrogalacturónico conteniendo una porción insignificante de grupos carboxilo esterificado. En condiciones adecuadas son capaces de formar geles con azúcar y ácido, o también con ciertos iones metálicos cuando su bajo contenido de metoxilos es adecuado.

Pectina.- Son ácidos pécticos solubles en agua, su contenido de metoxilos varía así como su grado de neutralización. Son capaces de formar geles con azúcar y ácido, bajo ciertas condiciones.

ESTRUCTURA DE LA PECTINA.



X = CH₃

Ácidos Péclicos.- Son cadenas de ácido anhidrogala-
turónico sin esterificar en estado coloidal. Pueden estar -
parcial o totalmente neutralizados formando los llamados pec-
tatos.]

Las substancias pécticas pueden formar dos tipos de
geles, principalmente: [(8 y 13)]

- 1) Los ácidos pécticos y pectínicos, en ausencia o adición -
de azúcar, pueden formar un gel cuando se añade Ca (II) -
u otros cationes alcalinotérreos a suspensiones de ácido-
péctico fibroso o de ácido pectínico con un bajo conteni-
do de metoxilos.
- 2) La pectina forma un gel en presencia de ácido y con canti-
dades relativamente altas de azúcar.

Las pectinas y ácidos pectínicos altamente metoxila-
dos no forman geles con el $CaCl_2$ en soluciones acuosas.

El poder de las pectinas de formar geles depende -
principalmente del tamaño de la molécula, cualquier pretrata-
miento que tienda a disgregar la cadena de ácido polianhidro-
galacturónico ocasiona una pérdida en el poder gelificador.

[(13)]

[Cuando el contenido de metoxilos de la pectina dismi-
nuye abajo del 3 ó 4%, la pectina precipita de la solución; -
pero es posible formar geles cuando se aumenta el contenido -]

Lo q̄i esta en corchetes no.

de azúcar a un 65% utilizando pectina con un 3.5% de metoxilos. Conforme baja el contenido de metoxilos la fuerza de gelificación es mayor, hasta llegar a un máximo en el 8%. (13)

El pH máximo para la formación del gel utilizando pectina con un índice de esterificación del 10 al 11% es de 3.5, y 2.9 para la pectina con 5% de metoxilos. (13)

La formación de geles utilizando pectina, azúcar y ácido se lleva a cabo de la siguiente manera: acordando que la pectina es un coloide hidrofílico cargado negativamente y estabilizado por una capa de agua que rodea las micelas individuales, la precipitación de la pectina como agregados ramificados de micelas dá el gel, el cual es una estructura reticular en presencia de azúcar que funciona como agente deshidratante e iones hidrógeno que funcionan reduciendo las cargas negativas de la pectina, permitiendo a la pectina unirse en forma de red de fibras insolubles. (13)

Las peclinas que contienen un grado de esterificación mayor del 70% gelifican rápidamente y a mayor temperatura; las que contienen del 50 al 70% gelifican lentamente y a menor temperatura; y, las que contienen menos del 70% gelifican rápidamente y se utilizan en la formación de geles con bajo contenido de sólidos. (23)

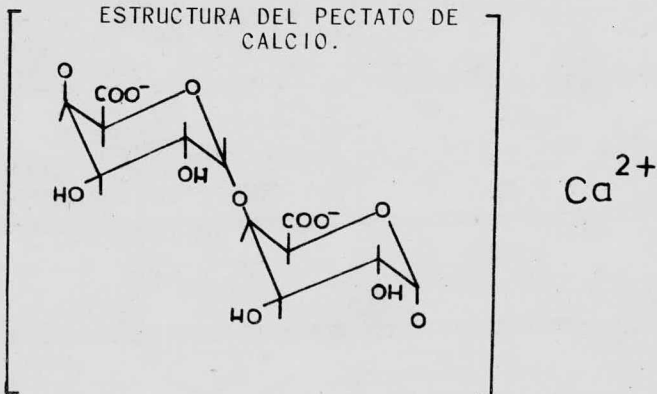
La fuerza de gelificación la determinan los fabricantes utilizando diferentes unidades, de acuerdo al método empleado. Las unidades más conocidas son:

Grado de Gelificación.- Son los gramos de azúcar - que puede gelificar un gramo de pectina en forma satisfactoria. (8)

Grado US-SAG.- Cuando el gel se coloca invertido - sin recipiente, el decremento en la altura se lee como % de - sag con la ayuda de un micrómetro. (7)

Grado Blomm.- Se utiliza el penetrómetro, el cual - contiene una plomada de peso determinado que se introduce en el gel a una cierta distancia y en un determinado tiempo. La fuerza necesaria para introducir la plomada se mide, se obtiene la lectura correspondiente a la fuerza de gelificación, para lo cual se compara con una serie de patrones. (8)

La cantidad de pectina en el medio puede ser determinada por el método volumétrico del pectato de Ca, o bien, por gravimetría precipitando la pectina con etanol, ácido tricloroacético con CaCl_2 . (11)



Las fuentes de obtención de las sustancias pécticas son los cítricos y la manzana principalmente. La pectina y los ácidos pécticos y pectínicos se obtienen hidrolizando la protopectina en medio ácido y calentando. Las diferentes fracciones se separan por medio de una precipitación electro-lítica, coloidal y por adición de sales. (23)

USOS.

Algunos usos de las sustancias pécticas son los siguientes: en la preparación de jaleas, gelatinas y mermeladas; como agente emulsificante en la preparación de emulsiones de aceites esenciales; en la clarificación de jugos y bebidas fermentadas; en la retención de la turbidez y homogeneidad de jugos como el de tomate y de cítricos; en la preparación de fibras textiles y pulpa de madera; como dispersante de gomas en la preparación de terapéuticos; en la obtención del ácido d-galacturónico del cual se puede sintetizar el ácido 1-ascórbico; y otros usos en diversas industrias como la del hule, acero y pinturas. (13, 23 y 29)

ENZIMAS PÉCTICAS.

Las enzimas pécticas se pueden clasificar en tres - categorías, principalmente: [(10, 14, 17, 21 y 28).]

- 1) Protopectinasas.
- 2) Pectinasas.
- 3) Pectasas.

1) Protopectinasas.- Se les conoce también como pectosinasas y propectinasas. Es la enzima que hidroliza la protopectina dando pectina soluble, también ataca la substancia intercelular con la maceración resultante del tejido. La existencia de estas enzimas no ha sido firmemente establecida, sus propiedades son en muchos aspectos similares a la pectina sa.

2) Pectinasas.- Se les conoce también como poligalacturonasas pectolasas y pectinopoligalacturonasas. Catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de la pectina y de los ácidos pécticos y pectínicos, convirtiéndolos en ácido metil-galacturónico o ácido galacturónico según sea el caso.

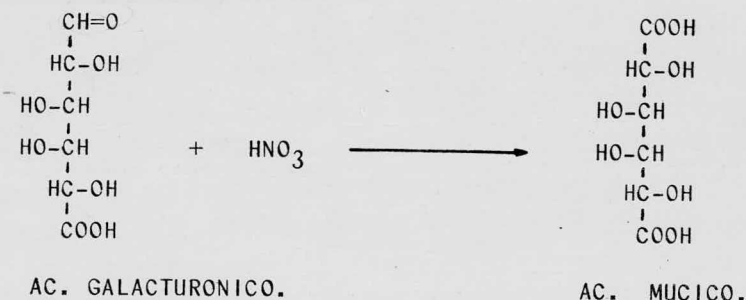
Las pectinasas son producidas por algunos hongos como el Aspergillus niger, Penicillium expansum, Rhizopus tritici, Sclerotinia rofsii, Phytium sp. y Geotricum candidum; por levaduras como el Saccharomyces fragilis; y por algunas bacterias como Erwinia carotovora y E. chrysanthemi. También se encuentra en tomates y zanahorias pero la actividad de estas es mínima.

[(10, 14, 28, 29 y 31).]

La acción de las pectinasas puede medirse por varios métodos, entre los cuales están los siguientes:

- a) Por precipitación de la pectina o ácido péctico no hidrolizado con iones Ca, etanol o $\text{Cl}_3\text{C}-\text{COOH}$. [(6, 10, 11, 14 y 21).]
- b) Por un aumento en el poder reductor, causado por la liberación de grupos aldehído del ácido galacturónico o uno de sus polímeros. [(10, 14, 21).]
- c) Por precipitación del ácido múcico, tratando el ácido galacturónico con ácido nítrico. [(9)]
- d) Por el descenso en la viscosidad de la solución de pectina bajo la acción de la enzima. [(10, 14 y 21).]
- e) Midiendo el descenso en el poder de gelificación. [(28)]
- f) Siguiendo el descenso en la rotación óptica durante la hidrólisis del ácido poligalacturónico. [(10, 14 y 21).]

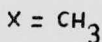
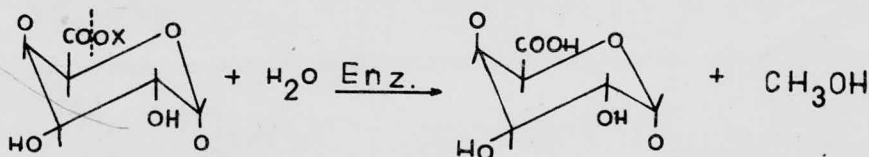
REACCION DEL ACIDO GALACTURONICO CON HNO_3 .



Las pectinasas actúan en un rango de pH de 3 a 6 de acuerdo a la procedencia de la enzima. Aumenta su actividad en presencia de sales alcalinas y en presencia de pectasas. - Es inhibida por el catión Mg (II) y por protefnas inertes. - Su temperatura óptima va de 30°C a 50°C , pero se inactiva a 75°C . [(14, 17, 21 y 29).]

3) Pectasas.- Se les conoce también con los nombres de pectinesterasas, pectinmetoxilasas y pectinmetilesterasas. Cataliza la hidrólisis de los enlaces ester de las sustancias pécticas, obteniéndose metanol y ácido poligalacturónico.

ACCION DE LA PECTASA.



Las pectasas son producidas por plantas superiores - como la alfalfa, naranjo y tomate; por hongos como Coniophora cerebella; y por bacterias como Erwinia ap., Xanthomonas campestris y X. vasculorum. Se encuentran usualmente en conjunción con pectinasas.] (10, 14, 28, 29 y 31).

La determinación de la actividad de las pectasas se realiza por varios métodos.] (10, 14 y 21). Como los que se mencionan.

- a) Por determinación del metanol generado.
- b) Por determinación de los grupos carboxilo liberados.
- c) Por formación de geles.

Las pectasas de hongos tienen su pH óptimo en medios ácidos, alrededor de 5, mientras que las pectasas de las plantas son inactivas a pH de 4.25 y su óptimo es alrededor de 8. Las pectasas son activadas en presencia de Na y Ca, y 50°C no pierden actividad pero a 62°C se inactivan.] (14, 17, 21 y 29).

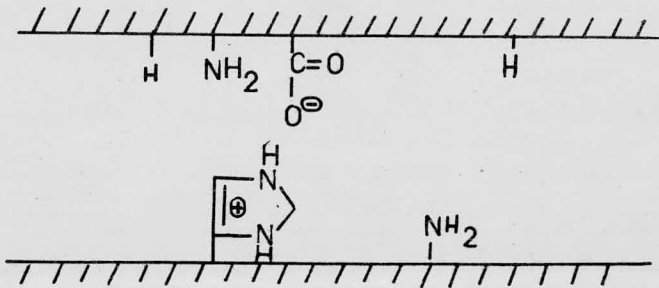
USOS.

Las enzimas pécticas se usan en la clarificación de bebidas fermentadas como vinos blancos y tintos con alto contenido de taninos. También se utilizan para facilitar la filtración de jugos de frutas con alto contenido de pectina. - (14, 17 y 21)

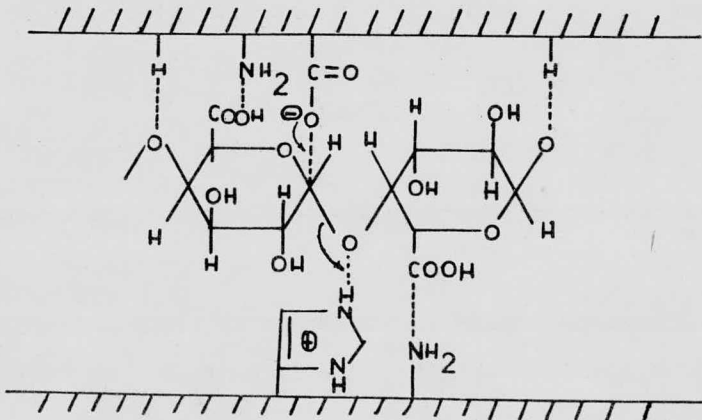
MECANISMO DE ACCION DE LAS PECTINASAS.

La hidrólisis del enlace glucosídico alfa-1,4 de la cadena de ácido poligalacturónico se lleva a cabo en cuatro etapas. La enzima contiene en su sitio activo un grupo carboxilo y un grupo imidazol. (36)

ESQUEMA DEL SITIO ACTIVO DE LAS PECTINASAS.

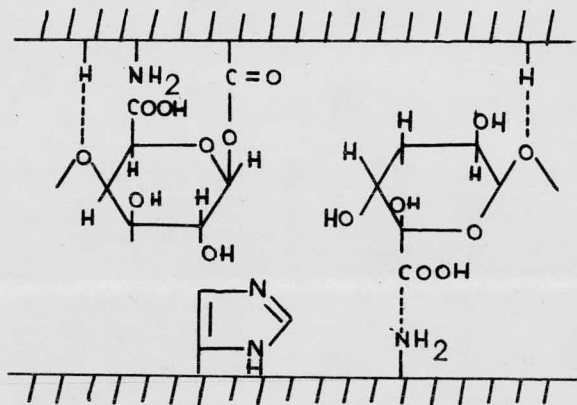


La primera etapa consta de la interacción del grupo carboxilo con el carbono 1 del ácido galacturónico, simultáneamente interacciona el oxígeno del enlace glucosídico con el grupo imidazol.



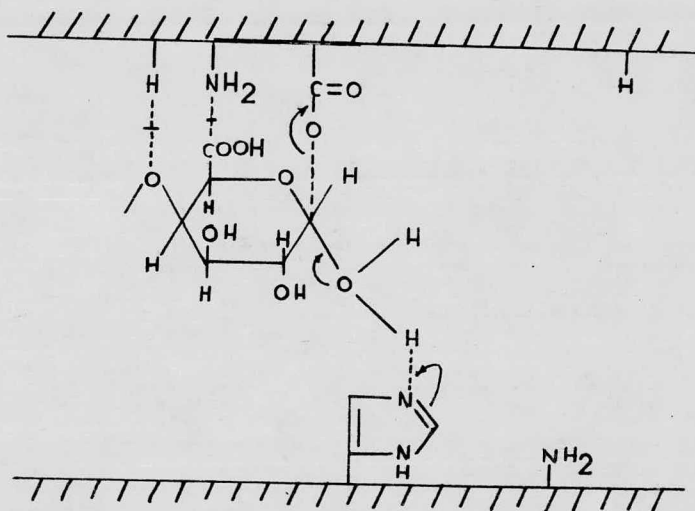
La segunda etapa es la ruptura del enlace glucosídico, el carbono 1 de uno de los residuos queda unido al grupo carboxilo, el grupo imidazol forma una doble ligadura al perder un hidrógeno el cual se une para formar un grupo oxidrilo en el carbono 4 del otro residuo, quedando éste último libre.

SEGUNDA ETAPA.



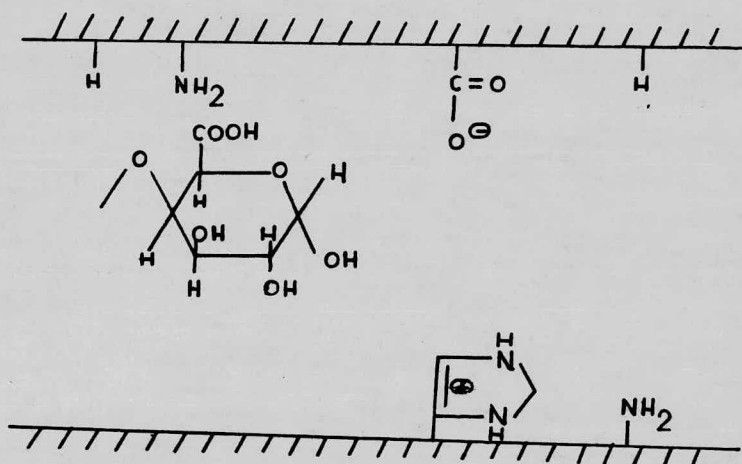
La tercera etapa es la intervención de una molécula de agua la cual interacciona simultáneamente con el ácido galacturónico y con el grupo imidazol, rompiendo el enlace del residuo con el grupo carboxilo.

TERCERA ETAPA.



La cuarta y última etapa es la liberación del residuo del sitio activo de la enzima, la molécula de agua se descompone, uniéndose el oxidrilo al carbono 1 del residuo y el hidrógeno se une al grupo imidazol, volviendo el sitio activo de la enzima a su estado inicial.

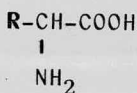
CUARTA ETAPA.



PROTEINAS.

Las proteínas son macromoléculas constituidas por C, H, O y N, algunas de ellas contienen además otros elementos - como el S, P, Fe, Cu y Zn; su peso molecular es elevado. Las proteínas están constituidas por compuestos orgánicos de bajo peso molecular, los alfa-aminoácidos, estos compuestos contienen por lo menos un grupo carboxilo y un grupo alfa-amino, pero difieren cada uno de ellos en la estructura de sus radicales. (20 y 29)

ESTRUCTURA GENERAL DE LOS ALFA-AMINOACIDOS.



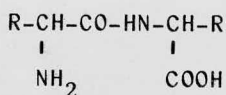
Veinte diferentes alfa-aminoácidos son comunmente encontrados en las proteínas, los cuales son: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, metionina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, fenilalanina, tirosina, prolina, histidina y triptofano. Otros aminoácidos como la hidroxiprolina y la hidroxilisina se encuentran en algunas proteínas como la elastina. (20 y 29).

La mayoría de estos aminoácidos son obtenidos por la hidrólisis de proteínas o mediante procesos fermentativos, algunos de ellos como la alanina, glicina y metionina son produ

cidos por síntesis química. (20 y 29)

En las moléculas proteicas, los aminoácidos están - unidos por enlaces amídicos covalentes llamados enlaces peptídicos, en estos enlaces se elimina una molécula de agua por - la unión del grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo alfa-amino de otro. Estas macromoléculas llamadas polipéptidos pueden contener cientos de aminoácidos. Las proteínas pueden estar formadas por una o más cadenas de polipéptidos.

ENLACE AMIDICO.



Los diferentes niveles de la estructura proteica se definen de la siguiente manera: (20)

Estructura Primaria.- Es la secuencia de aminoácidos en una cadena lineal.

Estructura Secundaria.- Es el arreglo helicoidal de la cadena de aminoácidos la cual presenta puentes de hidrógeno entre diferentes partes de la molécula.

Estructura Terciaria.- Es el arreglo espacial de la hélice en forma de proteínas globulares y fibrosas.

Estructura Cuaternaria.- Es el arreglo espacial de las cadenas de polipéptidos de la proteína en relación uno con respecto a los otros.

Las proteínas pueden clasificarse de acuerdo a cuatro diferentes criterios:

- I) Por su composición.
- II) Función Biológica.
- III) Solubilidad.
- IV) Valor Nutritivo.

I) Por su composición las proteínas se pueden clasificar en dos: (20)

a) Simples.- Son aquellas proteínas que al ser hidrolizadas se obtienen solamente aminoácidos.

b) Conjugadas.- Son aquellas proteínas que por hidrólisis no solo se obtienen aminoácidos sino también compuestos orgánicos o inorgánicos, a esta última porción de la proteína conjugada se le dá el nombre de grupo prostético. Las proteínas conjugadas se dividen de acuerdo a su grupo prostético en: nucleoproteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, fosfoproteínas, hemoproteínas, flavoproteínas y metaloproteínas.

II) Por su función biológica las proteínas pueden ser: proteínas de transporte, de almacenamiento, de protección en sangre, contráctiles, enzimas, hormonas y toxinas. (20)

III) Por su solubilidad las proteínas se dividen en -
2: (29)

a) Escleroproteínas.- Son proteínas fibrosas e insolubles que forman materiales estructurales en tejidos animales como la queratina en pelo, lana y uñas; la colágena en piel y tendones; la seda y la elasticidad en ligamentos y tejidos conectivos.

b) Las proteínas globulares que a su vez se dividen en 5:

1) Albúminas.- Son solubles en agua, coagulan con el calor, precipitan fácilmente con el sulfato de amonio. Entre éstas están la lactoalbúmina y la ovalbúmina.

2) Globulinas.- Insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas diluidas, precipitan con el sulfato de amonio a saturación media. Entre éstas están las proteínas del suero de sangre y las proteínas de las semillas de oleaginosas.

3) Prolaminas.- Insolubles en agua y en alcohol absoluto, pero solubles en alcohol del 70 al 80%. La zeína es una de ellas.

4) Glutelinas.- Insolubles en agua, en soluciones salinas y en alcohol. Son solubles en ácidos y álcalis fuertes. La glutelina es un ejemplo de estas proteínas.

5) Histomas.- Contienen gran número de aminoácidos básicos y son solubles en agua, precipitan fácilmente con sulfato de amonio. Forma sales con los ácidos.

IV.- Por su valor nutritivo las proteínas se dividen en 2: (3 y 5)

a) Proteínas de alto valor nutritivo.- Son aquellas que contienen los ocho aminoácidos esenciales para el hombre en cantidad y en proporción adecuada. Se les llama aminoácidos esenciales a aquellos aminoácidos que el organismo humano no puede sintetizar y que tienen un papel muy importante en la síntesis de proteínas en el organismo, su carencia origina estados patológicos. La siguiente tabla muestra los aminoácidos esenciales así como la cantidad que se requiere ingerir de cada uno de ellos diariamente.

REQUERIMIENTOS DIARIOS DE AMINOACIDOS ESENCIALES.

Aminoácidos	Cantidad/Día (gr).
Fenilalanina	2.2
Metionina	2.2
Leucina	2.2
Valina	1.6
Lisina	1.6
Isoleucina	1.4
Treonina	1.0
Triptofano	0.5

Las proteínas de alto valor nutritivo son conocidas también como proteínas de alto valor biológico, éste último se define como el % de N absorbido por el organismo para su sostén y crecimiento. El valor biológico de las proteínas depende de alto grado, de su composición de aminoácidos esenciales. Estas proteínas se encuentran principalmente en proteínas de origen animal como el huevo, la leche, la carne y algunas mezclas de proteínas de origen vegetal que eliminan la carencia de uno o más aminoácidos esenciales al ser mezclados en proporciones adecuadas, como en el caso de cereal-leguminosa.

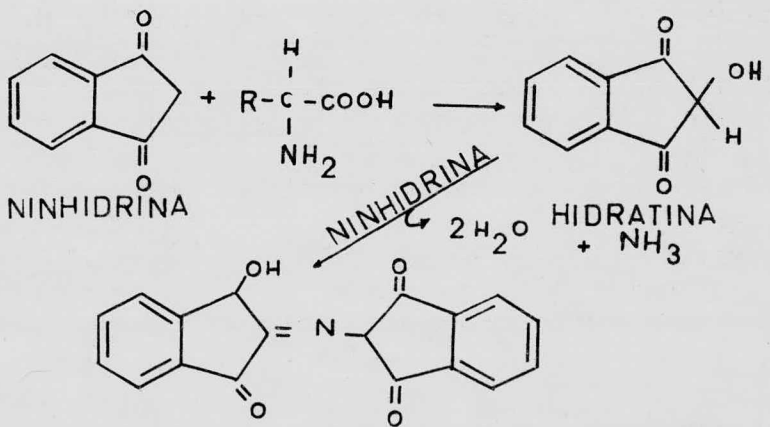
Es recomendable ingerir un gramo de proteínas por cada kilogramo de peso, diariamente, de esta cantidad la tercera parte debe ser proteína de alto valor nutritivo.

b) Proteínas de bajo valor nutritivo.- Son aquellas proteínas que no contienen todos los aminoácidos esenciales en cantidad y en proporción adecuada. Estas proteínas se encuentran en alimentos de origen vegetal tales como cereales, verduras, legumbres y frutas.

La determinación cuantitativa de proteínas se lleva a cabo por varios métodos. (20, 22, 24 y 37)

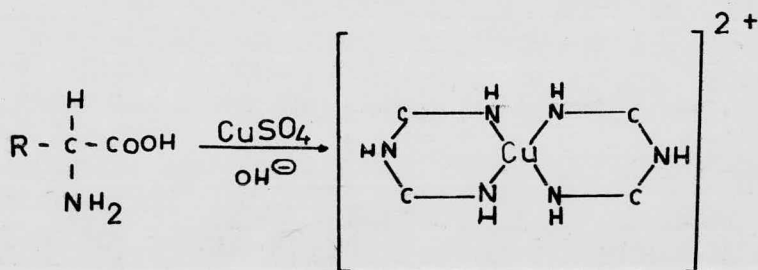
1) Utilizando ninhidrina la cual reacciona con el nitrógeno del aminoácido terminal cuantitativamente, formando compuestos coloridos. Esta reacción se utiliza en procesos de electroforesis y en cromatografía.

REACION DE LA NINHIDRINA CON LOS AMINOACIDOS.



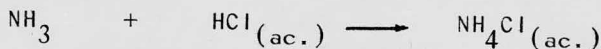
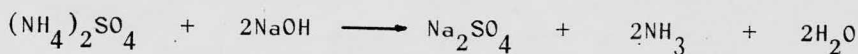
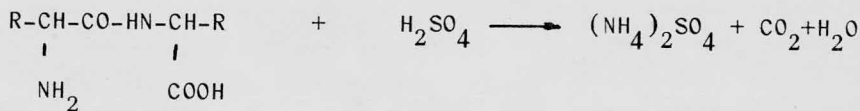
2) La reacción de Biuret la cual no se lleva a cabo con aminoácidos libres, sino solo con péptidos y proteínas. - Se trata la proteína con Cu (II) en medio alcalino dado un - complejo de color púrpura, que puede ser medido cuantitativamente en un espectrofotómetro.

REACCION DE BIURET.



3) El método de Kjeldahl, consiste en determinar el nitrógeno proteico como amoníaco, para lo cual se destruye la materia orgánica en medio ácido y calentando, después se neutraliza el medio y se destila el amoníaco el cual se recoge en una solución ácida para formar la sal correspondiente, y por último se titula el exceso de ácido con una base. (2)

REACCIONES DEL METODO KJELDAHL.



La cantidad de aminoácidos individualmente puede -
 cuantificarse, para lo cual la protefna es completamente hi--
 drolizada. La hidrólisis se lleva a cabo calentando la pro--
 tefna con un exceso de HCl 6N, de 100 a 120°C y de 10 a 24 ho--
 ras. Con esta hidrólisis se destruye el triptofano, si se -
 quiere determinar la hidrólisis se lleva a cabo en medio alcali--
 no.

Los métodos más utilizados en la cuantificación de -
 aminoácidos son la cromatografía en papel, en placa fina, de
 intercambio iónico, electroforesis y por un método automático
 utilizando un aparato llamado analizador de aminoácidos. (20)

ENZIMAS PROTEOLITICAS.

Las enzimas proteolíticas o proteasas son aquellas - que catalizan la hidrólisis de los enlaces amídicos de las - proteínas. Se pueden clasificar conforme a tres diferentes - criterios: (15, 16 y 31)

- I) Por su origen.
- II) Por naturaleza química de su sitio activo.
- III) Por el sitio donde actúan.

I) Las enzimas por su origen son: papaína, - bromelina y ficina de plantas; tripsina y quimotripsina del - pancreas; pepsina y renina del estómago y enzimas microbianas producidas por hongos y bacterias.

II) Por la naturaleza química de su sitio activo las - proteasas se pueden dividir en cuatro:

a) Las serina proteasas.- Contienen un grupo seril - en el sitio activo. Estas enzimas son fuertemente inhibidas - por el diisopropilfosfofluorhidrato (DFP), el cual reacciona - con los grupos hidróxido en un residuo seril específico. To-- das estas enzimas son endopeptidasas. La tripsina, quimotrip - sina, elastasa y subtilisina pertenecen a este grupo.

b) Las sulfidril proteasas.- Su actividad depende de la presencia de uno o más grupos sulfidrilos en el sitio acti - vo. Los agentes oxidantes, alquilantes y metales pesados -

inhiben su acción ya que se unen a los grupos tiol. Son activadas en presencia de ácido ascórbico, cisteína y glutatión.- Este grupo incluye a la papaína, bromelina, ficina y algunas proteasas microbianas.

c) Las metaloproteasas.- Su actividad depende de la presencia de un metal, generalmente en una relación estequiométrica con la molécula proteica. Estos metales pueden ser - Mg, Zn, Co, Fe, Hg, Cd, Cu, Ca o Ni. Estas enzimas son fuertemente inhibidas por cianuros y metales venenosos. En este grupo se encuentran la carboxipeptidasa A, algunas aminopeptidasas y algunas proteasas bacterianas.

d) Las proteasas ácidas.- Presentan dos grupos carboxilo en el sitio activo. Son inhibidas por el p-bromofenacil bromuro o por agente diazo. Estas enzimas actúan en un pH bajo en un rango 2 a 4. A este grupo pertenecen la pepsina y muchas de las enzimas producidas por hongos como el Aspergillus niger.

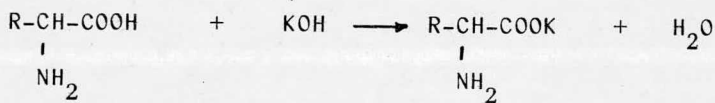
III) Por el sitio donde actúan las proteasas estas se dividen en 2:

a) Exopeptidasas.- Son aquellas enzimas que atacan los aminoácidos terminales de la cadena, hidrolizando el enlace amídico. Los aminoácidos terminales presentan uno o más - grupos polares libres, tales como grupos carboxilo o alfa-amino los cuales son necesarios para la acción de estas enzimas.

b) Endopeptidasas.- Hidrolizan los enlaces peptídicos en el interior de la cadena aunque los aminoácidos no con tengan grupos polares libres.

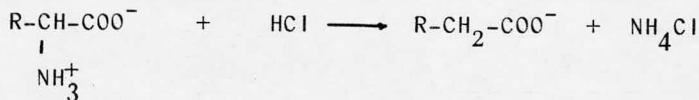
Los métodos empleados en la estimación de la acción de las proteasas, depende de la estimación de los grupos alfa amino o carboxilo liberados. Estos son equivalentes excepto cuando el N imino de la prolina o de la hidroxiprolina forma parte del enlace peptídico. Los grupos carboxilo se determinan con una titulación empleando potasa alcohólica.

DETERMINACION DE LOS GRUPOS CARBOXILO LIBRES.



Los grupos alfa-amino se determinan titulando con HCl diluido en acetona.

DETERMINACION DE LOS GRUPOS ALFA-AMINO LIBRES.



También se puede determinar la acción de las proteasas, cuantificando la cantidad de aminoácidos liberados por medio de reacciones coloridas empleando ninhidrina, o bien, por medio de cromatografía.

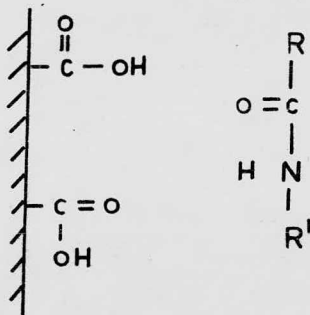
USOS.

Las proteasas se utilizan en la tenderización de la carne, en el proceso cervecero, en la preparación de hidrolizados proteicos, en la fabricación de quesos, en la industria panadera para modificar la fuerza del gluten del trigo, para prevenir la gelatinización de los condensados solubles de pescado, en la maduración de quesos y carnes, en la preparación de alimentos orientales, en detergentes, en el curtido de pieles y en la preparación de medicamentos. (15, 16, 29 y 31)

MECANISMO DE ACCION DE LAS PROTEASAS ACIDAS.

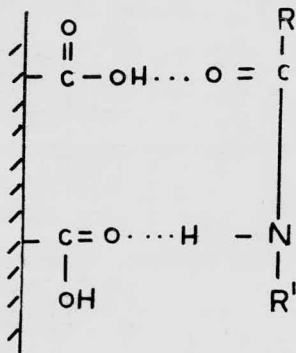
La hidrólisis del enlace peptídico de la proteína se lleva a cabo en cuatro etapas. La enzima contiene en su sitio activo dos grupos carboxilo. (12 y 36)

ESQUEMA DEL SITIO ACTIVO DE LAS PROTEASAS ACIDAS.



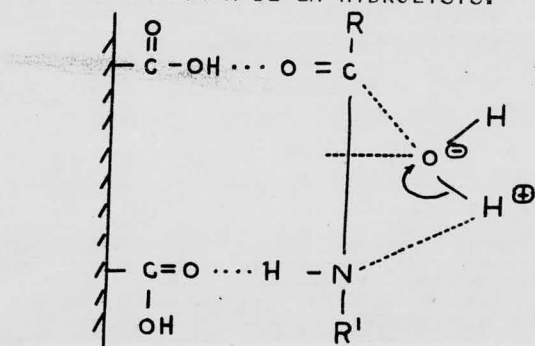
La primera etapa consta de la interacción, tanto del grupo carboxilo como del grupo alfa-amino del enlace peptídico, con cada uno de los grupos carboxilo en el sitio activo - por medio de puentes de hidrógeno.

PRIMERA ETAPA DE LA HIDROLISIS.



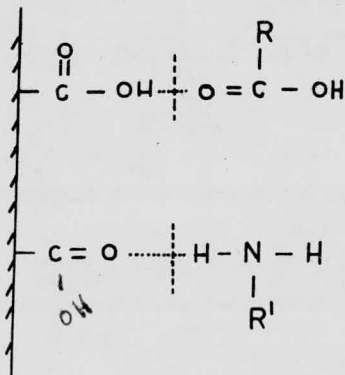
La segunda etapa es la intervención de una molécula de agua, interaccionando uno de los hidrógenos con el grupo alfa-amino y el oxidrilo con el grupo carboxilo del enlace peptídico.

SEGUNDA ETAPA DE LA HIDROLISIS.



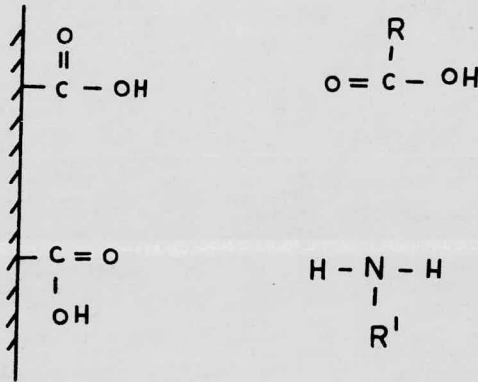
La tercera etapa de hidrólisis consta de la unión del ión hidrógeno al grupo alfa-amino y el ión oxidrilo al grupo carboxilo, rompiéndose el enlace peptídico.

TERCER ETAPA DE LA HIDROLISIS.



La cuarta y última etapa consta de la ruptura de los puentes de hidrógeno que interaccionaban tanto con el grupo - alfa-amino como con el grupo carboxilo con los dos grupos carboxilo en el sitio activo de la enzima, quedando libres los dos residuos de la proteína hidrolizada.

CUARTA ETAPA DE LA HIDROLISIS.



ASPERGILLUS NIGER.

→ La designación de Aspergillus niger es comunmente - utilizada para agrupar a una gran cantidad de Aspergillus que difieren en detalles morfológicos, pero que tienen en común - la producción de cabezas conidiales de color negro, café-negruzco, café-púrpura o en algunas cadenas son de color más ligero, pero conservan la apariencia general del grupo. [(27 y 34)] ↑

CARACTERISTICAS.

✓ Sinónimo: Sterigmatocystis nigra.

Colonias de crecimiento rápido con abundante micelio sumergido, incoloro, en algunas colonias con un color ligeramente amarillo en la hifa y en el substrato; con hifa aerea - escasamente producida, pero abundante en ciertas cadenas viejas. Las cabezas conidiales son de color fusco, café-negruzco, café-púrpura o negro carbón, variando en intensidad de acuerdo a la materia colorante producida. Las conidias son - típicamente globulares o radiales, comunmente mayores de 300, 500 y ocasionalmente de 1000 micras de diámetro, con divisiones periféricas en las columnas radiales de las conidias; las cabezas pequeñas, más o menos columnares que consisten de pocas cadenas conidiales, a menudo nacen como hifas rastreras o conidióforos cortos cerca del substrato. ←

La mayoría de los conidióforos crecen directamente del substrato, son incoloros, amarillos o cafés cerca de la vesícula solamente; son lisos, con paredes gruesas, frecuentemente irregulares en la superficie interior y se dividen longitudinalmente en tiras cuando se rompen. Son unseptados, pero algunas veces presentan una septa delgada, variando considerablemente en longitud y en diámetro en las diferentes cadenas, en colonias en diferentes medios y aún en secciones de la misma colonia. Los conidióforos de las cadenas varían de 200 a 400 micras de longitud por 7 a 10 micras de diámetro, por formas que van de algunos mm de longitud por 20 o más micras de diámetro.

Las vesículas son globulares o subglobulares, de paredes gruesas, de 20 a 50 micras y en algunas cadenas arriba de 100 micras de diámetro, son incoloras o café-amarillentas.

La esterigmata se presenta en una serie de cadenas jóvenes y en cabezas pequeñas, pero típicamente se presenta en dos series incoloras ocasionalmente, usualmente de color intenso llegando al color negro carbón. La esterigmata primaria, la cual cubre la vesícula, varía en tamaño en la misma colonia, va de 20 a 30 micras de longitud por 6 a 8 micras de diámetro. La esterigmata secundaria es más uniforme, va de 6 a 10 micras de largo por 2 a 3 micras de diámetro. Ambas series van de color café hasta el negro.

La conidia globular cuando ha madurado, es al principio de paredes lisas y de color café, cambia presentando pare

des rugosas o espinulosas, con substancia colorante depositada en el exterior de la pared primaria y en el interior de la secundaria, en forma de barras, bandas o tubérculos, con un diámetro de 2.5 a 4 micras y algunas veces arriba de 5 micras. (34)

CLASIFICACION.

Reino.- Vegetal.

División.- Thallophyta.

Subdivisión.- Deutoromucotina.

Orden.- Moniliales.

Familia.- Moniliaceae.

Género.- Aspergillus.

Grupo.- Aspergillus niger. (35)

El Aspergillus niger puede aprovechar fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas. Uno de los medios más utilizados para aislarlo es el de "Raulin Agar Neutral", pero este medio no es específico, ya que pueden crecer en él hongos de género Penicillium.

COMPOSICION DEL MEDIO DE RAULIN AGAR NEUTRAL.

Agua Destilada	100 cc.
Sacarosa	50.00 gr.
Acido Tartárico	0.40 "
MgCO ₃	0.25. "
NH ₄ NO ₃	2.50 "

K_2CO_3	0.40 gr.
$(NH_4)_2 HPO_4$	0.40 "
$(NH_4)_2 SO_4$	0.20 "
$FeSO_4$ crist.	0.05 "
$ZnSO_4$	0.05 "
Agar	20.00 "

Se esteriliza a 120°C por 20 minutos. (34)

IMPORTANCIA.

El Aspergillus niger es quizás el más común de todos los representantes del género, se encuentra ampliamente distribuido y ocurre en una gran variedad de substratos incluyendo granos, productos forrajeros, frutos y vegetales podridos, en fibras y tejidos de algodón, cuero, productos lácteos y otros substratos ricos en proteínas. Son abundantes en todos los suelos, sobre todo en las áreas tropicales y subtropicales. [(34)]

El Aspergillus niger es el hongo más empleado en la industria que cualquier otro hongo, en procesos fermentativos produce gran cantidad de compuestos, principalmente ácidos - como el gálico, cítrico, fumárico, glucónico y oxálico. Tam-

bién se le puede considerar productor de grasas, puesto que - el micelio contiene gran cantidad de éstos compuestos. [(27 y 34)]

Este hongo se caracteriza por la producción de una - gran variedad de enzimas entre los cuales tenemos las siguientes: [(27)]

Amilasa

Celobiasa

Celulasa

Cuajo

Emulsina

Gencianasa

Genciobiasa

Glucosidasa

Inulasa

Invertasa

Lipasa

Maltasa

Melicitasa

Nucleasa

Pectinasa

Proteasa

Rafinasa

Tanasa

Trehalasa

Zimasa

El Aspergillus niger ha sido satisfactoriamente empleado como un organismo de ensayo para determinar la deficiencia de minerales en suelos, particularmente deficiencias en P y K. Causa enmohecimiento en las superficies de maderas y en tejidos de algodón. Es usado para determinar la resistencia de pinturas de aceite, también para determinar la resistencia de tejidos y fibras de algodón al enmohecimiento. -

[(34)]

PATOLOGIA.

Variedades del Aspergillus niger son comunemente aisladas del oído externo del hombre, causan la Sterigmatocystis acústica de Cramer. Otras variedades causan la Otomycosis. - Un desarrollo intensivo de algunas de estas variedades causan infección en los pulmones, produciendo una pseudotuberculosis que puede persistir por largos periodos de tiempo, sin que - cause la muerte ni el completo recuperamiento del paciente.

Las esporas de este hongo se encuentran comunmente - en el aire y pueden fácilmente introducirse en el tracto digestivo, causando en algunas ocasiones reacciones alérgicas.-

(34)

↑ Hasta aquí metodología -

PRODUCCION DE PECTINASAS POR ASPERGILLUS NIGER.

Estudios realizados en la Universidad de Jadavpur, - India sobre la producción de pectinasas producidas por el - Aspergillus - niger JU, reportan las condiciones óptimas para la obtención de estas enzimas. (1, 25 y 38)

Se trabajó con matraces de 100 ml los cuales contienen 30 ml de medio. La actividad de la pectinasa producida fue determinada por medio del descenso en la viscosidad. Las variables estudiadas fueron pH, tiempo de incubación, temperatura, fuente de carbono, fuente de nitrógeno y la relación - C/N en el medio.

Las condiciones de cultivo óptimas fueron para la producción de pectinasas por el Aspergillus niger JU las siguientes: pH 4.5, durante un período de incubación de 7 días, a una temperatura de 30°C, inoculando con una suspensión de esporas conteniendo 5×10^3 esporas en 30 ml de medio.

El proceso con agitación fue superior al proceso estacionario dando un mayor rendimiento de enzima en un período más corto, esto indica que una adecuada aereación es esencial para el óptimo rendimiento de enzima. Estudios sobre el efecto de las fuentes de carbono sobre la producción de pectinasas por este hongo, indican que la pectina a un nivel del 4% da un máximo rendimiento en la producción de pectinasas. (1, 25 y 38)

Entre las fuentes de nitrógeno inorgánico el NH_4NO_3 da el óptimo rendimiento en un período de incubación de 7 días; mientras que el máximo rendimiento de estas enzimas fue obtenido con peptona como fuente de nitrógeno en el sexto día de incubación. Las fuentes de N orgánico fueron superiores a las de N inorgánico, dando un máximo rendimiento de pectinasas. (25)

El nivel de pectinasas durante la fermentación alcanzó su nivel máximo cuando la relación C/N en el medio fue de 10. El medio que permitió el máximo desarrollo del micelio no dió necesariamente el óptimo rendimiento de pectinasas. (25)

Una endopoligalacturonasa fue aislada del Aspergillus niger, tenía un pH óptimo de 4.0 a 4.2, degradando el ácido péctico rápidamente del 30 al 40%, y después su acción disminuía hasta detenerse totalmente cuando había hidrolizado el 60% del ácido, los productos finales fueron ácidos mono y digalacturónicos. (29)

Dos diferentes exopoligalacturonasas fueron aisladas del micelio del Aspergillus niger. La PG I fue activada por iones Hg, teniendo un pH óptimo de 4.4 a 4.6, hidrolizando completamente el ácido péctico a ácido monogalacturónico. La PG II tenía un pH óptimo de 5.0 a 5.1, esta enzima es inactiva en presencia de pectina, degrada el ácido péctico hasta un 28%. Ácidos di y trigalacturónicos fueron hidrolizados por ambas enzimas. (29)

PRODUCCION DE PROTEASAS POR ASPERGILLUS NIGER.

Las proteasas ácidas microbianas han sido aisladas - del Aspergillus oryzae, Asp.saitoi, Paecilomyces variote, - Trametes sanguinea y la llamada "Bacteria Butírica". Estas - enzimas digieren en forma satisfactoria la caseína, producien - do una gran cantidad de aminoácidos libres. Su pH óptimo va - ría de 2.5 a 3.0, y su temperatura óptima cae en el rango de - 55 a 60°C. (18 y 32)

Dos diferentes enzimas proteolíticas, tentativamente - llamadas proteasas ácidas A y B, fueron aisladas del polvo de - enzima crudo del filtrado del medio de cultivo con Aspergi - llus niger var. macrosporus. El polvo de enzima crudo fue - purificado en una columna de cromatografía, las enzimas fue - ron aisladas por medio de electroforesis, mostrando un sólo - pico individualmente. La proteasa ácida B es similar a otras - proteasas ácidas producidas por hongos, su pH óptimo es de - 2.6 y su temperatura óptima es de 55°C; bajo estas condicio - nes la enzima digiere la caseína en forma satisfactoria, cuan - do ésta es incubada a un pH de 2.6, produciendo gran cantidad - de aminoácidos libres. (18 y 32)

La proteasa ácida A es una nueva enzima proteolítica, su pH óptimo es aproximadamente de 2.0, y su temperatura ópti - ma fue de 60 a 70°C para digerir la caseína, cuando ésta fue - incubada a pH de 2.6 ó 1.5. La actividad de esta enzima para - la obtención de aminoácidos libres es menor que la de la pro - teasa ácida B. (18 y 32)

FERMENTACION.

Las fermentaciones son procesos metabólicos llevados a cabo por microorganismos, los cuales actúan sobre ciertos - substratos produciendo compuestos de importancia para el hombre. Entre las más antiguas conocidas por la humanidad están la alcohólica en la elaboración de vinos, la acética en vinagres y la láctica en la obtención de leches fermentadas como el yoghurt, el jocoque y el kefir. Mediante procesos fermentativos se obtienen también ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos y aminoácidos. (27)

Los microorganismos que llevan a cabo la fermentación son seleccionados en medios de cultivo específicos, - generalmente medios sólidos, los cuales contienen todos los - elementos indispensables para su crecimiento. El substrato - sobre el que actúan, se diseña de acuerdo a sus requerimientos y al productos que se desea obtener.

III.-DISEÑO DEL MEDIO DEL CULTIVO.

IV.- C A L C U L O S .

DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

III.- DISEÑO.

- 1 MATERIAS PRIMAS.
- 2 FUENTES DE ENERGIA.
- 3 FUENTES DE CARBONO.
- 4 FUENTES DE NITROGENO.
- 5 FUENTES MINERALES Y AGUA.

IV.- CALCULOS.

- 1 MEDIO DE CULTIVO.
- 2 SOLUCION REGULADORA.

1.- DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO.

La presencia de nutrientes adecuados para el crecimiento y desarrollo del microorganismo se considera de gran importancia, en vista de la diversidad de necesidades, ya sea la síntesis de factores esenciales para su actividad vital, - la evaluación de un determinado parámetro en medios científicos y de investigación o bien la resolución de problemas específicos vinculados con la microbiología industrial.

No obstante, se requiere de un medio básico formado por un complejo de materias esenciales como son agua, fuentes de carbono y energía, de nitrógeno y de elementos minerales, así como de los medios útiles para proveer al medio de hidrógeno y oxígeno.

1.1 Las materias primas.

La selección de las materias primas empleadas en el medio de cultivo debe de observarse con suma precaución, tomando en cuenta factores de importancia capital como son el costo de éstas así como la disponibilidad en el mercado. El costo de una materia prima se verá influido de manera directa por el rendimiento de ésta en un determinado proceso, la magnitud o volumen empleado. Asimismo, la disponibilidad de la materia prima básica será en función a su limitación en el mercado mundial, la fuente de obtención, ya sea elaborándose-

en industrias del país o bien, como materias de importación, - lo cual repercutirá de manera relevante en la inversión del - proyecto.

1.2 Fuentes de energía.

El catabolismo de sustratos orgánicos, así como de - azúcares, es característico de organismos heterótrofos consi- - derándose elementos esenciales para procurarse las fuentes - de energía adecuadas.

El hongo obtiene su energía esencialmente de com- - puestos carbohidratados. En la ruptura completa de un carbo- - hidrato a CO_2 y H_2O , se libera una cantidad relativamente al- - ta de energía.

1.3 Fuentes de carbono.

La síntesis del material celular efectuada gracias a la presencia de carbono en el medio de cultivo. Los microor- - ganismos heterotróficos satisfacen la mayor parte de sus nece- - sidades de carbono, mediante la incorporación de los metaboli- - tos que se producen en la degradación de las sustancias orgá- - nicas que les proporciona la energía que precisan.

1.4 Fuentes de nitrógeno.

La utilización de fuentes de nitrógeno por el micro- - organismo son asimismo, de gran importancia en la elaboración

del medio de cultivo. Estas fuentes pueden ser proporcionadas por una gran diversidad de compuestos; proteínas, aminoácidos, peptonas, urea o bien, sales inorgánicas como es el caso de las sales de amonio.

1.5 Fuentes de minerales y agua.

El agua se considera esencial en la función enzimática de las proteínas. La distribución de materiales orgánicos e inorgánicos en la célula, la hacen insustituible en el metabolismo.

Membranas semipermeables regulan la toma de agua y de iones por el hongo. La concentración iónica del jugo celular es generalmente más alta que la del medio externo. Por osmosis el agua difunde al interior de la célula hasta que la presión que produzca la turgencia de la célula y la presión externa sean iguales o bien, hasta que la concentración tanto dentro como fuera de la célula sean iguales.

Iones orgánicos y otras sustancias de peso molecular bajo pueden entrar a la célula por difusión pasiva, pero más lentamente que el agua. Mediante mecanismos de transporte activo, el microorganismo puede acelerar el proceso. Con objeto de que el hongo lleve a cabo sus funciones estructurales y fisiológicas, es necesaria la presencia de sustancias denominadas probióticos, contenidas siempre en muy pequeñas proporciones con respecto a fuentes de carbono, energía o de nitrógeno, como son oxígeno, hidrógeno, fósforo, azufre, pota

sio, calcio, magnesio, sodio, cloro, además de elementos que tienen papeles importantes en el metabolismo, como constituyentes de enzimas o coenzimas entre los que se incluyen manganeso, cobre, zinc, molibdeno, cobalto y boro.

II. Cálculos.

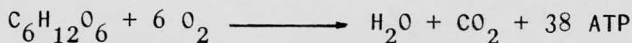
II.1. Diseño del Medio.

El medio apropiado para hongos se conoce con el nombre de Green & Gray, que presenta la siguiente composición:

Elemento	% en base seca	en 100g célula
C	50.00	50.00
H ₂	10.00	10.00
O ₂	20.00	20.00
N ₂	10.00	10.00
P	0.50	0.50
K	0.94	0.94
S	0.35	0.35
M _g	0.10	0.10
Mn	0.0036	0.0036
Fe	0.0041	0.0041
Ca	0.6120	0.6120

a) Fuente de energía:

El microorganismo requiere de energía dada por el ATP, que es formado a partir de ADP durante la oxidación de los carbohidratos a CO₂ en la glicólisis y ciclo de Krebs,



Esta fermentación que sufren glucosa y fructosa, los azúcares fermentables producen 38 ATP por mol de azúcar (180g). Cada ATP producido proporciona la energía suficiente para obtener 6g de células:

1 ATP ----- 6g célula

X ATP ----- 1g célula

X: $0.166\overline{6}$ ATP/g de célula

180g azúcar ----- 38 ATP

X g azúcar ----- 0.16 ATP

$0.78\overline{9}$
X: 0.746 g de azúcar.

b) Fuente de carbono:

Además de la fuente de energía, el microorganismo necesita de la fuente de carbono, la cual proporciona los carbohidratos. Este carbono representa el 50% en base seca del hongo; un gramo tendrá 0.5g de carbón.

180g azúcar ----- 72g carbono

X g azúcar ----- $72\overline{0}$ g carbono

0.5
X: 1.25g de azúcar/g de célula

Para producir 1g de célula se necesitan 0.74g de -
 azúcar como fuente de energía y 1.25g de azúcar como fuente -
 de carbono, es decir, el requerimiento para producir 1g de cé-
 lula es de 1.996. Ya que se desean obtener 25g de célula:

1.996g azúcar ---- 1g célula

X g azúcar ---- 1g célula

250

X: 50g de azúcar/L de medio

c) Fuente de nitrógeno:

100g célula ---- 10g Nitrógeno

25g célula ---- 10g Nitrógeno

0.05

X: 2.5g de Nitrógeno

0.1

El nitrógeno es adicionado en forma de peptona de -
 carne:

Mediante la determinación del contenido de nitrógeno
 por el método de Kjeldahl, tenemos que la peptona de carne -
 contiene 0.81g de Nitrógeno/g de peptona, lo cual corresponde
 a 5.06% de proteínas, de donde:

1g peptona ---- 0.81g de Nitrógeno

Xg peptona ---- 2.5g de Nitrógeno

X: 3.086g de peptona/L de medio

d) Fuente de minerales:

d.1.) Fósforo:

100g célula ---- 0.5g de Fósforo

25g célula ---- Xg de Fósforo

X: 0.125g de Fósforo

La adición de Fósforo es mediante $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$:

310 g de $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$ ---- 62g de Fósforo

X g de $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$ ---- 0.125g de Fósforo

X: 0.625g de $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$ /L de medio

d.2.) Potasio:

100g célula ---- 0.94g de Potasio

25g célula ---- 0.94g de Potasio

X: 0.235g de Potasio

La sal empleada como KCl:

74.5g de KCl ---- 39g de Potasio

X g de KCl ---- 0.235g de Potasio

0.45g de KCl/L de medio

d.3.) Calcio

El porcentaje de calcio requerido es superado mediante la adición de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

d.4.) Magnesio

100g célula ---- 0.1g de Magnesio

25g célula ---- 0~~X~~g de Magnesio

X: 0.025g de Magnesio

Adicionado como MgSO_4 :

120g de MgSO_4 ---- 24g de Magnesio

X g de MgSO_4 ---- 0.0125g de Magnesio

X: 0.125g de MgSO_4 /L de medio

d.5.) Hierro

100g de célula ---- 0.0041g de Hierro

25g de célula ---- X g de Hierro

X: 0.0102g de Hierro

Hierro incorporado como FeSO_4 :

152g de FeSO_4 ---- 56g de Hierro

X g de FeSO_4 ---- 0.0102g de Hierro

X: 0.0276 g de FeSO_4/L de medio

d.6.) Manganeso:

100g célula ---- 0.00364g de Manganeso

25g célula ---- X g de Manganeso

X: 0.00091g de Manganeso

Manganeso como MnSO_4 :

151g de MnSO_4 ---- 55g de Manganeso

X g de MnSO_4 ---- X g de Manganeso

X: 0.0025g de MnSO_4/L de medio

d.7.) Azufre

Mediante la adición de azufre como sulfato en el requerimiento de Magnesio, Fierro y Manganeso se supera el porcentaje requerido quedando cubiertas así las necesidades de sales minerales del medio de cultivo.

A continuación se enlistan los requerimientos del medio de cultivo a manera de cuadro resumen:

Nutrientes	Compuesto	Cantidad/L de medio
Fuente de carbono y de energía:	$C_6H_{12}O_6$	50.000 g ✓
Fuente de Nitrógeno:	Peptona de carne	3.0860 g ✓
Fuente de sales minerales:		
Fósforo	$Ca_3(PO_4)_2$	0.6250 g ✓
Potasio	KCl	0.4500 g
Calcio	$Ca_3(PO_4)_2$	-
Magnesio	$MgSO_4$	0.1250g
Fierro	$FeSO_4$	0.0276g
Manganeso x	$MnSO_4$	0.0025g
Azufre	$SO_4 =$	-

11.2.- Preparación de la solución reguladora.

Se denomina acción reguladora a la propiedad que tienen algunas soluciones de mantener prácticamente constante su concentración del ión hidrógeno, aún cuando se les agregue base o ácido en pequeña proporción.

Las soluciones reguladoras contienen comunmente una mezcla de un ácido o una base débil y una de sus sales.

Para comprender el efecto de la solución reguladora, se puede considerar el equilibrio entre un ácido débil y una de sus sales. La disociación de un ácido débil, HA, es dada por:



Y su disociación depende de la concentración y de la constante de disociación K_a :

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (I)$$

de donde:

$$[\text{H}^+] = \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \times K_a \quad (II)$$

Este equilibrio tiene lugar en la mezcla de un ácido, HA, y una sal del mismo, por ejemplo, MA.

Si la concentración del ácido es C_a y la de la sal - C_s , la concentración del ácido sin disociar es:

$$|HA| = C_a - |H^+| \quad (11')$$

Como la sal se encuentra totalmente ionizada, la concentración del anión (común al ácido y a la sal) será igual a la del ácido ionizado más de la de la sal, que es prácticamente igual a la concentración del ión hidrógeno, ya que en una aproximación se puede despreciar la disociación electrolítica del agua:

$$|A^-| = C_s + |H^+| \quad (11'')$$

Sustituyendo estos valores en (II):

$$|H^+| = \frac{C_a - |H^+|}{C_s - |H^+|} \times K_a \quad (111)$$

Esta es una ecuación de segundo grado en H, resoluble en forma corriente. Sin embargo, se puede simplificar recordando que en una mezcla de un ácido débil y una sal del mismo, la disociación del ácido disminuye por efecto del ión común, y H^+ se puede despreciar con respecto a C_a y a C_s , de donde (111) se reduce a:

$$[H^+] = \frac{C_a}{C_b} \times K_a$$

de donde:

$$[H^+] = \frac{|\text{Acido}|}{|\text{Sal}|} \times K_a$$

para obtener así:

$$pH = pK + \log \frac{|\text{Sal}|}{|\text{Acido}|}$$

El empleo de soluciones reguladoras en fermentaciones de tipo aerobio es en la actualidad de gran utilidad, ya que permite impartir al medio una de las condiciones bajo las cuales el microorganismo observará un desarrollo óptimo: pH.

Con objeto de efectuar la fermentación bajo condiciones adecuadas, se emplea una solución reguladora de acetatos, formada por un ácido débil y su sal, ácido acético y acetato de sodio; solución que proporciona un pH que varía en el rango de 4.5 y 5.0

Para fines del cálculo de la solución reguladora, se recurre a los conocimientos previamente expuestos:

pH inicial:	5.0	pK Ac. Acético:	4.7
pH final:	4.5	Acidez:	0.007

Condiciones iniciales.

De (V):

$$5.0 = 4.7 + \log \frac{B_1}{A_1}$$

$$0.3 = \log \frac{B_1}{A_1}$$

$$2.0 = \frac{B_1}{A_1} ; \quad 2 A_1 = B_1 \quad (VI)$$

Condiciones finales.

$$4.5 = 4.7 + \log \frac{B_2}{A_2}$$

$$-0.2 = \log \frac{B_2}{A_2}$$

$$0.2 = \log \frac{A_2}{B_2}$$

$$1.6 = \frac{A_2}{B_2} ; \quad 0.66 A_2 = B_2 \quad (VII)$$

Al equilibrio:

$$A_1 + B_1 = A_2 + B_2$$

Sustituyendo (VI) y (VII):

$$A_1 + 2 A_1 = A_2 + 0.66 A_2$$

$$3 A_1 = 1.66 A_2$$

$$A_1 = \frac{1.66}{3} A_2 ; A_1 = 0.55 A_2$$

$$A_2 = \frac{3}{1.66} A_1 ; A_2 = 1.8 A_1$$

Sustituyendo en (11'')

$$A_2 = A_1 + |H^+|$$

Acidez: 0.007

$$A_2 = A_1 + [0.007]$$

$$1.8 A_1 = A_1 + [0.007]$$

$$0.8 A_1 = 0.007 \quad A_1 = \frac{0.007}{0.8}$$

$$A_1 = 0.0087$$

Convirtiendo ésta última expresión en unidades de -
concentración:

$$A_1 = 0.0087$$

AcOH
M:60

$$A_1 = 0.0087 \times 60 = 0.516g \text{ AcOH / L de medio}$$

De igual modo:

$$B_1 = 2 (0.0087)$$

$$B_1 = 0.174$$

Que expresado como concentración:

M AcONa: 82

$$B_1 = 0.174 \times 82 = 1.42g \text{ AcONa/L de medio}$$

Finalmente

$$\rho_{AcOH} = 1.049 \text{ g/ml}$$

$$\rho = \frac{m}{v} ; \quad v = \frac{m}{\rho} = \frac{0.516g}{1.049g/ml}$$

$$V = 0.49 \text{ ml AcOH}$$

V.- INDUCCION

Obtención de la cepa.

→ De manera general, solo las instituciones especializadas en la conservación de microorganismos, gracias a técnicas muy sofisticadas, tales como la liofilización, son el medio por el cual se obtiene una cepa adecuada para la elaboración de un estudio o investigación. ←

En estas colecciones, se incluyen un gran número de cultivos, de los que se conoce con certeza, la capacidad para producir un determinado producto.

→ En vista de que, para el caso específico de producción de enzimas pectolíticas y proteolíticas a partir de *Aspergillus niger* no se cuenta con el cultivo adecuado, este debe obtenerse por inducción a partir de una cepa simple. ←

Aislamiento y cultivo.

Con objeto de efectuar el aislamiento y cultivo del hongo, se requiere del desarrollo de un medio de crecimiento preparado empíricamente, carbohidratos y proteínas fácilmente digeribles, indispensables para el estudio en condiciones adecuadas, evitando así posibles contaminaciones con otros microorganismos.

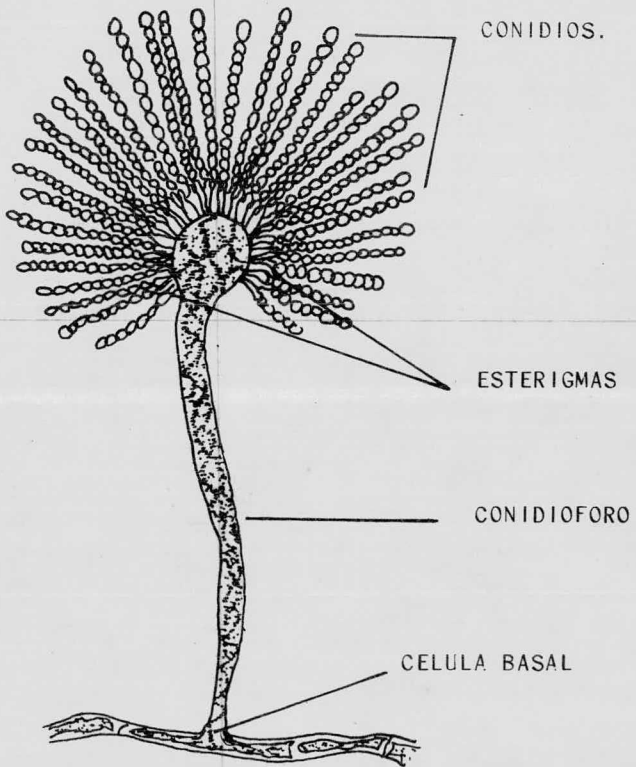
La viabilidad del hongo es conservada mediante la resembranza periódica del cultivo en medio sólido, de sabourad, - que tiene la siguiente composición:

Peptona de carne.....	1.0 %
Glucosa	5.0 %
Agar simple.....	1.5 %
Agua.....	92.5 %
Total:.....	100.0 %

La incubación és llevada a 30°C, dando origen a un cultivo cada vez más puro y libre de contaminaciones.

Una vez obtenido el cultivo puro, se procede a su identificación mediante un examen microscópico, que consiste en la observación de hifas o grupos de hifas y sus elementos-formativos en preparaciones húmedas.

Esta operación se realiza con un microscopio de pequeño aumento. El material se lleva con una gota de agua sobre un portaobjetos, se tapa con un cubreobjetos y se examina con los objetivos de pequeño y gran aumento a luz reducida.



Aspergillus niger
Observación al microscopio

Inducción.

La substitución de un medio de cultivo conteniendo fuentes de carbono y de energía, como es la glucosa, por un medio con pectina, que permite la producción hasta un grado óptimo de enzimas pectolíticas, manteniendo constante un punto máximo la producción de metabolitos del tipo de enzimas proteolíticas, son considerados como objetivos claves en ésta fase de la investigación.

La etapa normal de desarrollo del microorganismo prosigue, modificando el medio de cultivo, de tipo sólido, por otro de tipo líquido, el cual proporciona condiciones propicias tanto para el desarrollo del microorganismo, como para la producción de enzimas.

Antes de llevar a cabo el inicio de esta fase, se debe de tener la seguridad de que el microorganismo empleado ha seguido un proceso de aislamiento y selección, empleando la técnica de resiembra periódica.

[La continua distinción morfológica al microscopio, así como las pruebas de actividad enzimática tanto proteolítica como pectolítica en cada uno de los pasos de la inducción, son algunas de las más eficaces herramientas para asegurar un contacto correcto trabajo en la etapa de inducción.]

Lo qⁱ esta en corchetes no

Fermentación en matraces con agitación.

La técnica del cultivo profundo o sumergido, se lleva a cabo en un matraz con agitación normalmente es un erlenmeyer de 250 ml ó 100 ml que se puede mover mecánicamente, de manera que recorra una circunferencia (de unos 5 cm de diámetro), con una frecuencia determinada previamente, mientras no se alteran las posiciones relativas de las paredes del matraz y la plataforma sobre la que va montado. La agitación en círculo produce un remolino en el líquido sin que éste moje el tapón de algodón que cierra el matraz y mientras se forma en las paredes del mismo, por la fuerza centrífuga, una capa delgada de medio a través de la cual se produce la agitación por difusión.

La máquina que se utiliza para mover los matraces con agitación se denomina un agitador rotatorio.

El agitador orbital sostiene los matraces sujetos por medio de muelles, sobre una plataforma de aluminio muy ligera, que flota sobre cuatro grandes rodamientos de bolas situados en unos receptáculos. Un pequeño motor eléctrico hace girar una polea situada inmediatamente debajo de una excéntrica, que es solidaria de la plataforma flotante. Por lo tanto, cada punto de la plataforma describe un movimiento circular regulado cuyo radio se puede determinar a partir del desplazamiento de la excéntrica.

La fuerza centrífuga debida al movimiento del contra peso de la polea (masa del contrapeso x cuadrado de la velocidad de la rotación angular x radio efectivo de rotación), se ajusta de tal manera que sea igual a la debida al movimiento de la plataforma, para que el propio agitador no se traslade:

$$\frac{W_p}{g} \quad W^2 r_p \quad = \quad \frac{W_f}{g} \quad w^2 r_f$$

El movimiento alrededor del eje vertical viene dado por la expresión:

$$\text{fuerza centrífuga} \times (L_p - L_f)$$

La forma de construcción más ligera posible se logra cuando la expresión $(L_p - L_f)$ sea muy pequeña.

Se puede controlar la agitación y la aereación en los matraces agitados, por tres procedimientos:

- a) La aereación y la agitación son inversamente proporcionales a la profundidad (y por tanto, al volumen de líquido) en el matraz.
- b) La aereación y la agitación son directamente proporcionales a la velocidad de rotación y a la longitud del desplazamiento.

- c) Amortiguadores y otros dispositivos mecánicos semejantes pueden aumentar el grado de agitación y aereación, al causar turbulencias.

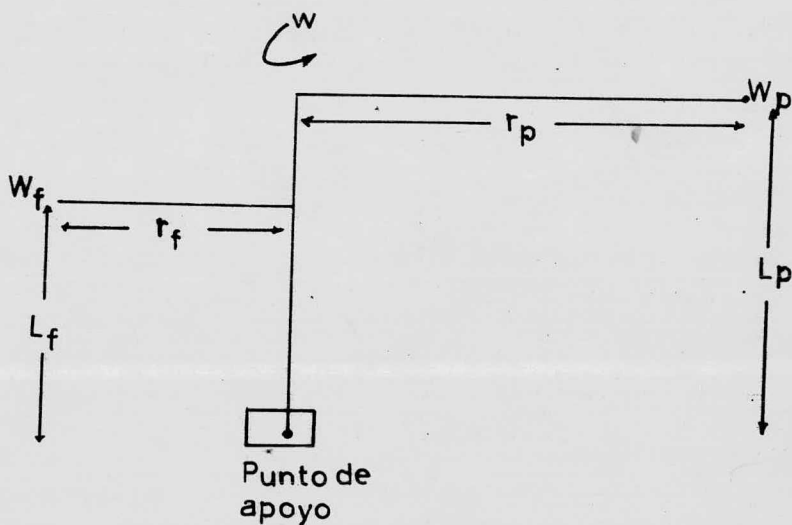
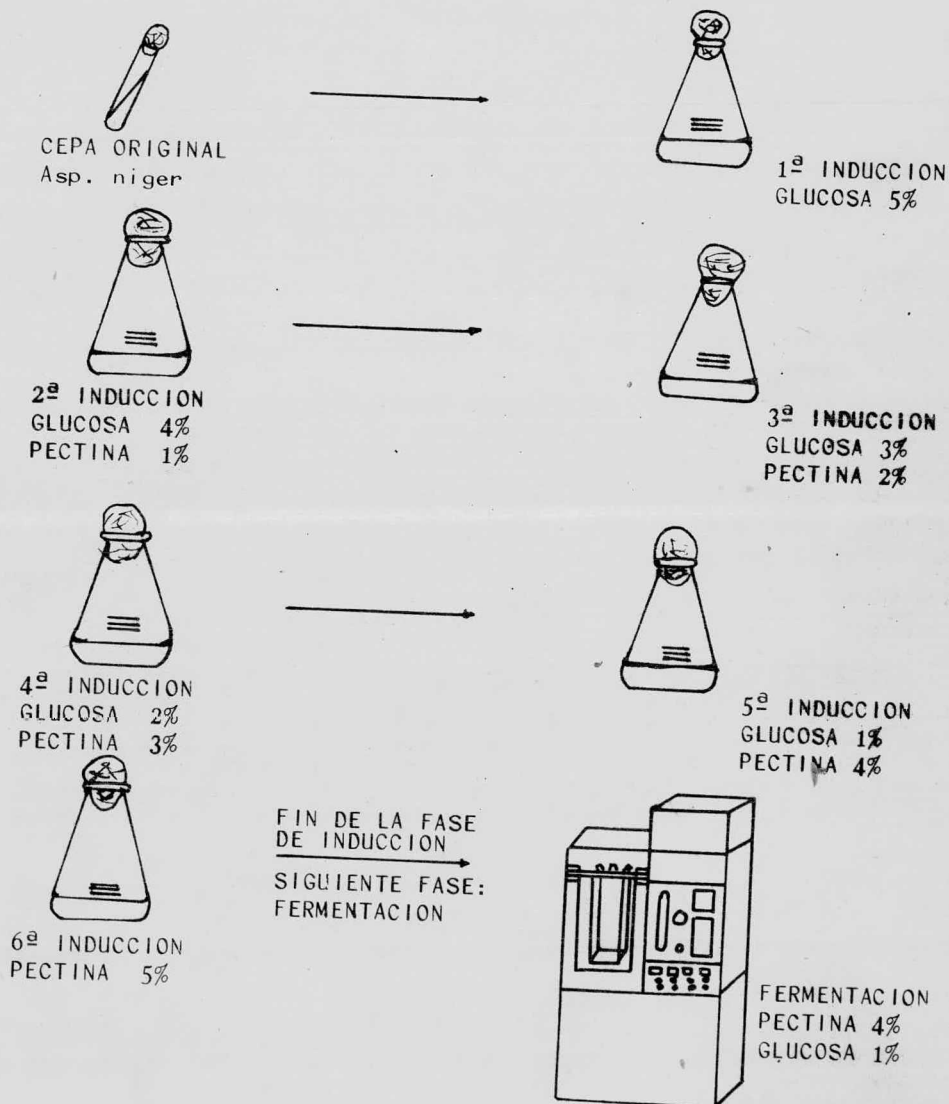


Diagrama de un agitador orbital, W_p es el peso efectivo de la plataforma concentrado en un punto de distancia r_p del eje de rotación, W_f es el peso efectivo de la polea, concentrado en un punto de distancia r_f del eje de rotación. L_p es la distancia desde el plano de rotación de la plataforma al eje, L_f es la distancia desde la polea al eje principal.

CONDICIONES DE TRABAJO EN MEDIO CON MATRACES EN
AGITACION DURANTE LA FASE DE INDUCCION

APARATO EMPLEADO	AGITADOR MECANICO MANUFAC TURADO POR NEWBRUNSWICK - SCIENTIFIC CO., INC. CONTE NIENDO CONTROLES DE VEL.- ROTATORIA, DE pH, DE TEM- PERATURA Y FUENTE LUMINO- SA.
VELOCIDAD DE AGITACION	250 RPM
TEMPERATURA	30°C
pH	4.5
VOLUMEN DE MEDIO DE CULTI VO.	130 ml <i>→ 130 ml</i>
CANTIDAD DE INOCULO DE <u>A_s</u> pergillus niger:	20 ml <i>→ 20 ml</i>
TIEMPO TOTAL DE INCUBACION	72 hrs

DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA FASE DE INDUCCION



Inducción.

Resultados.

EVOLUCION DE LA ETAPA DE INDUCCION

% Glucosa en el medio de cultivo.	% Pectina en el medio de cultivo.	Actividad pectolítica (% de hidrólisis).	Actividad proteolítica (% de hidrólisis).
5.0	-	0.30	4.3
4.0	1.0	0.70	5.7
3.0	2.0	1.20	5.1
2.0	3.0	1.80	6.3
1.0	4.0	3.70	6.0
-	5.0	2.10	6.0

VI.- MATERIALES Y METODOS EMPLEADOS

Determinación de la actividad pectolítica. (#)

Método General Volumétrico de Lane-Eynon.

Este método es empleado para la determinación del contenido de azúcares reductores.

La reacción consiste en la oxidación del grupo aldehídico dando lugar a la formación de un ácido y la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ , realizándose en un medio bastante alcalino.

Se debe evitar la reducción prematura del ión cúprico, mediante la formación de un complejo entre el cobre y el tartrato doble de sodio y potasio, caracterizado por un color azul intenso en medio alcalino.

Como la solución es inestable, se deben mezclar ambas soluciones solo momentos antes de la determinación. La inestabilidad proviene de la posibilidad de formación en medio alcalino de grupos ceto-enólicos.

Este fenómeno hace que la serie de reacciones sea muy variada. El ión cúprico en forma de hidróxido es reducido a cuproso en forma de óxido.

Con el fin de obtener resultados reproducibles, revisten gran importancia las condiciones de trabajo conforme a reactivos, temperatura, tiempo, volumen y pH.

Mediante este procedimiento, el cobre presente se -
agota, determinando por medio de una relación el contenido -
del azúcar reductor presente.

Materiales y Métodos.

A. Material

1. Bureta de 50 ml pyrex.
2. Frasco con gotero.
3. Parrilla eléctrica.
4. Perlas de ebullición de vidrio.
5. Pipetas volumétricas de 5 ml.
6. Termómetro -10 a 200°C.
7. Vasos erlenmeyer de 250 ml.



B. Reactivos.

1. $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (Sulfato cúprico pentahidratado).
2. Tartrato doble de sodio y potasio (Sal de Rochelle).
3. Hidróxido de sodio en lentejas USP.
4. HCl concentrado.
5. Sacarosa pura.
6. Solución acuosa de azul de metileno al 1%.

C. Método.

Determinación de la actividad pectolítica.

Método General Volumétrico de Lane-Eynon.

Solución de Fehling, modificación de Soxhlet.- Preparada por la mezcla de volúmenes iguales de (a) y (b) inmediatamente antes de utilizarse.

(a) Solución de sulfato de cobre.- Se disuelven 34.369 gramos de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en agua, aforando a 500 ml, filtrando después a través de fibra de vidrio o papel. Se determina el contenido de cobre en la solución y se ajustan de tal manera que contenga 440.9 mg de cobre/25 ml.

(b) Solución de tartrato alcalino. Se disuelven 173g de tartrato doble de sodio y potasio. $4 \text{H}_2\text{O}$ (sal de Rochelle) y 50g de NaOH en agua, aforando a 500 ml, dejando reposar dos días, filtrando a través de asbesto preparado.

(c) Solución estándar de azúcar invertido. A una solución de 9.5g de sacarosa pura, se adicionan 5 ml de HCl^1 y se afora con agua a 100 ml. Se conserva varios días a temperatura ambiente (7 días a $12-15^\circ\text{C}$ o 3 días a $20-25^\circ\text{C}$); diluyendo a 1 L (La acidificación del azúcar invertido en solución, es estable varios meses). Se neutraliza la solución con NaOH 1 N y se diluye hasta obtener la concentración deseada inmediatamente antes de usarse.

Estandarización.

El reactivo de Soxhlet se mezcla con pipetas de 10 o de 25 ml exactamente, o bien, de 5 ó 12.5 ml para cada una de las soluciones de Soxhlet (a) y (b), en un matraz erlenmeyer de 300 a 400 ml (El contenido de cobre difiere ampliamente - cuando se emplean pipetas de diferentes capacidades por lo - cual, el método seleccionado debe ser consistente en cuanto a estandarización y a determinación). La preparación de la solución estándar del azúcar puro debe ser de tal concentración que se requieran para reducir todo el cobre 15 y 50 ml.

La bureta conteniendo la solución del azúcar puede - ser manipulada de tal manera que se evite el contacto con el vapor proveniente del matraz. Se adiciona la solución del - azúcar, de 0.5 a 1 ml del total requerido, se calienta la mezcla al punto de ebullición sobre de una parrilla eléctrica o - un mechero y se mantiene la ebullición moderada por dos minutos (se sugiere adicionar perlas de ebullición de vidrio o - de otro material inerte para prevenir que la ebullición origi - ne el vómito de la solución del matraz). Sin dejar de calen - tar, se adiciona 1 ml de la solución acuosa de azul o metileno (6 3 a 4 gotas de la solución al 1%) y se completa la titulación con un tiempo límite de ebullición total de 3 min con - muy pequeñas adiciones (2 a 3 gotas) de solución de azúcar - hasta después de la completa reducción del cobre. El azul de metileno es reducido a compuestos decolorados y la solución - recobra el color naranja del Cu_2O , el cual tenía antes de adi - cionar el indicador.

Se multiplican los ml de la titulación por los g/ml-
de la solución requerida para reducir el cobre.

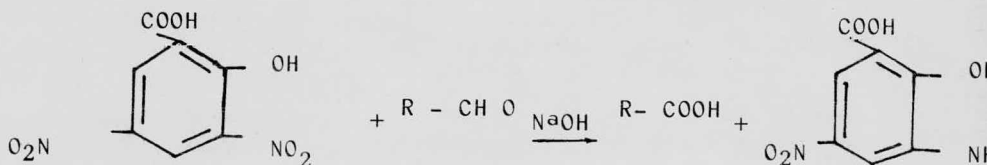
Determinación de la actividad pectolítica.

Método del Acido 3,5 dinitro salicílico (DNS) (#).

El empleo de ésta técnica se fundamenta en la determinación de azúcares reductores, formados a partir de la hidrólisis de un sustrato de pectina, por acción enzimática.

Los azúcares reductores así obtenidos, reaccionarán con el ácido 3,5 dinitro salicílico en un medio fuertemente alcalino, con desarrollo de color, cuya intensidad variará de acuerdo a la concentración de azúcar presente.

La interacción que se lleva a cabo, consiste en una oxidación de los grupos aldehídicos del azúcar formando grupos carboxilos, en tanto que el ácido 3,5 dinitro salicílico es reducido a ácido 3, amino 5, nitro salicílico.



La estabilidad del color del reactivo, punto importante a considerar, será prevenida mediante la adición de fenol y de metabisulfito de potasio, como también de Sal de Rochelle como precaución para evitar la oxidación del reactivo.

(#) Ref. (6)

Material y Métodos.

A. Material.

1. Espectrofotómetro modelo 200 UV-VIS, perkin-Elmer, 1975.
2. Celdas de vidrio con laterales esmerilados, con capacidad de 10 ml.
3. Pipetas de 1 ml.
4. Pipetas de 5 ml.
5. Frasco de 1 L ámbar.
6. Equipo para baño maría.
7. Bureta de 50 ml.

B. Reactivos.

1. Acido 3,5 dinitro silicífico.
2. Fenol (fundido a 50°C).
3. Fenolftaleína.
4. Glucosa.
5. HCl 0.1 N.
- 6.- Metabisulfito de potasio.
- 7.- NaOH.
- 8.- Tartrato doble de sodio y potasio.

Método.

Preparación del reactivo.

Se mezclan 10.6 g de ácido 3,5 dinitro salicílico - con 19.8g de hidróxido de sodio, 306g de metabisulfito de sodio, completando a 2 L con agua destilada, y agitando la mezcla hasta obtener la disolución total de los componentes.

Se filtra la solución y se coloca en un frasco ámbar para evitar la oxidación por medio de la luz.

Estandarización del reactivo.

Se titulan 3 ml de reactivo con HCl 0.1 N utilizando como indicador fenolftaleína. La estandarización del reactivo se logra al consumirse de 5 a 6 ml de ácido clorhídrico. - El ajuste de esta cantidad de ácido se puede llevar a cabo mediante la adición de NaOH.

Cuantificación de azúcares reductores.

a) Preparación de la curva estándar.

El primer paso para efectuar la determinación consiste en la elaboración de una curva de calibración estándar.

Esta se lleva a cabo utilizando muestras que contienen 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 $\mu\text{g/ml}$ de glucosa. 1 ml de alí--

cuota de cada muestra se adiciona a un tubo de ensayo conteniendo 3.0 ml del reactivo.

Se coloca cada muestra en ebullición a baño maría durante 5 min, dejando enfriar posteriormente las muestras.

Cuando éstas se encuentran a temperatura ambiente, se llevan al espectrofotómetro. Leyendo la absorbancia a 550 nm, con un blanco de agua destilada.

Se grafican los resultados, absorbancia y glucosa en mg/ml, obteniendo así una línea recta cuya intersección en el eje de las abscisas corresponderá a 0.04 mg/ml de glucosa, representandose de este modo la pérdida de glucosa por oxidación a lo largo del proceso.

Determinación.

La solución problema es evaluada de igual manera que las utilizadas en la elaboración de la curva estándar, por medio de interpolación del valor de absorbancia, la concentración del azúcar presente.

Descripción del Espectrofotómetro modelo 200 UV-VIS, Perkin - Elmer, 1975.

El modelo de espectrofotómetro 200 está constituido por un haz de luz doble, pantalla con bandas del espectro variable desde 0.2 a 0.4 nm.

Esta diseñada para la medición de muestras líquidas, gaseosas y de sólidos en suspensión en el rango ultravioleta-visible desde 190 hasta 850 nm.

A continuación se presenta un cuadro de datos técnicos:

Condiciones generales: Después de 30 min. de calentamiento, se encuentra a temperatura ambiente desde 5 a 35°C, con una humedad relativa de 45-85%, con una variación en el voltaje de -10%.

Rango de longitud de onda: 190-850 nm en intervalos de una graduación de 0.2 nm.

Tiempo de respuesta: 0.5, 2, 5 segundos nominales en % T.

Requerimiento de poder: 115/230 V, 50/60 hz.

Dimensiones: Altura: 29 cms

Largo: 42 cms

Ancho: 76 cms

Peso: 33 Kg

Materiales y Métodos.

A. Material.

1. Bureta de 50 ml pyrex.
2. Vasos erlenmeyer de 250 ml Pyrex.
3. Tubos de ensayo pyrex.
4. Equipo para baño maría.

B. Reactivos.

1. Caseína al 1%.
2. Formol al 40%.
3. Indicador de fenolftaleína.
4. NaOH 0.1N.

C. Método.

Se mezclan 10 ml de solución de caseína al 1% con 1-^{0.5} ml de solución conteniendo la enzima en un tubo de ensayo; - asimismo, se coloca otra muestra sin solución de enzima, utilizando como patrón. Se recomienda también, emplear un duplicado de la muestra con enzima para mayor control de la prueba.

✓ Se incuban las muestras a 37°C durante 30 min., después de los cuales se adiciona al tubo marcado como patrón 1 ml de la solución de enzima.

Con el baño maría a ebullición, se colocan las muestras durante dos minutos con objeto de inactivar la enzima, - enfriando posteriormente.

Enseguida, se neutraliza el formol adicionando 3 gotas de fenolftaleína y añadiendo NaOH 0.1N hasta el vire al - color rosa.

Las muestras se pasan a vasos erlenmeyer previamente rotulados y se colocan 20 ml de formol neutralizado a cada - uno de los vasos. ¹⁰

Se agita y se deja reposar varias veces durante 10 - minutos, procediendo a titular las mezclas con NaOH 0.1N hasta el vire al rosa persistente.

Evaluación.

Los ml de NaOH 0.1N valorados, se restan a los encontrados en la muestra patrón. La diferencia es el álcali gastado en la titulación.

Por otra parte, se tiene en cuenta que cada ml de - NaOH 0.1N equivale a 7 mg de nitrógeno de aminoácidos, de donde se puede inferir la actividad proteolítica de la enzima. ⁷

Determinación del número total de microorganismos por conteo en placa (#).

Se basa en la suposición de que cada microorganismo dará origen a una colonia después de la incubación en medios adecuados. Una cantidad medida de la muestra del fermentador se coloca en una caja de petri conteniendo medio de cultivo estéril. Después de la incubación, se cuenta el número de colonias que están creciendo en el medio de cultivo, para obtener de este modo un cálculo de la población del espécimen original.

Aunque existen diversos factores en contra de ésta técnica, ésta es sencilla y da resultados bastante satisfactorios para el uso rutinario.

Con objeto de efectuar las diluciones básicas puede utilizarse agua estéril. Después de agregar la muestra se agita cada dilución.

#: Ref. (8)

Materiales y Métodos.

A. Material.

1. Cajas de petri.
2. Estufa de incubación.
3. Pipetas de 1 ml.
4. Vasos de precipitado.
5. Matraz erlenmeyer de 1 L.

B. Reactivos.

1. Agar Sabouraud
2. Agua destilada estéril.

C. Método.

1 ml de la muestra obtenida del fermentador conteniendo al *Aspergillus niger* se transfiere a un vaso de precipitado con 99 ml de agua destilada estéril. Se obtiene una dilución 1: 100.

Se transfiere 1 ml de la dilución 1: 100 a una caja de petri estéril, y se transfiere otro ml de dilución 1: 100 a otro vaso de precipitado con 99 ml de la dilución, dando esto una dilución 1: 10 000.

1 ml de esta dilución 1: 10 000 es transferida a una caja de petri estéril, transfiriendo además 1 ml a un vaso de precipitado con 99 ml de agua destilada, dando esta dilución-1: 1 000 000.

Se introducen 15 ml de agar Sabouraud fundido, estéril y enfriado a 45°C en cada una de las tres cajas de petri que contienen las diluciones de las muestras.

Se mezcla el medio con la alícuota de la fermentación, haciendo girar suavemente la caja de petri en una dirección y luego en sentido contrario.

Se deja solidificar sobre una superficie plana.

Se incuba la placa durante 48 Hrs..

Se observa la placa contra un fondo luminoso y se cuenta el número de colonias.

Se multiplica el número de colonias por el factor de dilución.

RESULTADOS

GRAFICAS.
DETERMINACIONES CON
PECTINASAS.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD PECTOLITICA.

CURVA PATRON.

MUESTRA	LECTURA (% T)	(ABS)	mg DE GLUCOSA
1	82.4 <i>1.9164</i>	17.6	20
2	75.6 <i>1.87</i>	24.4	40
3	63.1	36.9	60
4	52.7	47.3	80
5	42.4	57.6	100

Lecturas a 550 nm.

Efecto del pH.

MUESTRA	pH	SOLN. ENZIMA (ml)	SOLN. SUSTRA TO DE PECTINA AL 1% (ml)	ABS.	% DE HI DROLISIS.
1	4.0	1	1	1.0	0.5
2	4.5	1	1	Incubar 2.0	2.1
3	5.0	1	1	30 min 2.0	2.1
4	5.5	1	1	1.5	1.0
5	6.0	1	1	4.5	6.0*
6	6.5	1	1	3.0	3.5
7	7.0	1	1	1.5	1.0

Efecto del tiempo.

MUESTRA	TIEMPO DE INCUBACION (min)	SOLN. ENZIMA (ml)	SOLN. DE SUS TRATO DE PEC TINA AL 1% (ml)	ABS.	% DE HI DROLISIS.
1	25	1	1	0.7	0
2	30	1	1	1.8	1.6
3	35	1	1	2.1	2.1
4	40	1	1	1.7	1.8
5	45	1	1	1.3	0.9
6	50	1	1	1.1	0.3

PECTINASAS

Efecto de la temperatura.

MUESTRA	TEMPERATURA (°C)	SOLN. ENZIMA (ml)	SUSTRATO PECTINA AL 1%	Incubar	Abs.	% de hidroli sis.
1	4	1	1	30 min	12.3	0.2
2	10	1	1		2.2	2.6
3	18	1	1		1.4	0.9
4	25	1	1		2.2	2.6
5	30	1	1		1.8	1.1
6	37	1	1		4.0	0.5
7	45	1	1		-	0
8	60	1	1		-	0

DET. CONCENTRACION DE SUSTRATO

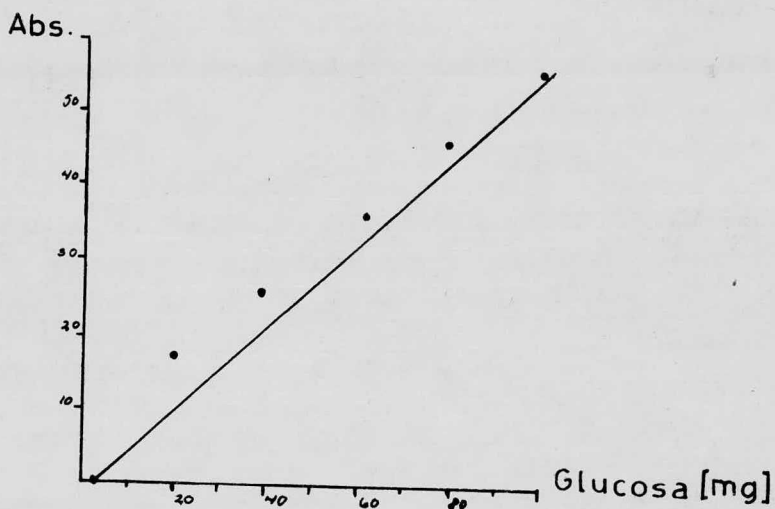
MUESTRA	SOLN. DE ENZIMA (ml)	SUSTRATO DE PECTINA AL 1% (mg/ml)	AGUA	INCUBAR	ABSORBANCIA	% DE HIDRO LISIS.
1	1	1	9	30 min	0.1	0
2	1	2	8		0.3	0
3	1	3	7		0.1	0
4	1	4	6		0.1	0
5	1	5	5		0.1	0
6	1	6	4		0.1	0
7	1	7	3		0.1	0
8	1	8	2		0.1	0
9	1	9	1		1.2	0.5
10	1	10	0		0.1	0

DET. CONCENTRACION DE ENZIMA

MUESTRA	SOLN. EN ZIMA (ml)	SUSTRATO DE PECTINA AL 1% (ml)	AGUA	INCUBAR	ABSORBANCIA.	% DE HI- DROLISIS.
1	0.1	1	9.9	30 min	-	0
2	0.2	1	9.8		1.2	0.5
3	0.4	1	9.6		-	0
4	0.6	1	9.4		0.8	0
5	0.8	1	9.2		1.0	0.07
6	1.0	1	9.0		1.2	0.5
7	1.2	1	8.8		1.4	0.9
8	1.4	1	8.6		1.5	1.0
9	1.6	1	8.4		1.5	1.0
10	1.8	1	8.2		1.5	1.0
11	2.0	1	8.0		1.5	1.0

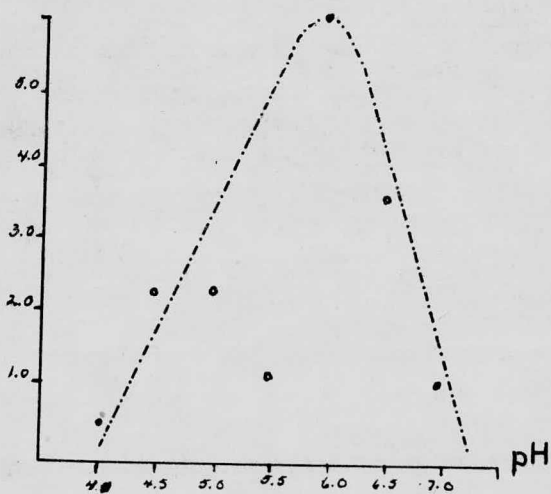
DETERMINACIONES CON PECTINASAS

Curva Patrón



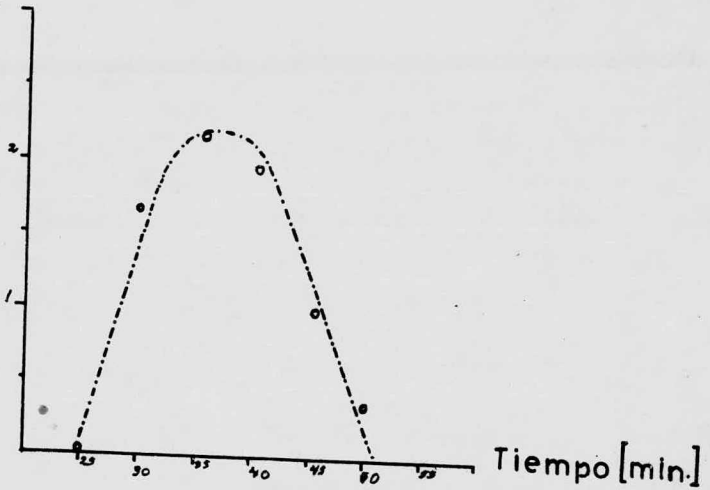
Efecto del pH

% de Hidrol.



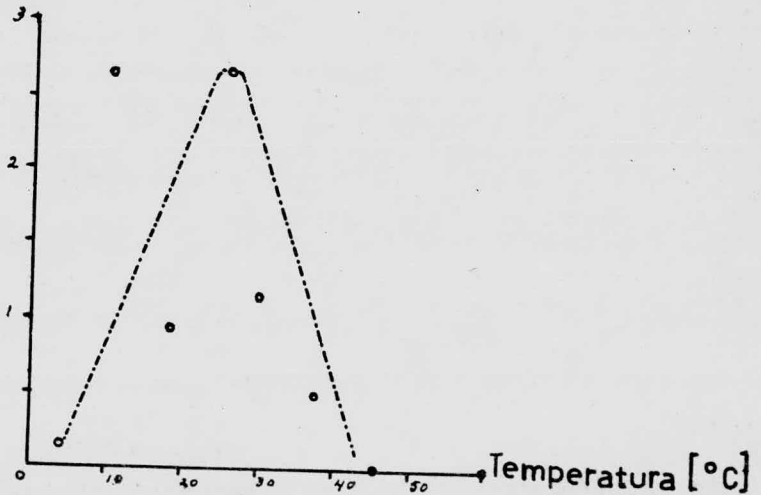
Efecto del Tiempo

% de Hidrol.



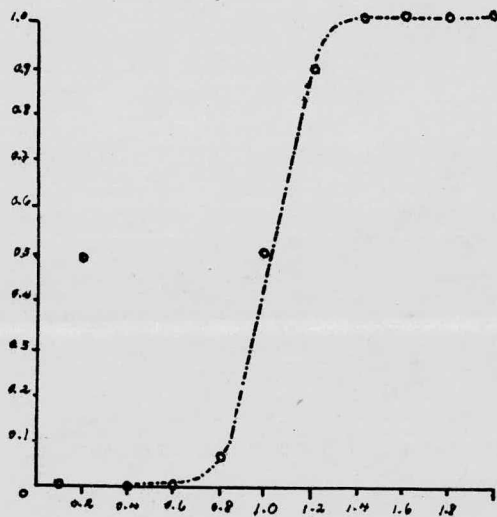
Efecto de la Temperatura

% de Hidrol.



Efecto de la Conc. de Enzima

%de Hidrol.



Soln. de Enzima [ml]

VII. GRAFICAS.

DETERMINACIONES CON

PROTEASAS.

Efecto del pH.

MUESTRA	pH	SOLN. ENZIMA (ml)	SOLN. SUSTRATO DE CASEINA AL 1% (ml)	INCUBAR	% DE HIDROLISIS (mg de N. de a.a. hidrolizados).
1	1.0	1	1	30 min	0
2	1.5	1	1		8.4
3	2.0	1	1		23.8
4	2.5	1	1		7.7
5	3.0	1	1		0.7
6	3.5	1	1		0

Efecto del Tiempo

MUESTRA	TIEMPO DE INCUBACION (min)	SOLN. ENZIMA (ml)	SOLN. SUSTRATO DE CASEINA AL 1% (ml)	% DE HIDROLISIS (mg de N. de a.a. hidrolizados)
1	0	1	1	0
2	5	1	1	1.4
3	10	1	1	2.1
4	15	1	1	5.6
5	20	1	1	4.9
6	25	1	1	16.1
7	30	1	1	7.7
8	35	1	1	0
9	40	1	1	3.5

Efecto de Temperatura.

MUESTRA	TEMPERATURA (°C)	SOLN. ENZIMA (ml)	SOLN. SUSTRATO DE CASEINA AL 1% (ml)	INCUBAR	% DE HIDROLISIS (mg de N. de a.a. hidrolizada)
1	4	1	1	30 min	0.7
2	10	1	1		3.5
3	18	1	1		4.9
4	25	1	1		2.8
5	30	1	1		0

DETERMINACION DE LA CONC. DE SUSTRATO.

MUESTRA	SOLN. DE ENZIMA (ml)	CONC. DE SUSTRATO DE CASEINA (mg/ml)	% DE HIDROLISIS (mg de N de á.a. HIDROLIZADOS)
1	1	5	1.4
2	1	10	3.5
3	1	20	13.5
4	1	40	7.7
5	1	60	7.7
6	1	80	-
7	1	100	-

INCUBAR
30 min

DETERMINACION DE LA CONC. DE ENZIMA.

MUESTRA	SOLN. DE ENZIMA (ml)	SUSTRATO DE CASEINA AL 1% (ml)	AGUA	% DE HIDROLISIS (mg de N de á.a. HIDROLIZADOS)
1	0.8			2.8
2	1.0			10.5
3	1.2			3.5
4	1.4			-
5	1.6			-

INCUBAR
30 min

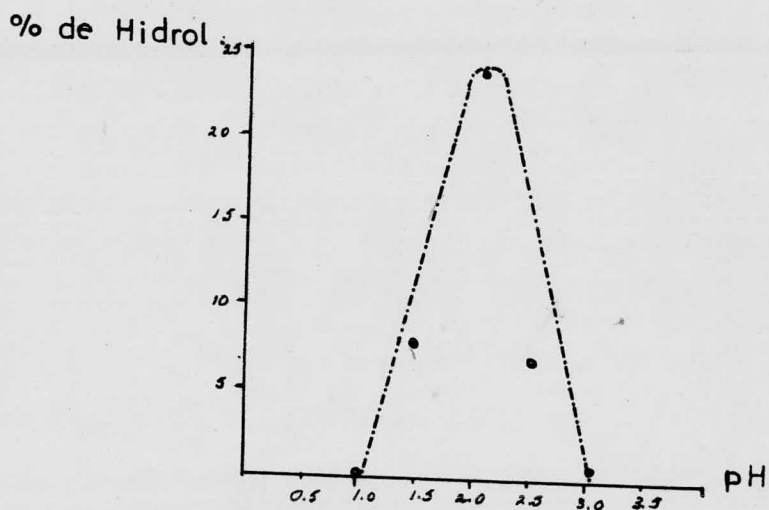
0.25 mg/25

0.01 mg/ml

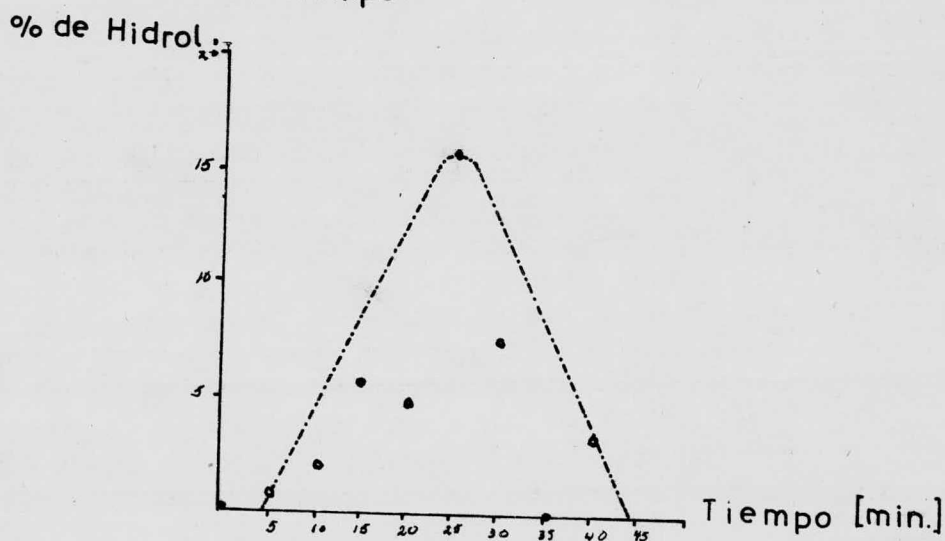
0.55 mg/ml

DETERMINACIONES CON PROTEASAS

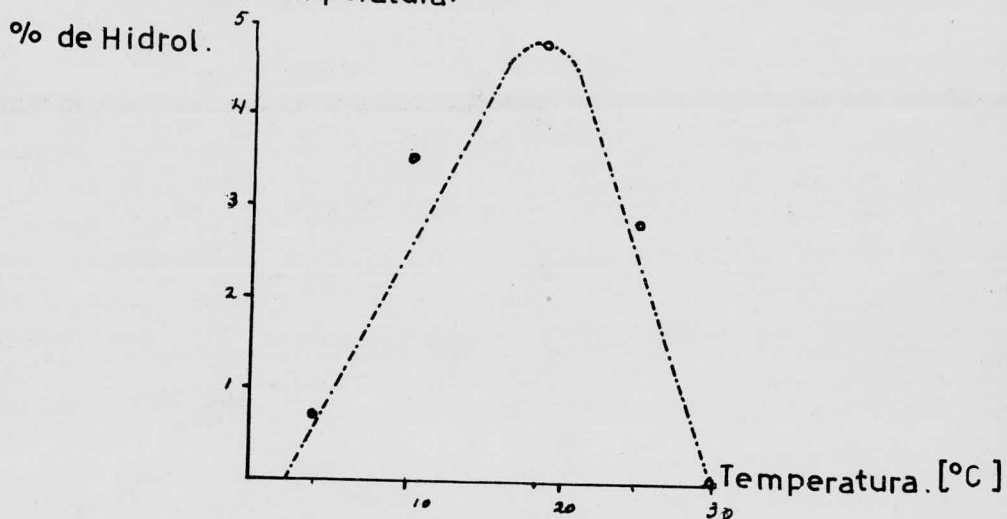
Efecto del pH.



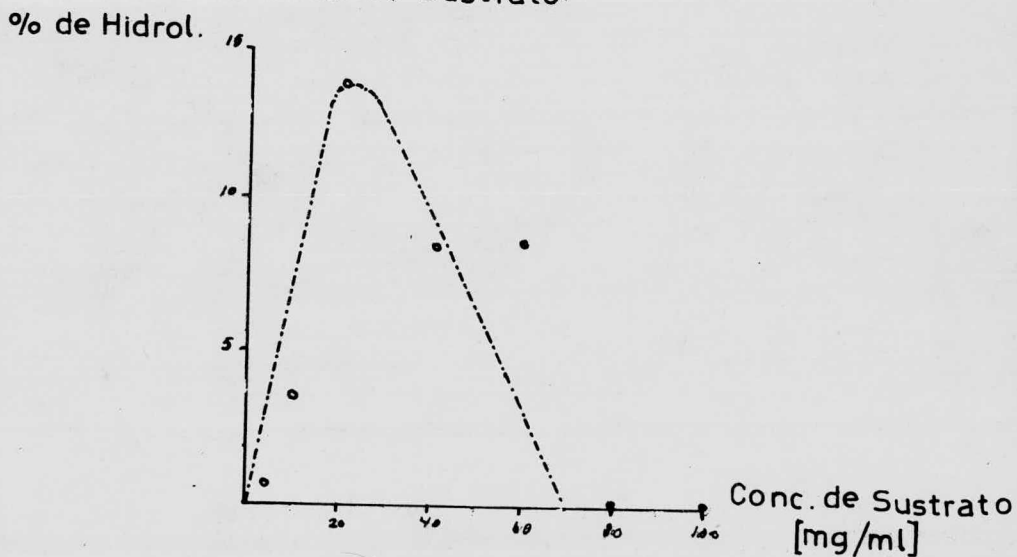
Efecto del Tiempo.



Efecto de la Temperatura.



Efecto de la Conc. de Sustrato.

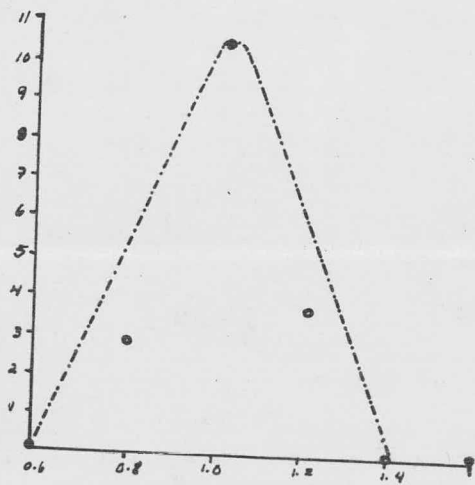


11g/100ml

0.11 ml

Efecto de la Conc. de Enzima.

% de Hidrol.



Soln. de Enzima [ml]

VIII. FERMENTACION

Descripción del Fermentador microferm serie MF 200.

El microferm es un fermentador compacto diseñado para el cultivo de biomasa de microorganismos en cultivos continuos.

La unidad posee instrumentación completa para control de temperatura, velocidad de agitación y aereación.

El microorganismo es cultivado en un vaso de vidrio-duro, adaptable a un control magnético que elimina las posibles fuentes de contaminación.

La introducción de aire o de algún otro tipo de gas, se efectúa a través de reguladores de presión así como de filtros de acero inoxidable.

A continuación, se presenta un cuadro de especificaciones del aparato empleado:

Modelo:	MF 200 con oxígeno disuelto.	
Medidas:	Alto:	90.17 cm
	Ancho:	121.92 cm
	Profundo:	60.96 cm
Capacidad del fermentador:	5 L	
(Total)		
Volumen de trabajo máximo:	1 1/4 - 5 L	

Velocidad de agitación: 100 a 1000 (variable)

Motor: Motor de bola de 1/4 hp

Tipo de agitadores: Turbina

Cap. Flujométrica: 1 600 a 16 000 (cc aire/min)²

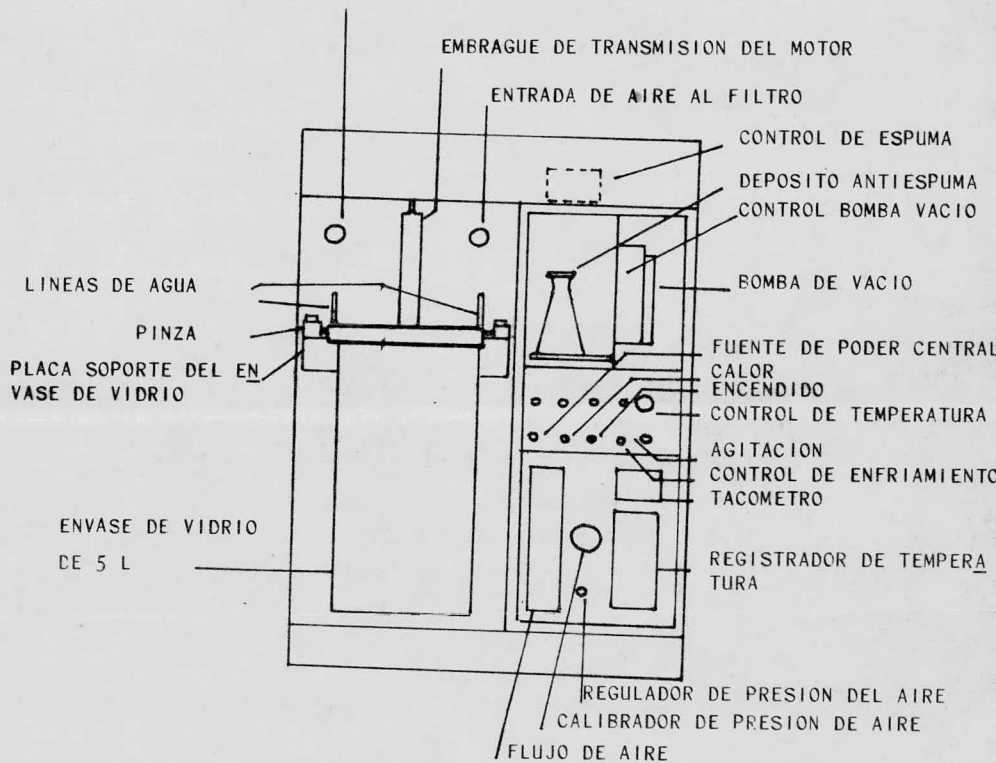
Rango de variación de Temperatura: 5° a 60°C

Calentador: Calentador de inmersión tipo Cartridge de acero-inoxidable.

Peso aproximado: 327 Kg

DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LOS COMPONENTES DEL FERMENTADOR MICROFERM SERIE MF 200

SALIDA DEL AIRE DEL FILTRO



CONDICIONES DE TRABAJO FIJADAS DURANTE LA FASE DE LA
FERMENTACION

APARATO EMPLEADO	FERMENTACION MICROFERM SE RIE MF 200 MANUFACTURADO- POR NEW BRUNSWICK SCIENTI- FIC CO., INC.
VELOCIDAD DE AGITACION	400 RPM
AIRE	5.5 (x 1000 c.c. aire/ min a 70°F y a 14.7 PSIA).
TEMPERATURA	30°C
pH	4.5
OXIGENO DISUELTO INICIAL	100%
VOLUMEN DE MEDIO DE CULTIVO	2 L
CANTIDAD DE INOCULO DE <i>Asper- gillus niger.</i>	250 ml
TIEMPO DE FERMENTACION TOTAL	96 hrs.

Resultados Determinación de las condiciones efectuadas durante la fermentación.

MUESTRA	TIEMPO (hrs)	TEMPERATURA (°C)	pH	DETERMINACION DE ACTIVIDAD-PROTEOLITICA (% DE HIDROLISIS).	DETERMINACION DE ACTIVIDAD-PECTOLITICA (% DE HIDROLISIS).	O ₂ DISUELTO (%)	DETERMINACION DE BIOMASA. (COLONIAS/g).
1	0	30	4.5	7.3	1.3	100	30
2	24	32	4.2	10.3	1.8	67	85
3	36	30	3.7	11.7	1.9	40	123
4	48	29	3.5	15.1	2.1	32	118
5	60	28	3.4	11.6	2.7	28	153
6	72	28	3.4	13.0	2.6	22	97
7	84	30	3.4	12.8	2.0	20	48
8	96	29	3.4	12.3	2.1	8	13

Alícuota del fermentador empleada: 100 ml

Microorganismo: *Aspergillus niger*.

IX. Precipitación de las enzimas.

La solubilidad de la mayoría de las proteínas globulares está definitivamente influenciada por el pH del sistema.

El pH al cual una proteína es menos soluble en su pH isoeléctrico, definido como el pH al cual la molécula no tiene carga neta y decae para moverse en un campo eléctrico.

Bajo esas condiciones no hay repulsión electrostática entre moléculas de proteínas vecinas, tendiendo a coalescer y precipitar. Asimismo, a valores de pH superiores o bajo el punto isoeléctrico, todas las moléculas de proteínas tienen una carga neta del mismo signo. Por tanto, se repelen unas a otras, previniendo la coalescencia de moléculas simples en agregados solubles. Algunas proteínas son virtualmente insolubles a su pH isoeléctrico.

Dado que las diferentes proteínas tienen diferentes valores de pH isoeléctrico, debido a su contenido de aminoácidos con grupos R diferentes, que con frecuencia pueden ser separados uno de otro por precipitación isoeléctrica.

Cuando el pH de una mezcla de proteínas es ajustado al pH isoeléctrico de uno de sus componentes, la mayoría o todo este componente precipitará, quedando las proteínas en solución con pH isoeléctrico superior o inferior que el pH.

La proteína precipitada por pH isoelectrico conserva su conformación original puede ser redissuelta en un medio con apropiado pH y concentración de sal.

EXTRACCION DE LA ENZIMA POR MEDIO DE VARIACION DE pH AL PUNTO
150 ELECTRICO.

RESULTADOS.

PECTINASA

pH	CONC. DE ENZIMA (mg 1 ml).
6.0	0
6.2	0
6.4	4.4
6.6	1.4
6.8	0.8
7.0	0

PROTEASA

pH	CONC DE ENZIMA.
3.0	0.3
3.2	1.5
3.4	13.5
3.6	2.8
3.8	0.3
4.0	0

NOTA: Las determinaciones se efectuaron pesando la cantidad-
extraída en seco, mediante homo de incubación a 30°C,-
durante 48 hrs.

X.- DISCUSSION

Discusión.

[El medio de cultivo basal contiene, como fuente de carbono y energía, glucosa, monosacárido de fácil aprovechamiento por el microorganismo, permitiendo un rápido desarrollo de éste.]

La fuente de nitrógeno, peptona de carne, provee al hongo de las condiciones óptimas para el rápido crecimiento, ya que los medios con nitrógeno inorgánico dan lugar a un crecimiento más lento que en uno de tipo orgánico.]

Los micronutrientes necesarios son añadidos en cantidades tales que se logre complementar tanto la fuente de carbono y energía como la de nitrógeno, principales componentes del medio de cultivo basal.

Como se observa en la tabla de nutrientes, no aparecen metales como Zinc, Molibdeno, Cobre y Cobalto, que habitualmente forman parte de un medio de cultivo basal. La especificidad del medio de cultivo de *Aspergillus niger* nos induce a utilizar solo algunos micronutrientes, y no necesariamente los arriba mencionados.

[Otro factor de gran importancia en el diseño del medio es el pH, ajustado previamente a cada inoculación al medio, mediante una solución reguladora de acetatos, lo que permite un control adecuado del pH a lo largo de la fase del crecimiento del microorganismo.]

La elaboración de éste medio prueba su funcionalidad al observar a lo largo de la fase de desarrollo y crecimiento una adaptación del microorganismo al medio líquido en condiciones óptimas, que permiten proseguir con la siguiente etapa de experimentación, la inducción.

Inducción.

[La inducción se realiza con el objeto de obtener las enzimas pretendidas, una pectinasa y una proteasa.]

[La obtención de la enzima no presenta dificultad alguna, puesto que en el medio basal contiene proteína como fuente de nitrógeno. El microorganismo utiliza este nutriente, que al ser hidrolizado, da lugar al nitrógeno necesario para tener así la proteasa de origen fungal.]

Por lo que respecta a la pectinasa, la fuente de carbono y energía se va cambiando, glucosa inicialmente y pectina cítrica finalmente, de manera lenta y gradual, ya que un cambio brusco de estas fuentes redundaría en la escasa producción de la enzima, sino es que nula, con un desarrollo del microorganismo precario.

Como muestran los resultados, la actividad enzimática pectinolítica, muestra valores que se incrementan progresivamente, obteniendo un máximo de actividad en la fase de inducción de 4% de concentración de pectina cítrica, ya que se advierte que en 5% de pectina cítrica existía un máximo desa-

rrollo del microorganismo, pero escasa producción de enzima - de acuerdo a la actividad mostrada, como se reporta en la mis ma tabla.

[La inducción se lleva a cabo en matraces con agita-- ción constante, puesto que la distribución de oxígeno en el - medio es más uniforme, acrecentandose el valor de la activi-- dad enzimática, así como el crecimiento del microorganismo.]

El método empleado para la determinación de activi-- dad enzimática pectolítica es el Método general Volumétrico - de Lane-Eynon, modificación de Soxhlet, utilizando la solu-- ción de Fehling, en ésta fase de la experimentación.

Este método es aplicado con objeto de examinar si la actividad pectolítica en cada una de las etapas de inducción- presentaba aumentos en proporción al porcentaje de pectina - cítrica que se encuentran en el medio, determinando así la - cantidad de sustrato de pectina donde se encuentra un máximo- de actividad, por lo que no se requiere de un método más - sensible, como el empleado posteriormente, en la fase de expe rimentación, por medio de un espectrofotómetro UV-VIS 200 mo- delos perkin-Elmer 1976.

En vista del control de la variabilidad de la activi- dad proteolítica por el método de Srensen empleado para la - determinación, es suficiente y confiable el método a lo largo de toda la experimentación.

Resultados.

Con respecto a las pruebas de actividad enzimática - efectuadas, se observa, que de manera general, los ensayos - muestran gran similitud con la información bibliográfica consultada.

a) Ensayos de actividad enzimática con pectinasas.

La primera determinación efectuada es la variación - de actividad enzimática observada a una variación de pH, con- objeto de encontrar el pH óptimo al cual la enzima desarrolla mayor actividad enzimática.

Esta determinación se efectúa utilizando como sustra- to pectina cítrica al 0.1%, y una alícuota de la fermentación conteniendo la enzima. Se colocaron varias muestras de sus- trato con variación de pH en un rango determinado entre 4.0 y 7.0 unidades de pH, ya que de acuerdo a la información de la- literatura, el pH óptimo se encuentra en éste rango de pH.

Los resultados muestran una máxima actividad enzimá- tica a un pH de 5.5, después del cual se tiene un declive en- la actividad enzimática.

El estudio de la variación de la actividad enzimáti- ca con respecto al tiempo, presenta el registro inicial de - actividad a los 25 minutos de incubación, observando un máxi- mo a los 35 minutos.

La velocidad de la reacción enzima-sustrato, mínima en un principio, y posteriormente en incremento, debido a la interacción molecular son explicaciones a la conducta de la actividad enzimática mostrada.

Finalmente, sobreviene el descenso en actividad enzimática de acuerdo al consumo de sustrato y su consiguiente variación de pH por formación de productos secundarios, hasta originar la inactivación.

La variación del contenido de enzima frente a un sustrato de pectina cítrica presenta saturación de la concentración de enzima en puntos posteriores al máximo, de tal modo que todo el sustrato presente en el sistema está bajo la forma de complejo enzima-sustrato.

Al efectuar variaciones de temperatura ante el sustrato ya conocido, la pectinasa muestra actividad con respecto al sustrato en un rango desde 4° hasta los 60°C, temperatura final a la que se observa la inactivación de la enzima.

En éste caso, posterior al punto de actividad máxima, óptima temperatura, la porción descendente de la curva corresponde a la desnaturalización térmica.

El último ensayo con pectinasas efectuado es la determinación de actividad enzimática registrada ante un sustrato variable. Los resultados muestran una saturación de la enzima con sustrato, traduciendo en resultados negativos de -

actividad enzimática. Atendiendo a éste fenómeno, se puede decir que el comportamiento de éste tipo de reacciones no corresponde a los principios de cinética química, denominándose a estas reacciones como no enzimáticas de saturación con sustrato (20).

Investigaciones recientes (20), han formulado la hipótesis de que la enzima y el sustrato reaccionan reversiblemente para formar un complejo como etapa inicial en la reacción catalizada presentándose la saturación de la enzima con su sustrato.

b) Ensayos de actividad enzimática con proteasas.

En éste ensayo se muestra la manera como varía la actividad de la proteasa fungal con respecto a variaciones de pH.

Los resultados muestran un pH óptimo en 2.0, dato que también coincide con la literatura (18 y 32).

Es pertinente aclarar, asimismo, que se emplea caseína al 1% en todos los ensayos efectuados para determinación de la actividad enzimática.

La relación de actividad enzimática y pH depende de la manera de comportarse del sistema ácido-base de la enzima y el sustrato seleccionado.

Por otro lado, se observa que el rango de actividad-varía usualmente con la concentración de sustrato en vista de que la constante de Michaelis de la mayoría de las enzimas -varía con el pH.

El comportamiento de la enzima frente al tiempo se -observa como reacción de primer orden, de tal modo que la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de sustrato hasta la obtención del máximo de actividad, que para este caso se presenta a los 25 minutos de iniciada la interacción.

Para ensayos efectuados variando la concentración de enzima frente a un sustrato con una concentración definida -fija, se observa en puntos posteriores al máximo, una saturación por incremento en la concentración de enzima, de manera-progresiva, hasta la inactivación total.

La variación de la concentración de sustrato muestra un comportamiento de actividad enzimática con actividad constante en puntos posteriores al óptimo.

A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad -de reacción es proporcional a la concentración de sustrato. -La velocidad se incrementa menos perdiendo en cierta medida,-proporcionalidad, hasta un punto al que la concentración de -sustrato se encuentra en grandes cantidades, momento en el -que se muestra independencia con respecto a la velocidad de -reacción, fijandose en un sitio de la curva constante la acti

vidad enzimática mostrada.

Es este el punto de mayor actividad enzimática, es decir, existe ya saturación de la enzima con la caseína, lo que explica el factor limitante de ésta interacción enzima-sustrato.

Finalmente, el ensayo efectuado para determinación de variabilidad de actividad enzimática ensayando con diferentes temperaturas, en un rango entre 4° y 60°C, muestra un comportamiento calificado de común y normal, en vista de que aparece a los 18°C un máximo en la curva, y posteriormente, a los 60°C inactivación total.

Extracción de las enzimas.

Tanto la extracción de proteasa ácida como de pectinasa, se efectuaron por precipitación al punto isoeléctrico, siendo 3.2 unidades de pH el punto de precipitación de proteasa, y de 6.4 para pectinasa.

La variación de pH se efectúa en muestras de la fermentación utilizando alícuotas de HCl 0.1N variando así el pH de las muestras.

En vista de que ésta investigación no lleva por objeto la extracción a nivel industrial, no se efectúan ensayos de optimización en cuanto al rendimiento en la extracción de productos finales. Sin embargo, es interesante observar que-

el método empleado no se presenta como única posibilidad, pudiendo utilizarse diversas técnicas aún más sofisticadas como son cromatografía, electroforesis o ultracentrifugación.

Es por ello, que se considera satisfactorio el ensayo efectuado, de acuerdo a las necesidades y objetivos del estudio.

XI. CONCLUSIONES

Conclusiones.

Se han estudiado las diversas fases que sigue la obtención de las enzimas de origen fungal, haciendo énfasis en etapas de mayor importancia como son el cultivo y aislamiento de la cepa, su inducción y la etapa de fermentación final con la correspondiente extracción de metabolitos como son las enzimas pécticas y proteolíticas.

Tomando como base los resultados obtenidos, no existen impedimentos a nivel experimental para la consecución de una fermentación produciendo enzimas de origen fungal, por lo cual se puede aseverar que su proyección a gran escala depende únicamente del grado de desarrollo tecnológico en la materia.

El microorganismo empleado en la investigación, *Aspergillus niger*, presenta facilidad para su aislamiento, mostrándose como un cultivo predominante, que muy raramente podría presentar el problema de contaminación con otro microorganismo.

Se han efectuado, asimismo, diversas técnicas para la determinación de la actividad enzimática, variando éstas de acuerdo al grado de confiabilidad deseado en la prueba.

Se puede afirmar, que en la medida en que existan las condiciones favorables para el desarrollo de este ramo de la enzimología, basándose siempre en la utilización del

acervo tecnológico nacional y de la constante investigación científica, se podrá crear la infraestructura adecuada que en un corto plazo, logre dar frutos que permitan adentrarse de manera competitiva en el mercado, al lado de empresas ya establecidas.

El presente estudio puede ser empleado como base para en futuras investigaciones en este campo, proyectos o estudios relacionados con la elaboración de plantas industriales productoras de enzimas pectolíticas y proteolíticas de origen fungal, en vista de que actualmente se observa gran inquietud por adentrarse a esta área científica.

XII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ✓ 1.- Arima, X., Yamasaki, M. and Yasui, T.
Studies on Pectic Enzymes of Microorganisms. Part I. Iso-
lation of Microorganisms wich Specifically Produce one of
Several Pectic Enzymes.
Agr. Biol. Chem., Vol. 38, No. 4, 248-254. (1964)
- ✓ 2.- Association of Official Agricultural Chemists (A.O.A.C.)
Official Methods of Analysis.
Wasjington, D.C. U.S.A. (1970)
- 3.- Béhar, Moises e Icaza, Susana J.
Nutrición.
1ª Edición.
Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V.
México. (1972)
- 4.- Burdon, K.L. y Williams, R.P.
Microbiología.
2ª Edición en Español.
Ed. Public. Cultural, S.A.
México. (1976)
- 5.- Burton, Benjamín T.
Nutrición Humana.
Organización Panamericana de la Salud.

- OP601/C733
- 6 - Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.
Methods in Enzymology.
Vol. 1
Academic Press.
New York and London. (1972)
 - 7 - Cox, R.E. and Higby, C.H.
An Improved Method for Determining The Grade of Commercial Pectins. Food Manufacture, 19, 199-202. (1944)
 - 8 - Escamilla, M.L.L.A., Reyes, A.D. y Varela, V.E.G.
Proyectos para la Industrialización de la Tuna. Tesis - Prof.
Facultad de Química, U.N.A.M.
México, D.F. (1977)
 - 9 - Fieser, F.L. y Fieser, M.
Química Orgánica.
2ª Edición.
Ed. Grijalbo, S.A.
México. (1960)
 - 10 - Fogarty, W.M. and Ward, O.P.
Pectic Substances and Pectinolytic Enzymes.
Procesos Biochemistry. August. (1972)
 - 11 - Holt, R.
Volumetric Determination of Pectin as Calcium Pectate.
Analyst. 623-672, 79. (1959)

- ✓ 12.- Huheey, James E.
 Inorganic Chemistry. Principles of Structure and Reacti
 vith.
 1ª Edición.
 Harper and Row, Publishers. (1972)
- 13.- Joslyn, M.A. and Pharff, H.V.
 Recent Advances in the Chemistry of Pectic Substances.
 Wall. Lab. Comm., 10, 29 , 29. (1947)
- 14.- Joslyn, M.A. and Phaff, H.V.
 The Newer Knowledge od Pectic Enzymes.
 Wall. Lab. Comm., 10, 29 , 133-148. (1947)
- 15.- Keay, Leonard.
 Microbial Proteases.
 Procesos Biochemistry, August. (1971)
- 16.- Keay, Moseley, Anderson, O'Connors and Wildi.
 Production and Isolation of Microbial Proteases.
 Biotechnol. and Bioeng. Simp., No. 3, 63-92. (1972)
- 17.- Kertesz, Z. I.
 The Enzymes. Chemistry and Mechanism of Action.
 Vol. I. Part 2.
 Academic Press Inc.
 New York. (1951)

TY 541
 567170

- 18.- Koaze, Goi, Ezawa, Yamada and Hara.
Fungal Proteolytic Enzymes. Part I. Isolation of Two
Kinds of.
Acid-Proteases Excreted by Aspergillus niger var. macrosporus. Agr. Biol. Chem., Vol. 38, No. 4 216-223.
(1964).
- 19.- Kruif, Paul de, Dr.
Los Cazadores de Microbios.
7ª Edición.
Ed. Diana, S.A.
México. (1963)
- 20.- Lehninger, Albert I.
Biochemistry.
2ª Edición.
Worth Publishers, Inc.
New York. (1975)
- ✓ 21.- Lineweaver, H. and Jansen, E. F.
Pectic Enzymes.
Advances in Enzymol., 11, 267. (1951)
- 22.- Mahler, H. and Cordes, E.
Biological Chemistry.
2ª Edición.
Harper and Row Publishers. (1971)

- ✓ 23.- McCready, R. M. and Owens, H. S.
Pectin-A Product of Citrus Waste.
Economic Botany, 8, 1, 29. (1954)
- 24.- Mitchell, P. H.
A Textbook of Biochemistry.
2ª Edición.
McGraw-Hill Book Company. Inc. (1950)
- ✓ 25.- Mukherjee, S. K. and Majumdar, S. K.
Fermentative Production of Pectinases by Fungi: Screening of Organisms and Production of The Enzymes by Aspergillus niger.
J. Ferment. Technol., Vol. 49, No. 9, 759-770. (1971)
- ✓ 26.- Pérez, R. A. y Verde, R. C.
Prácticas de Laboratorio de Fermentaciones Ind. Tesis - Prof.
Facultad de Química, U.N.A.M.
México, D.F. (1978)
- 27.- Prescott, S. C. and Dunn, C.C.
Microbiología Industrial.
Ed. Aguilar.
Madrid, España. (1962)
- 28.- Pitman, G. A. and Gruess, W.V.
Hidrolisis of Pectin by Various Microorganisms.
Industrial and Eng. Che., 12, 12. (1929)

- 29.- Reed, Gerald.
Enzymes in Food Processing.
2ª Edición.
Academic Press, Inc.
New York. (1975)
- 30.- Rhodes, A. y Fletcher, D. L.
Principios de Microbiología Industrial.
1ª Edición en Español.
Ed. Acribia.
Zaragoza, España. (1969)
- 31.- Sidney, G. J.
Microbial Enzyme Production.
Noyer Data Corporation.
Noyer Data Corporation.
London, England. (1974)
- 32.- Shinmyo, Tahara, Matsumoto and Terui.
Kinetic Studies on Enzyme Production by Microbes. Autoin
duction.
of Acid Protease in Aspergillus niger.
J. Ferment. Technol., Vol. 49, No. 6, 535-543. (1971)
- 33.- Smith, Emil L.
The Enzymes. Chemistry and Mechanism of Action.
Vol. 1. Part 2.
Academic Press, Inc.
New York. (1951)

- ✓ 34.- Thom, Charles and Raper, Jenneth B.
A Manual of The Aspergilli.
The Williams and Wiljins Comp.
Baltimore, Md., U.S.A. (1945)
- ✓ 35.- Ulloa, M. y Hanlin, R.
Atlas de Micología Básica.
Editorial Concepto, S.A.
México, D.F. (1978)
- 36.- Whitaker, Jhon R.
Principles of Enzymology for the Food Sciences.
1ª Edición.
Marcel Dekker, Inc.
New York. (1972)
- 37.- Williams, Roger.
An Introduction to Biochemistry.
2ª Edición.
D. Van Nostrand Company, Inc. (1950)
- ✓ 38.- Zetalaki, Kornélia.
Optimal Carbon Source Concentration for Pectolytic Enzyme.
Formation of Aspergilli.
Process Biochemistry, July/August. (1976)



Impresiones Lupita

MEDICINA No. 25

FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD

CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.

TEL. 548-49-79

Esta Tesis solo
puede prestarse una
vez, sin renovación.

Ortiz

(YA, NI O ESTUVIERA TAD BUENA)