



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“PRODUCCION Y SEPARACION
DE PECTINASAS”

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JUAN CARLOS MEZA CONTRERAS



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente. Biserka Sveshtarova Pekarkova
Vocal. Beatriz Luna Millán
Secretario. Abel Blancas Cabrera
1er. Suplente. Marco Antonio Leon Felix
2do. Suplente. Juan Diego Ortiz Palma Perez

Sitio donde se desarrollo el tema :

**Instituto de Investigaciones Biomédicas, Dpto. de Biotecnología,
Unidad de Escalamiento, U.N.A.M.**

Asesor del tema :



Ing. Abel Blancas Cabrera.

Sústentante :



Juan Carlos Meza Contreras.

A MIS PADRES.

Irma Contreras Blancas.

Fidel Meza Camacho.

*Por darme esa libertad, confianza, apoyo
e impulso durante toda mi carrera.*

A MIS HERMANAS.

Katy, Irma, Liliana, Magdalena y Rosalinda.

Y A TODA MI FAMILIA.

Por apoyarme y motivarme todo el tiempo.

A MARISOL.

*Por fortalecerme, animarme y motivarme para no conformarme
con lo que lograba cada día y sobre todo por estar junto a mí en
todos los momentos.*

AGRADECIMIENTOS.

A TODOS MIS PROFESORES Y ASESOR,

Ing. Abel Blancas C.

Por haberme permitido colaborar con ellos y transmitirme ese conocimiento que me ha dado confianza y seguridad en mi andar.

A TODOS MIS COMPAÑEROS.

Facultad de Química, U.N.A.M

Arnoldo, Ema, José M., Leticia, Manuel, Marcos, Maru, Noé, Roberto, Sirenia, Valdemar y a todos aquellos que estuvieron cerca de mi en la carrera.

Inst. Inv. Biomédicas, U.N.A.M

Hipólito, Julio, Marcela, Rosalba, Sara y Tirso.

y especialmente a los señores :

Luis, Monchis y Polo.

que me ayudaron incondicionalmente durante la realización de este trabajo.

A TODOS MIS AMIGOS.

Enrique, Fidel, Luis, Martín, Matías, Pablo, Porfirio, Sergio, Silvia y Toño.

INDICE.

	pagina
I.- INTRODUCCION.	1
II.- GENERALIDADES.	3
2.1.- Recuperación de enzimas.	3
2.1.1.- Estabilidad enzimática.	5
2.1.2.- Objetivos de la recuperación y purificación de una enzima de uso industrial.	8
2.1.3.- Procesos de separación.	8
2.1.3.1.- Procesos comúnmente empleados para la separación inicial sólido-líquido (sólidos insolubles) en el procesamiento de bioproductos.	18
2.1.3.1.1.- Filtración.	19
2.1.3.1.2.- Empleo de filtro ayuda .	20
2.1.3.1.3.- Filtración en equipo.	21
2.1.3.1.3.1- Filtro prensa ó de placas.	21
2.1.3.1.3.2- Filtro rotatorio a vacío.	21
2.1.3.1.4.- Filtración con flujo tangencial (Flujo cruzado).	22
2.1.3.1.5.- Centrifugación.	23
2.1.3.1.6.- Ultracentrifugación.	28

2.1.4.-	Métodos de concentración en el procesamiento de bioproductos.	28
2.1.4.1.-	Aspectos generales.	28
2.1.4.2.-	Procesos de membranas.	29
2.1.4.2.1.-	Diálisis, microfiltración, osmosis inversa y ultrafiltración.	30
2.1.4.3.-	Precipitación.	34
2.1.4.3.1.-	Precipitación mediante el uso de sales.	35
2.1.4.3.2.-	Precipitación mediante el empleo de solventes.	36
2.1.4.3.3.-	Precipitación con agentes floculantes.	37
2.1.4.4.-	Métodos de extracción.	38
2.1.4.5.-	Procesos térmicos.	42
2.1.4.6.-	Procesos de secado.	43
2.1.4.6.1.-	Concentración en frío.	44
2.1.4.6.2.-	Cristalización.	45
2.1.5.-	Criterio de pureza y almacenaje de enzimas.	45
2.1.6.-	Factores a considerar para definir la naturaleza del proceso de recuperación y purificación de una enzima específica.	47
2.1.7.-	Estrategia para llevar a cabo la recuperación y purificación de una enzima específica.	56

2.1.8.-	Parámetros requeridos para la selección del tipo de equipo a emplear en un proceso global de obtención de un producto.	57
2.1.9.-	Generalidades económicas de los procesos de recuperación y purificación.	57
2.2.-	Características de las sustancias pécticas..	59
2.3.-	Clasificación de las pectinasas	59
2.4.-	Producción de pectinasas.	61
2.4.1.-	Perspectivas en la producción de pectinasas.	71
2.5.-	Importancia y aplicación de las pectinasas.	73
2.6.-	Situación en México respecto a la producción e importación de pectinasas.	77
2.7.-	Justificación.	81
2.8.-	Objetivos.	82
2.9.-	Diagrama de flujo del trabajo experimental.	83
III.-	MATERIALES Y METODOS.	84
3.1.-	Reactivos.	85
3.2.-	Medios filtrantes.	85
3.3.-	Floculantes.	85
3.4.-	Fermentación.	86

3.4.1.-	Microorganismo	86
3.4.2.-	Composición del medio de cultivo.	86
3.4.3.-	Preparación del Inóculo.	87
3.4.4.-	Producción de pectinasas en matraz fernback (3 L).	87
3.4.5.-	Influencia del pH inicial sobre la producción de pectinasas en fermentador (14 L).	87
3.5.-	Determinación de la actividad pectinolítica.	88
3.5.1.-	Actividad pectinolítica por grupos reductores (Exo-Pectinolítica).	88
3.5.2.-	Actividad pectinolítica por viscosimetría (Endo-Pectinolítica).	88
3.6.-	Determinación de proteína extracelular.	90
3.7.-	Proceso de recuperación y concentración de pectinasas.	90
3.7.1.-	Separación de sólidos insolubles del medio fermentado utilizando una centrifuga de laboratorio Wifug.	90
3.7.2.-	Separación de sólidos insolubles del medio fermentado utilizando una centrifuga de canasta.	91
3.7.3.-	Evaluación de la capacidad de separación de sólidos insolubles de diversos medios filtrantes.	91
3.7.4.-	Estudio de la funcionalidad de algunos medios filtrantes en una centrifuga de canasta.	92

3.7.5.-	Determinación de la capacidad de separar sólidos por medio de la floculación de éstos, utilizando diferentes tipos de floculantes comerciales (aniónicos, catiónicos y no iónicos).	93
3.7.6.-	Implementación de una metodología de recuperación y concentración de pectinasas de un extracto crudo.	94
3.7.7.-	Evaluación de la eficiencia de separación y concentración de sólidos de las operaciones unitarias empleadas (centrifugación, filtración y floculación).	96
3.7.7.1.-	Caracterización del medio fermentado, del cultivo clarificado y de los sólidos separados de cada etapa.	96
3.7.7.1.1.-	Determinación de la densidad aparente del extracto crudo.	96
3.7.7.1.2.-	Cuantificación de sólidos totales del extracto crudo.	97
3.7.7.1.3.-	Medición de sólidos separados en base húmeda del medio fermentado.	97
3.7.7.1.4.-	Cuantificación de sólidos separados en base seca del medio fermentado.	97
3.7.7.1.5.-	Determinación de sólidos residuales.	97
3.7.7.1.6.-	Medición de la acción de floculantes sobre la separación de sólidos del medio fermentado.	98
3.7.7.1.7.-	Determinación de humedad al concentrado sólido con actividad pectinolítica obtenido.	98
IV.-	RESULTADOS Y DISCUSION.	99

4.1.-	Influencia del pH inicial de fermentación sobre la producción de pectinasas por <i>Aspergillus sp.</i>	99
4.2.-	Procesos de recuperación y concentración de pectinasas.	104
4.2.1.-	Caracterización del extracto crudo.	104
4.2.2.-	Separación de sólidos insolubles del medio fermentado (extracto crudo) utilizando una centrífuga de laboratorio Wifug.	104
4.2.3.-	Separación de sólidos insolubles del extracto crudo utilizando una centrífuga de canasta.	105
4.2.4.-	Capacidad de separación de sólidos insolubles de diversos medios filtrantes.	107
4.2.4.1-	Eficiencia de separación de sólidos insolubles de mallas sintéticas.	107
4.2.4.2-	Remoción de sólidos insolubles de telas metálicas.	108
4.2.5.-	Funcionalidad de algunos medios filtrantes en una centrífuga de canasta.	110
4.2.6.-	Capacidad de separación de sólidos de floculantes comerciales.	111
4.2.7.-	Procesamiento de pectinasas : separación y concentración a partir de un extracto crudo.	114
V.-	CONCLUSIONES.	125
VI.-	SUGERENCIAS.	130
VII.-	BIBLIOGRAFIA.	131

I.- INTRODUCCION.

Las pectinasas son un complejo de enzimas que catalizan la hidrólisis de sustancias pécticas, que forman parte del tejido de frutas y vegetales.

Es de interés la recuperación de estas enzimas, ya que pueden ser utilizadas en la manufactura de diversos productos, principalmente en el procesamiento de jugos y preparados a base de frutas y vegetales en la industria alimentaria (Kilara, 1982 y Whitaker, 1984).

La demanda de estos biocatalizadores se ha incrementado anualmente, lo que ha originado a enfocar la investigación hacia aumentar la producción y aplicación de estas enzimas empleando diversas metodologías. Encontrando de esta manera que existe un gran número de reportes sobre el tema y de manera contrastante y sorprendente pocos estudios sobre el desarrollo y optimización de las operaciones unitarias involucradas en la recuperación y purificación de las mismas; cabiendo señalar que ésta etapa final del proceso global de producción, llega a constituir hasta un 80 % del costo total del producto.

Con base en lo antes mencionado surge el interés de estudiar y evaluar algunas operaciones unitarias para la separación y concentración de pectinasas; con el fin de proponer una metodología eficaz para dicho propósito.

El presente trabajo consistió en dos partes experimentales. La primera parte se enfocó a la producción de enzimas pécticas mediante fermentación en cultivo sumergido en donde se evaluó la influencia del pH inicial de la fermentación sobre la biosíntesis de pectinasas. Esta etapa se realizó con la finalidad de encontrar el pH que nos permitiera obtener la mayor actividad pectinolítica; para realizar posteriormente los estudios de recuperación.

La segunda parte del trabajo plantea el estudio de algunas operaciones de separación y concentración de dichas enzimas. En ésta fase se determinó inicialmente la eficiencia de separación de sólidos del medio fermentado de una centrifuga de canasta, de diversos medios filtrantes (mallas sintéticas de diversos materiales -nylon, poliéster y polipropileno- y telas metálicas de acero inoxidable de diferentes aberturas) y de diferentes floculantes comerciales (aniónicos, catiónicos y no iónicos); determinando principalmente sólidos separados por cada etapa y sólidos residuales en el extracto clarificado; se relacionaron estos resultados, con los correspondientes obtenidos en una centrifuga wifug (5000 r.p.m., 15 min.; la cual fue el control de separación de sólidos) para calcular la eficiencia de separación de sólidos de cada operación. También se evaluó la

repercusión de estas técnicas de recuperación sobre la actividad pectinolítica inicial y se seleccionó el floculante y material filtrante más adecuado y eficiente para dicho propósito considerando además su costo y disponibilidad en el mercado.

Finalmente se estudiaron diferentes secuencias de recuperación y concentración de pectinasas, empleando diferentes equipos (centrífuga de canasta, centrífuga de discos, evaporador rotatorio y un secador); evaluando la eficiencia de separación de sólidos (se cuantificó sólidos residuales y en el caso del proceso de secado se midió el porcentaje de recuperación de sólidos) y su influencia sobre la actividad pectinolítica de cada etapa (se determinó proteína total, actividad específica pectinolítica y su porcentaje de recuperación), con la finalidad de obtener un producto concentrado con la actividad de interés.

II.- GENERALIDADES.

2.1.- Recuperación de Enzimas.

Alrededor de 3000 enzimas son conocidas (Enzymes Nomenclature, 1978) y únicamente pocas son producidas a gran escala y usadas industrialmente. Estas son principalmente enzimas hidrolíticas extracelulares, las cuales degradan polímeros tales como almidón, proteínas, pectinas y celulosa. Una considerable excepción sin embargo es la glucosa isomerasa. Las enzimas más importantes producidas industrialmente y sus porcentajes en el mercado, son mostrados en la Tabla 1.

Un proceso de fermentación típica da una mezcla de sólidos dispersos (la masa celular, tal vez con algún componente del medio de cultivo, etc.) y una solución acuosa diluida; el producto deseado puede estar dentro de las células o en el medio acuoso, diluido, ó incluso distribuido entre ambos. En cualquier caso su recuperación, concentración, y purificación requerirá cuidadosas y efectivas operaciones que están también restringidas por la economía de la producción y además, los bioproductos son frecuentemente compuestos muy lábiles ó sensibles, cuyas estructuras activas pueden mantenerse solamente bajo condiciones definidas y limitadas de pH, temperatura, fuerza iónica, etc. (Schmidt y col, 1987). La aplicación de enzimas como reactivos y aditivos en la química clínica, como agentes en quimioterapia y en procesos industriales se está incrementando de forma importante. Los avances en la genética molecular han venido a determinar el "desarrollo" e importancia que tienen los procesos de recuperación y purificación de proteínas. Los procesos continuos son por consiguiente los mejores descritos para la recuperación y purificación de productos proteicos de interés a partir de grandes volúmenes de cultivo fermentado. La gran mayoría de enzimas de uso industrial son proteínas extracelulares, procedentes de *Aspergillus sp.* ó *Bacillus sp.* e incluye a las enzimas: α -amilasa, β -glucanasa, celulasas, dextranasas, proteasas, glucoamilasa, etc. (Ward, 1989). En estas enzimas el grado de purificación requerido es mínimo y la escala normal de operación produce toneladas de producto. Por otro lado se necesitan ó utilizan otras muchas enzimas para uso no industrial. Estas enzimas son intracelulares y se forman en cantidades mucho más bajas, como ejemplo se pueden citar : asparaginasa, catalasa, colesterol oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; las cuales son generalmente producidas en cantidades de kilogramos que se obtienen a partir de

Tabla 1. Principales enzimas producidas industrialmente.

Enzima	Microorganismo Fuente	Reacción Catalizada	pH Opt.	Temp. Opt. (°C)	Producción Anual (tons. de enzima)	% de ventas en la escala mundial
Proteasa(Bacillus)	Bacillus sp.	Hidrólisis de proteínas(Endo)	8-11	60	500	40
Proteasa(Fungal)	Aspergillus sp. Nucor sp.	Hidrólisis de proteínas(Endo)	4-6	60	20	8
α -amilasa (Bacterial)	Bacillus sp.	Hidrólisis de almidón(Endo)	5-7	110	300	12
α -amilasa (Fungal)	Aspergillus sp.	Hidrólisis de almidón(Endo)	4-5	60	10	3
Glucamilasa	Aspergillus sp.	Hidrólisis de almidón(Exo)	4-5	60	300	14
Pululanasa	Bacillus sp.	Hidrólisis de enlaces α -1,6	6-7	60	n.c	<1
Glucosa isomerasa	Streptomyces sp. Actinoplanes sp. Bacillus sp.	Isomerización de D-glucosa a D-fructosa	6,5-8,5	90	50	12
Pectinasa	Aspergillus sp.	Hidrólisis de ácido poligalacturónico y metil ésters	4-5	50	10	10
Celulasa	Trichoderma reesei	Hidrólisis de celulosa	4-5	50	n.c	<1
Lactasa	Aspergillus sp.	Hidrólisis de β -D-galactosidos	3,5-6,6	55	n.c	<1
Lipasa	Aspergillus sp. Rhizopus sp. Nucor sp.	Hidrólisis de ésters de ácidos grasos	5-7	40	n.c	1

n.c. = no conocido, probablemente <10
Fuente: Prave, P (1982).

FALLA DE ORIGEN

cientos ó miles de litros de cultivo. En este último caso a veces las enzimas son también purificadas hasta homogeneidad, en este caso los procesos y etapas de purificación son más estrictos y, por lo tanto, la recuperación final es menor incrementándose su valor agregado. En la Figura 1. se ilustra el efecto del número de etapas de recuperación, purificación y rendimiento por etapa en el proceso global.

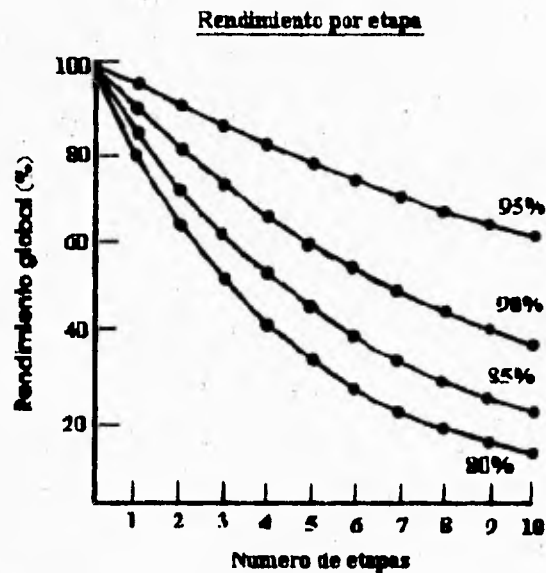


Fig . 1. Efecto del número de etapas de recuperación y rendimiento por etapa en el proceso final.

2.1.1.- Estabilidad enzimática.

Un problema que se presenta cuando se trata de purificar una enzima es la pérdida de su actividad enzimática, al ser liberadas de su ambiente natural de protección, se someten a una variedad de efectos estresantes que son capaces de resistir. Las enzimas extracelulares son una excepción ya que están diseñadas para operar en ambientes más hostiles. Es por esto que los primeros estudios exitosos sobre purificación de proteínas y determinación de su estructura se hicieron con enzimas extracelulares, están presentes en un porcentaje relativamente alto de proteína en el extracto crudo. Las proteínas solubles,

citoplasmáticas ó las que se encuentra dentro de los organelos están presentes en medios concentrados de proteínas, donde existe una baja tensión de oxígeno en algunos casos y una gran variedad de compuestos reductores; también se encuentran metabolitos en cantidades substanciales que tienen como función estabilizar la enzima. Tan rápido como la muestra se somete a rompimiento celular, las proteínas son liberadas de este ambiente de protección y son diluidas en un buffer de extracción completamente oxigenado.

El mantenimiento de la estabilidad de la enzima durante el proceso de depuración representa una importancia suprema, mientras que la manipulación cuidadosa del material y las bajas temperaturas pueden incrementar los rendimientos de forma drástica. El aislamiento, recuperación y purificación de una enzima dependen en gran medida de la separación de sólidos del caldo fermentado, para productos con estabilidad limitada, las operaciones de recuperación frecuentemente requieren de un control adecuado de temperatura, pH, concentración de sales ó composición del solvente, proteólisis, etc.; en especial para proteínas con actividad biológica ó catalítica, la cual depende de la integridad de la estructura molecular -estructura secundaria, terciaria y cuaternaria- (Dunnill, 1971).

a) Desnaturalización.

Este tipo de pérdida estructural de la enzima puede disminuirse si se eliminan los efectores que la provocan, entre los cuales se encuentran principalmente pH, temperatura y fuerza iónica extremas, además de algunos solventes orgánicos. El pH natural dentro de la célula tiene valores de 6-8, así que buffers dentro de este rango ó lo más cercano al valor del pH interno en la célula deben usarse para proteger a la enzima de la desnaturalización.

Se acostumbra efectuar la purificación de enzimas a temperaturas bajas ya que las enzimas resultan ser lábiles, reducir la temperatura 20 °C disminuye la velocidad de los procesos en un factor de 3 a 5, por lo que el enfriamiento resulta benéfico. Algunas enzimas también se desnaturalizan por bajas temperaturas ó enfriamiento, debido al debilitamiento de las fuerzas hidrofóbicas que mantienen a la molécula unida. Debe tomarse como precaución mantener a la solución sobre hielo cuando no se someta a procesos de extracción y evaluarse la decisión en un proceso de purificación.

El sitio activo de las enzimas contienen residuos de aminoácidos responsables de la habilidad catalítica de la misma y son susceptibles a modificaciones por los factores ya mencionados y por la presencia de inhibidores u otros compuestos reactivos, lo cual conduce a una disminución ó pérdida total de actividad. El residuo que causa más problemas es la cisteína, los residuos sulfhidrilos en el sitio activo, los cuales a la exposición de tensiones altas de oxígeno conducen a acomplejarse de varias formas que incluyen formación de enlaces disulfuro, oxidación irreversible a ácido sulfónico. La formación de disulfuros se ve acelerada por la presencia de iones divalentes que pueden activar a la molécula de O_2 y acomplejarse con los sulfhidrilos. Se pueden tomar dos medidas de protección contra este efecto, una sería remover las trazas de iones metálicos usando un agente acomplejante como el EDTA ó incluir agentes reactivos como sulfhidrilos en la solución como el mercaptoetanol. Deben de usarse en concentraciones entre 5 y 20 mM, ya que concentraciones menores se convierten a disulfuro debido a la oxidación : la habilidad protectora se pierde a las 24 h, a menos que la solución se mantenga en condiciones aeróbicas. Sin embargo, la formación de enlaces disulfuro es irreversible e indeseable. Otros agentes protectores de sulfhidrilos son el 2,3 di-mercapto-propanol, tioglicolato y glutation. (Huang y col, 1985).

b) Proteólisis.

Las células vivas contienen los elementos para su propia destrucción, llamadas enzimas digestivas hidrolíticas tales como, nucleasas, hidrolasas, fosfatasa y proteasas. En los microorganismos, las enzimas hidrolíticas se encuentran ampliamente entre la membrana plasmática y la pared celular, con el propósito de digerir las macromoléculas extracelulares. El proceso para obtener un extracto enzimático destruye casi inevitablemente el delicado balance entre éstas membranas y permite que éstas enzimas se mezclen con el contenido celular. Las enzimas proteolíticas son de un interés particular y se requiere una homogeneización vigorosa para que se liberen, por lo que se debe aceptar que las enzimas proteolíticas estarán presentes y se debe hacer algo respecto a ellas.

Hay compuestos inhibidores proteolíticos, pero desafortunadamente existen diferentes clases de enzimas proteolíticas y no todas pueden ser inhibidas. Entre éstas tenemos : serin-proteasas, tiol-proteasas , proteasas-ácidas, metaloproteasas, carboxipeptidasas y peptidasas.

El principal problema de las enzimas proteolíticas son las serin-proteasas, su efecto se combate utilizando DFP (di-isopropil fluorofosfato), peligroso porque es volátil y ataca otras serin-hidrolasas de vital importancia. Otro agente utilizado es el fluoruro de fenil-metil-sulfonyl, que ha hecho de la proteólisis un proceso menos peligroso, aunque no es muy soluble, puede hacerse disolver en acetona, se hidroliza muy rápido y se añade directamente a la solución que contiene serin-esterasas (Belter y col, 1988).

2.1.2.- Objetivos de la recuperación y purificación de una enzima de uso industrial.

- 1.- Eliminar impurezas :
 - 1.1.- Restos ó debris celular (micelio, células, etc.).
 - 1.2.- Sustrato residual.
 - 1.3.- Sales solubles e insolubles que modifiquen su estabilidad.
 - 1.4.- Productos.
 - 1.5.- Biomoléculas (péptidos, proteínas, ADN, etc.)
- 2.- Obtener la enzima en forma concentrada (líquida ó en polvo).
- 3.- Obtener una enzima con determinada pureza y actividad específica, dependiendo de su aplicación.
- 4.- Obtener un producto comercial con alta estabilidad, fácil manejo y aplicación.

2.1.3.- Procesos de Separación.

La literatura científica en general reporta numerosos artículos referentes a la producción y aplicación de la mayoría de las enzimas; pero sin embargo, poco se ha escrito sobre el desarrollo y optimización de las operaciones unitarias industriales de recuperación y purificación, aun cuando las técnicas de purificación de enzimas en el nivel de laboratorio han alcanzado un alto grado de depuración; como lo es representado la Tabla 2. Esta deficiencia de información ha sido analizada y enfatizada por algunos autores (Kula, 1979; Wang y col, 1979; Frost, 1986) para la recuperación de enzimas intracelulares en general.

Tabla 2. Operaciones de separación y purificación de bioproductos.

Propiedad fisicoquímica de separación	Método de separación	Tamaño de la partícula
Tamaño de la partícula	Filtros de mailas y telas	$> 10^8 - 10^4$ (angstroms)
	Filtración a través de fibras	$> 200 - 10\mu$
	Osmosis reversa	$10^2 - 1$ (angstroms)
	Microfiltración	$20 - 0.5\mu$
Tamaño Molecular de Difusión	Ultrafiltración	$2 - 0.005\mu$
	Hiperfiltración	$0.008 - 0.00025\mu$
	Diálisis	$0.002 - 0.00025\mu$
	Cromatografía en gel	$2 - 0.0003\mu$
Cambio de fase (Temperatura)	Cristalización	$< 0.002\mu$
	Destilación	
	Liofilización	$10^4 - 10$ (angstroms)
	Atomización	
Solubilidad	Adsorción	$< 0.002\mu$
	Extracción	
Carga Eléctrica	Electroforesis	$2 - 0.02\mu$
	Electrodiálisis	$0.02 - 0.00025\mu$
	Intercambio iónico	$0.02 - 0.00025\mu$
Diferencia de Densidad	Sedimentación	1000μ
	Decantación	$1000 - 5\mu$
	Centrifugación	$1000 - 0.5\mu$
	Ultracentrifugación	$2 - 0.02\mu$

La mayoría de los trabajos, en ocasiones mencionan de manera muy general y superficial ideas ó recomendaciones, para el escalamiento del proceso, debido en gran medida a los siguientes aspectos.

Aspectos importantes por los cuales se ve limitada la investigación y desarrollo de procesos de recuperación y purificación de enzimas a mayor escala :

- Manejo de volúmenes considerables (cientos a miles de litros).
- Infraestructura propia de una planta industrial.
- Alta inversión de capital para operación y mantenimiento de equipo e instalaciones.

- Necesidad de personal capacitado para manejo de equipo, proceso y resultados.
- Disponibilidad de equipo y refacciones ó accesorios.
- Algunos problemas de ingeniería, tales como el flujo de fluidos, transferencia de masas, y de calor que no presentan consecuencias en el laboratorio, pueden presentar una importancia grande en el caso de procesos a gran escala.
- Por restricciones como :

Muchas operaciones que son normales en el laboratorio se convierten en imprácticas o in económicas a escala de proceso. Además los bioproductos son frecuentemente compuestos muy sensibles.

La mayoría de las técnicas utilizadas en el laboratorio presentan grandes inconvenientes al pretender escalarlas a procesos industriales, a nivel planta piloto y dificultan ó hacen imposible su implantación (Frost, 1986).

La baja pureza de un gran porcentaje de preparados enzimáticos comerciales muestran la necesidad de hacer más investigación en este campo. Por otra parte, la metodología ha sido establecida por las industrias correspondientes, pero tales procesos no son del dominio público aun cuando la tecnología puede ser establecida conjuntamente entre el fabricante de la enzima y el vendedor del equipo para las diversas operaciones unitarias; dichos proveedores mantienen convenios de secrecía con sus clientes (Wang y col, 1979). Las operaciones de fermentación y recuperación forman parte del proceso global (Figura 2), de forma que la naturaleza del proceso de fermentación puede influir de forma significativa en el proceso de recuperación. En los productos difíciles de separar de las células ó de materiales contaminantes, el tiempo de recolección es con frecuencia crítico para la estabilidad de las células ó los productos, de aquí que se tenga que recurrir a las diversas operaciones unitarias de separación, recuperación y purificación, junto con el equipo requerido en cada una de ellas; la Tabla 3 y 4 nos señala tales técnicas y equipos respectivamente. Muchas operaciones que son normales en el laboratorio se convierten en imprácticas ó in económicas a escala de proceso. Por otra parte resulta claro que no existe una operación única, ideal ó universal, ni siquiera secuencias de operaciones que puedan ser recomendadas; las operaciones individuales unitarias deben ser combinadas de la forma más adecuada para cada caso. Los productos de los procesos de fermentación normalmente incluyen gases, moléculas solubles extracelulares secretadas en el caldo de fermentación y sólidos; y además es probable que la enzima de interés

Procesamiento de Proteínas.

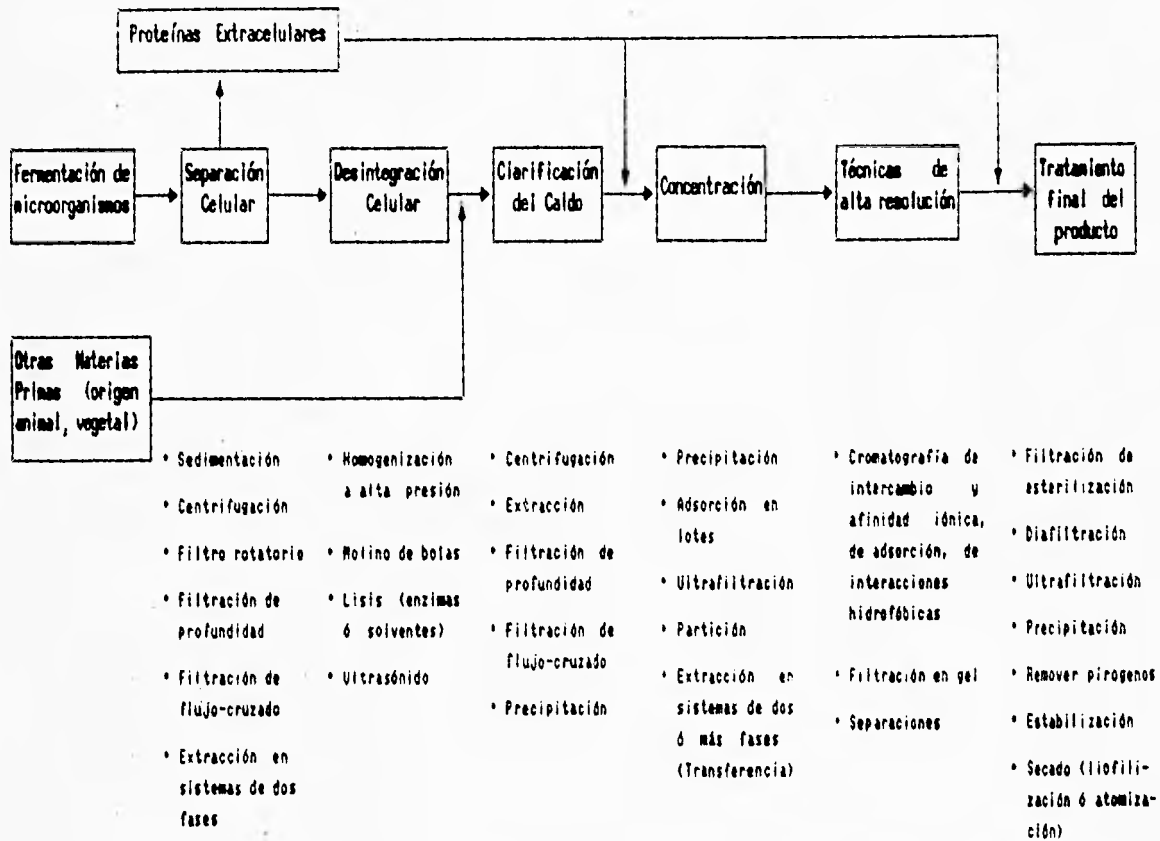


Figura 2. Diagrama de Flujo y las operaciones más comunes en el Procesamiento de Proteínas.

FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Recuperación de productos solubles a partir de los caldos clarificados y de células homogeneizadas.

Proceso / Fundamento	Naturaleza del equipo / aditivos
Separación por Tamaños	Concentración mediante : Osmosis inversa Ultrafiltración Filtración en gel
Precipitación	Adición de compuestos químicos o solventes orgánicos que reducen la solubilidad del producto
Adsorción	Adsorbentes inorgánicos—carbón activado, óxido de aluminio, hidróxido de aluminio, gel de sílice, resinas—.
Absorción por intercambio iónico	Polímeros orgánicos que contienen grupos reactivos con propiedades de cambiadores catiónicos o aniónicos.
Extracción líquido-líquido	Extracción con solventes.
Sedimentación	Tanque de Sedimentación
Floculación	Geatina, ácido tánico, iones divalentes, compuestos de amonio cuaternario, floculantes sintéticos
Centrifugación continua	Separador de sólidos Separador expulsor de sólidos Tobera de descarga del separador Tornillo decantador
Filtración discontinua	Filtro de placas (filtro prensa) Filtro rotatorio a vacío Filtración de flujo transversal

Tabla 4. Resumen de Métodos y Equipos usados en la separación de sólidos insolubles.

	Centrífuga Tubular	Centrífuga de Cámaras	Separador de discos	Separador Nozzle	Filtro Prensa	Filtro rotatorio al vacío	Decantador	Centrífuga de Canasta
Diferencia mínima en densidades (%)	2	2	2	2	---	---	>2	---
Concen --- tración de sólidos (%)	<2	<2	<1	<5	<10	>10	>40	>5
Tamaño de partícula separable (µ)	0,5-500	1-500	0,5-500	0,5-500	1-100	0,5-100	2-2x10 ⁴	5-1x10 ⁴
Máxima número-g (m ³ /s ²)	16.000	7-11.000	11.000	6-9.000	---	---	2-5.000	1.500
Máxima capacidad (m ³ /L)	3	10	200	200	4m ³ /h·m ²	5 t/h	5 t/h	>0,5 t
Volumen en el sistema (L)	10	60	60	100	variable	>5m ²	50-100	60-600
Energía requerida (kW)	1,5	15	6	15	>10	12	15	25
Llenado	manual	manual	manual	automática continua	manual	sistema automático de descarga	automática continua	manual
Intervalo de limpieza	horas	horas	horas	semanas	semanas ó menos	semanas meses	500-700 h	horas-semanas dependiendo de la operación
Tiempo de limpieza	corto	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio

Fuente: Prave P y col. (1989)

se encuentre en el medio de extracción solamente en una proporción mínima en relación al total de proteínas (generalmente, 0,01-1 %). Por ello, en las etapas de la purificación enzimática se debe de eliminar una gran parte de sus contaminantes, como agua, carbohidratos, proteínas, etc. (mediante técnicas adecuadas (Tabla 5), tanto como sea posible y de la forma más fácil (Gacesa y Hubble, 1990).

En la inmensa mayoría de los casos de purificación, la primera etapa de esta, inicia una vez terminada la fermentación y consiste en la separación de los sólidos del medio de cultivo agotado (generalmente células como micelio u otros componentes celulares, componentes sólidos del medio de reacción), que es casi siempre acuoso, para obtener un producto más puro y de mayor actividad enzimática. Esto se realiza también para reducir el volumen y concentrar el producto de interés. La separación de sólidos de líquidos es una operación clave en el aislamiento de una enzima y normalmente se lleva a cabo por centrifugación ó filtración. La centrifugación es frecuentemente empleada para recobrar los productos intracelulares mientras que la filtración es usada cuando son extracelulares. En Figura 3 se presentan las operaciones que intervienen en un proceso de recuperación de biomasa microbiana, polisacáridos y enzimas extracelulares.

La centrifugación del caldo es la técnica más usada y existen equipos de laboratorio e industriales, en donde destacan, principalmente las marcas Alfa Laval y Westfalia, que procesan volúmenes de hasta 20 m³ por hora. Por otra parte, en los últimos años se han utilizado técnicas de filtración con flujo tangencial con membranas con diámetro de poro promedio de 0.5 µm, lo cual permite obtener concentraciones de biomasa más altas, en escala industrial, que las obtenidas por centrifugación. Sin embargo esta técnica novedosa aún no compite con la centrifugación en términos económicos (Frost, 1986). En la Tabla 6 se mencionan algunas de las propiedades más importantes a considerar de las células para ser separadas del medio fermentado. El mejoramiento de los procesos de separación sólido-líquido en la Biotecnología, está asociado principalmente al tamaño de las células y partículas (más dificultad al ser más pequeñas), la diferencia de densidad sólido-líquido y a la fuerza mecánica.

Tabla 5. Separación de Materiales Contaminantes

Tipo de Contaminante	Técnica de Separación	Equipo Usado
Agua del caldo	Evaporación	Evaporadores de Multietapas Columnas de destilación
Agua y sales del caldo	Separación por medio de membranas Partición en fases Cristalización / Precipitación del producto	Ultrafiltración (UF) Osmosis reversa (OR) Extractores centrifugos, y decantadores, tanques de mezclado sedimentación Tanques de agitación, Evaporadores (Cristalizadores) Cristalizadores Tubulares
Células y restos celulares	Filtración Sedimentación	Filtro Rotatorio a vacío Filtro Prensa Centrífugas de discos, decantadoras, de cámaras y tubulares
Salas	Separación por medio de membranas Difusión	Diafiltración (DA), Diálisis Filtración en gel Electrodiálisis Columnas de permeación en gel
Carbohidratos	No específica Pero se puede emplear la Cristalización, Precipitación, Extracción en fases y Sorción	Varios como para separar agua y sales del caldo.
Compuestos Químicos Orgánicos	Diferencia relativa de volatibilidad Diferencia de solubilidades	Destilación Cristalización relativa
Color	Separación por medio	Columnas empaquetadas con carbon granular activado

Acidos Nucleicos	Precipitación Solubilización por vía enzimática	Tanques de agitación y separadores sólido / líquido Tanques de agitación
Proteínas	Coagulación Térmica Cromatografía de Adsorción, intercambio iónico, interacciones hidrofóbicas Separación por tamaño, Precipitación (con solventes, sales, otros)	Intercambiadores ó Tanques de agitación enchaquetados con separadores sólido / líquido Columnas con resinas sintéticas , tanques ó columnas con gel UF, tanques con agitación ó reactores tubulares con separadores sólido / líquido
Enzimas	Precipitación como para proteínas Membranas Sorcion como para proteínas	Tanques con agitación ó reactores tubulares con separadores sólido / líquido UF, como para proteínas
Partículas finas	Filtración de profundidad	Cartuchos y filtros de membrana, filtro prensa, filtros de mallas
Bacterias	Filtración-esterilización	Filtros de membranas con diámetro absoluto de 0.2µ
Pirógenos	Intercambio ó remplazo de solución con agua ó solución tampón Separación por tamaño	Varios UF (únicamente partículas pequeñas) Filtros bajo presión, Filtros de cartucho
Agua en producto	Secado por evaporación Sublimación Difusión selectiva	Secadores por atomización, Secadores rotatorios a vacío Liofilización Per vaporización

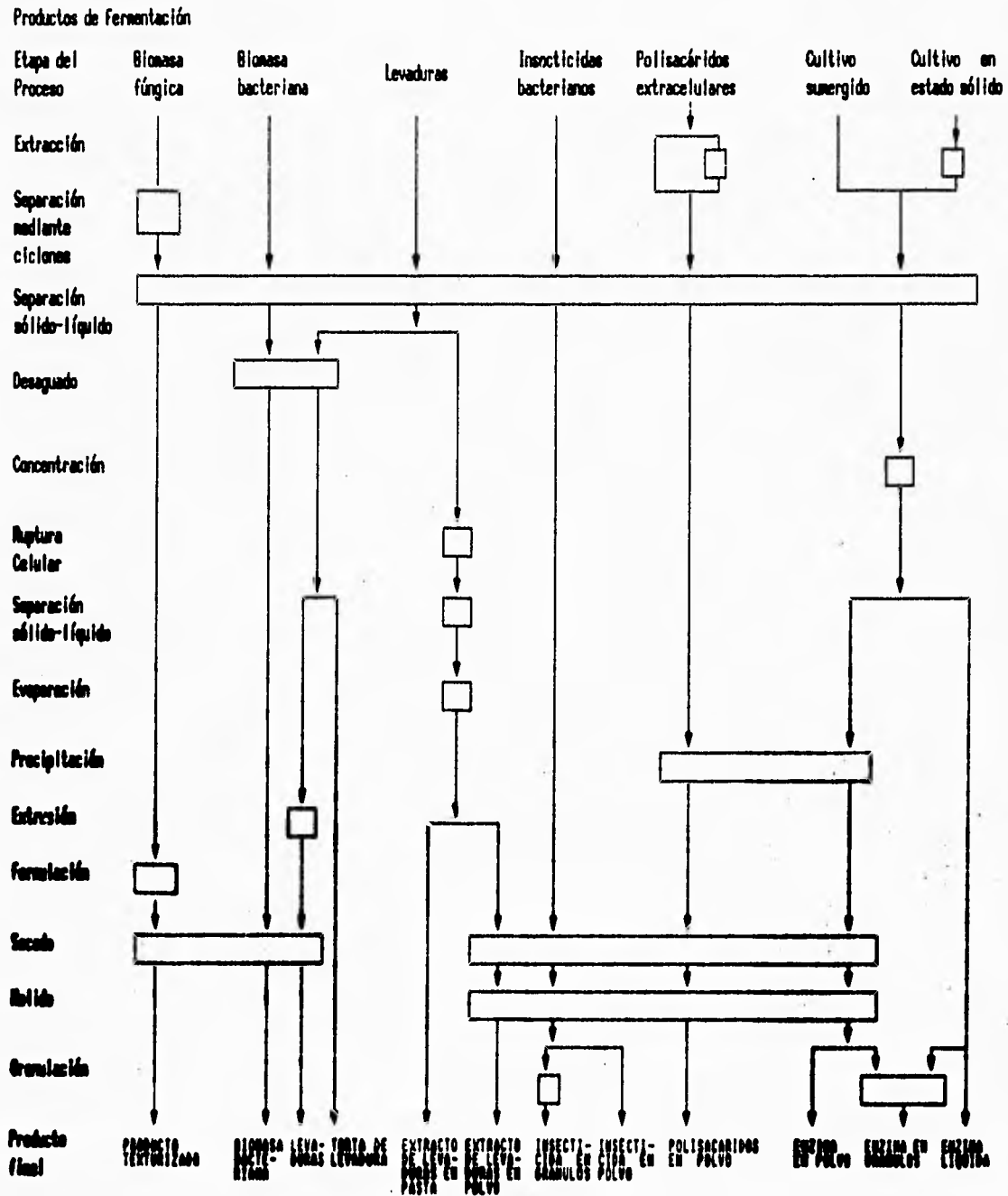


Figura 3. Proceso de recuperación de biomasa microbiana, polisacáridos y enzimas.

Tabla 6. Propiedades de las células en relación a la separación.

Propiedades	Bacterias	Levaduras	Hongos
Forma	Bastones, cadenas de esferas	Esteras, filamentos, elipsoideos	Filamentos
Tamaño	0.5-3 μm	1-50 μm	5-15 μm (diámetro) 50-500 μm (longitud)
Peso específico	1.05-1.1	1.05-1.1	1.05-1.1
Peso de la célula	10^{-12} g	10^{-11} g	-
Tipo de Operación de separación.	Gran escala comercial y nivel laboratorio: Centrifugación.	Gran escala comercial y nivel laboratorio: Centrifugación.	Gran escala comercial y nivel laboratorio: Centrifugación.

Como podemos apreciar la gravedad específica de las células, no es mucho más grande que la del caldo de fermentación, lo cual dificulta su separación por métodos en los cuales se involucra directamente la fuerza de gravedad. El tamaño de las células puede también causar dificultades con las bacterias, pero al ir aumentando su tamaño su separación es más fácil, a veces incluso por simple reposo en tanques decantadores.

2.1.3.1.- Procesos comúnmente empleados para la separación inicial sólido-líquido (sólidos inso lubles) en el procesamiento de bioproductos.

A menudo se inicia la recuperación del producto eliminando las fracciones de mayor tamaño, los microorganismos, los materiales celulares y sólidos de los nutrientes. En el caso más usual el producto se encuentra disuelto en el extracto, entonces se emplearán operaciones enfocadas a clarificarlo.

Como se ha mencionado, el primer paso es la remoción de los sólidos suspendidos en el extracto. Los métodos utilizados se clasifican de acuerdo a la fuerza controlante que produce la separación. El primer paso deberá ser un

cribado para remover los sólidos de mayor tamaño y luego filtración, centrifugación, etc.; esto depende de lo que se desee recuperar, micelio, levaduras, esporas, bacterias, enzimas ó metabolitos. La forma más simple de hacerlo es mediante el uso de filtración ó centrifugación. La selección del equipo más adecuado depende de varios factores dentro de los que se encuentran el tamaño de partícula, la viscosidad del medio, densidad entre las fases a separar, etc.

2.1.3.1.1.- Filtración.

Mediante este proceso se separan los sólidos de un líquido forzando la suspensión a través de un soporte sólido ó de un medio filtrante. El tamaño pequeño y la deformación de los microorganismos hacen de la filtración del extracto de fermentación, un proceso más complicado. De hecho si se desea filtrar usando la tecnología convencional, el proceso resulta muy lento.

Para la eliminación de sólidos de líquidos el método más ampliamente aceptado es la centrifugación, pero no es una técnica ideal para el trabajo a gran escala principalmente por costos y el volumen limitado de operación. Por ello se han investigado otros procesos y la filtración en especial; además a diferencia de la centrifugación esta no depende de la diferencia de densidad. Es el método más ampliamente usado para separar hongos filamentosos y levaduras filamentosas, de los caldos de fermentación; las levaduras y la mayoría de bacterias son más difíciles de filtrar efectivamente por su pequeño tamaño; aunque puede también ser utilizado para los flóculos de levaduras. La filtración puede ser llevada a cabo como filtración de superficie, filtración en profundidad ó filtración por centrifugación, en todos estos casos la fuerza motriz es la presión, sea creada por sobre presión o por vacío. La velocidad de filtración ó volumen de filtrado recogido en un tiempo determinado es función de la superficie del filtro, la viscosidad del fluido y la caída de la presión a través del material del filtro y de la torta depositada sobre el filtro. La resistencia del medio filtrante y de la torta formada es crítica y depende de su compresibilidad. Para materiales no compresibles, la velocidad de filtración se hace independiente de la presión, pero la mayor parte de los materiales biológicos son compresibles, de manera que la resistencia de la torta aumenta con el tiempo, la filtración se dificulta y aumenta el volumen de dicha capa.

Los extractos de fermentación son difíciles de filtrar por su alta viscosidad no Newtoniana ó por la alta compresibilidad de la torta de filtrado, esto se presenta en

extractos de bacterias. Estos extractos biológicos a menudo requieren pretratamientos tales como calentamiento, coagulación y floculación, adsorción sobre ayuda filtro, etc.

La filtración es el método mejor establecido y más versátil para remoción de insolubles de soluciones diluidas como los extractos de fermentación. La filtración puede estar acompañada por una gran variedad de equipo. La teoría existente es suficiente para analizar datos pero no es suficiente para diseñar sin experimentos de laboratorio. Muchas suspensiones biológicas son difíciles de filtrar, la filtración es lenta con filtrados, que resultan ser pastas compresibles, cuando la filtración resulta ser difícil se debe considerar la centrifugación.

2.1.3.1.2.- Empleo de filtro ayuda .

Los coloides del extracto de fermentación se adsorberán sobre las partículas del filtro ayuda y dos de los principales problemas se resuelven particularmente para los extractos de organismos con micelio. El primero es la compresibilidad de la biomasa acumulada con una reducción en la permeabilidad del filtrado, el efecto del filtro ayuda es disminuir la compresibilidad de la torta de filtración. El segundo problema es la penetración de partículas pequeñas como fragmentos de micelio ó células del microorganismo en la matriz del filtro que puede bloquear los poros.

Existen dos tipos diferentes de filtros ayuda, las tierras diatomeas que son los restos de esqueletos de diminutas plantas acuáticas y las perlititas que son rocas volcánicas procesadas para obtener una forma expandida. Pueden existir desventajas al usar filtros ayuda, la claridad del extracto disminuye y algunos metabolitos se enlazan irreversiblemente a las tierras de diatomeas. La ayuda filtro se agrega directamente al extracto de fermentación, su consumo es de 5 a 10 % (W/V) en caso de adición directa. algunas veces los sólidos acumulados son mínimos debido al rápido flujo transversal a través de la superficie del medio filtrante.

La teoría general de filtración incluye la revisión de las ecuaciones de mecánica de fluidos que son importantes para filtración, descrita como la Ley de Darcy que relaciona la tasa de flujo a través de un lecho poroso de sólidos con la caída de presión que causa el flujo, se resuelve para tortas incompresibles y luego para tortas compresibles que es el caso que se presenta en un proceso de bioseparación. (Baker y col, 1998)

La adición de filtro ayuda puede ser únicamente recomendada para productos extracelulares; en el caso de compuestos intracelulares, el microorganismo podría llegar a ser contaminado por una alta concentración de filtro ayuda, lo cual podría ocasionar varios problemas en el procesamiento posterior. Como una alternativa, puede ser usado el filtro rotatorio al vacío.

2.1.3.1.3.- Filtración en equipo.

Los dos tipos de equipos de mayor uso en el procesamiento de materiales biológicos son el filtro rotatorio al vacío y el filtro prensa.

2.1.3.1.3.1.- Filtro Prensa ó de Placas.

Son baratos y versátiles puesto que el área superficial puede ajustarse variando el número de placas, aunque no son adecuados para la eliminación de grandes cantidades de sólidos de los caldos puesto que las placas deben desmontarse para poder proceder a su recuperación, transformándose en un proceso discontinuo. Se utilizan ampliamente como dispositivos de limpieza final para eliminar cantidades bajas de sólidos residuales de los caldos de cultivo ó de otros líquidos, por lo tanto su capacidad de carga es limitada a veces son utilizadas combinaciones de filtros a presión; especialmente para operaciones discontinuas. Los filtros prensa son operados con presiones arriba de 20 bares para poder tener velocidades de flujo relativamente altos, estas son usadas para suspensiones las cuales son difíciles de filtrar y requieren de ayuda filtro. Las principales desventajas de estos filtros es que es una operación discontinua y el largo tiempo empleado para remover los sólidos de los filtros, limpiarlos y reensamblarlos.

2.1.3.1.3.2.- Filtro Rotatorio a Vacío.

Se utilizan mucho para clarificar grandes volúmenes de líquido con descarga automática de sólidos y para manufactura de antibióticos. La acumulación de fines ó de suspensiones gelatinosas de bacterias u otros materiales en los filtros puede ayudar a la filtración ó incluso llegar a bloquearla, por lo que es una práctica común el empleo de auxiliares de filtración que mejoran la porosidad de la torta de filtración, estos auxiliares pueden incorporarse al filtro en forma de precapa ó puede mezclarse con el caldo de cultivo. Eliminan satisfactoriamente micelio, como

por ejemplo de *Penicillium* y *Streptomyces*. En estos, el elemento de filtración es un tambor rotatorio mantenido bajo presión interna reducida. El tambor rota dentro del líquido que va a filtrar y su continua rotación permite las operaciones esenciales de filtración. Para evitar la acumulación de biomasa, micelio, etc., sobre la superficie del filtro, que aumentará la resistencia a la filtración, dichos filtros son frecuentemente ajustados con una cuchilla de descarga, cuando se quiere separar micelio que forma una especie de lamina, puede ser levantado el filtro mediante cordeles. La ayuda filtro que normalmente se coloca en el tambor ayuda a impedir la obstrucción y permite que se mantenga una caída de presión constante. Las propiedades de filtración dependen fuertemente de llevar a cabo una etapa de pretratamiento del caldo, como ya se mencionó, adicionando una ayuda filtro, modificando pH, temperatura (en algunos casos disminuye la resistencia de la torta), precipitación ó coagulación de las proteínas, etc.

Las mayores ventajas son la eficiencia de la filtración, con elevación mínima de la temperatura, el bajo consumo de energía y la integración de la filtración en el lavado y la parcial eliminación de agua. Los filtros rotatorios al vacío son comercialmente disponibles arriba de 100 m² de área de filtro. Dependiendo de el diámetro de el tambor y el contenido de agua residual en la torta; el tambor es operado entre 0.1 y 3 r.p.m.. Es ampliamente usado en la producción de enzimas extracelulares.

2.1.3.1.4.- Filtración con Flujo Tangencial (Flujo cruzado).

Es un método efectivo para la separación de células a partir de líquidos en los procesos que están implicados productos de alto valor, ya que el movimiento paralelo del fluido con respecto a la membrana ayuda a reducir el espesor de la capa de células de la superficie del filtro. La velocidad del flujo de filtración viene controlada usualmente por la resistencia ofrecida por esta capa de células, más que por la de la propia membrana. El problema presentado de polarización, en los sistemas de membranas convencionales, se reducen en los sistemas de filtración de flujo cruzado, puesto que en el flujo cruzado; el movimiento del fluido paralelo a la superficie del filtro, en el que el flujo del líquido forma ángulo recto con la dirección de la filtración, eliminando continuamente el soluto acumulado (Ward, 1989). Algunos autores mencionan la ineficiencia de esta técnica para la clarificación de bacterias (ó de homogenados animales) y para la eliminación de precipitados de proteínas, las cuales son normalmente de naturaleza gelatinosa y

filtran inadecuadamente salvo que las condiciones de precipitación pueden ser ajustadas para obtener un precipitado consistente; pero Quirk y Woodrow (1983) demuestran con un sistema Pellicon de Millipore, la capacidad para clarificar dos extractos bacterianos (*Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas sp.*) que contenían las enzimas arilacilamidasa (Hammond, 1983) y carboxipeptidasa G2 (Baird y col, 1976) respectivamente. Actualmente se cuenta con un nuevo tipo de membrana asimétrica, que puede mejorar concentraciones altas de sólidos, estas son comercializadas por Dornick Hunter Filters Ltd (Birtley, Co., Durham, U.K). También se han aplicado a gran escala, para la recolección de células bacterianas de 500 litros de un cultivo fluido, necesiándose 2.5 horas y 7.5 m² de membrana (Ward y Atkinson, 1984).

2.1.3.1.5.- Centrifugación.

Cuando los extractos de fermentación no son fácilmente filtrados, algunas veces pueden ser separados mediante centrifugación. Este proceso requiere de equipo más costoso que el de filtración. Sin embargo a menudo es efectivo aún cuando las partículas sólidas sean pequeñas.

La centrifugación utiliza la diferencia de densidad entre las partículas y el fluido de su alrededor. Cuando una suspensión se deja reposar, los sólidos más densos se asientan lentamente, este asentamiento es acelerado mediante un campo centrífugo. Los sólidos concentrados mediante centrifugación produce una pasta, diferentes de las producidas por filtración.

La elección del equipo de centrifugación depende del tamaño del organismo, impurezas (restos celulares, sustrato residual, etc.) y del caudal requerido, y en muchos casos hay que compensar la eficiencia de la separación frente al caudal. Existe una gran variedad de centrifugas, con rangos de capacidad desde las de menos de 1 mL, hasta aquellas que manejan metros cúbicos y que manejan una fuerza centrífuga superior a los 100,000 xg. Sin embargo, para el depósito de células bacterianas, del detritus celular ó de los precipitados proteicos son suficientes fuerzas que sobrepasen los 20,000 xg. No son tan frecuentes las máquinas capaces de llevar a cabo estos procesos y de manipular grandes cantidades de material. La ecuación que rige esta operación unitaria es la siguiente (Schmidt-Kastner y Golker, 1987):

$$Q = \frac{d^2 \Delta \rho a}{18\mu}$$

donde Q es la tasa de flujo, d es el diámetro de la partícula, $\Delta\rho$ es la diferencia de densidades entre las partículas y el medio, a es la aceleración del campo ($N \times g$) y μ es la viscosidad del medio. En centrifugas convencionales frecuentemente no se logran separaciones adecuadas, debido a que la diferencia de densidades entre los restos celulares, algunos componentes sólidos del medio y el líquido (agua en su mayor proporción) es pequeña, y la viscosidad del caldo es grande. También algunos autores (Kula, 1979; Frost, 1986) han reportado que las centrifugas de gran capacidad pueden desarrollar aceleraciones limitadas. Para este fin es más conveniente el uso de centrifugas de canasta, que combinan los principios de centrifugación y filtración (Frost, 1986). Las centrifugas utilizadas en las fermentaciones a gran escala con recuperación de sólidos tienen que ser continuas y deben de disponer de un mecanismo de descarga de sólidos. Las toberas de descarga son adecuadas para la recuperación de levaduras y bacterias, aunque tienden a atascarse con los micelios fúngicos o con materiales cuyo tamaño de partícula sea grande.

Las centrifugas de flujo continuo : en las primeras etapas de los procesos de purificación enzimática a gran escala es necesario eliminar diferentes sólidos a partir de varios litros de suspensión. En este tipo de equipo los sólidos depositados son retenidos en el rotor de la centrifuga y el sobrenadante clarificado se recupera de forma continua. Existen tres tipos básicos de centrifugas que recuperan varios kilogramos de sólidos y que operan a velocidad de flujo suficientemente altas; la centrifuga tipo disco, la centrifuga de rotor tubular y la centrifuga de canasta ó cestillo. El rotor utilizado con las máquinas anteriores contienen una pila central de discos cónicos que aseguran un paso de flujo casi constante con el depósito de los sólidos en unas paredes del rotor, produciendo únicamente una reducción mínima en el paso del flujo. Su limpieza es laboriosa y la pérdida de depósito es difícil de prevenir y el re acondicionamiento consume un cierto tiempo.

Las centrifugas de tipo disco con descarga de sólidos son eficientes para la clarificación y el uso de este tipo de descarga puede reducir significativamente los costos laborales del proceso. Centrifugas de estos tipos se encuentran en el mercado y son comercializadas por De Laval Separator Co., Nueva York; Westfalia Separator Ltd, Wolverton, Bucks; Bird Machine Co., South Walpole, Massachusetts y la capacidad de los sólidos supera los 60 kilogramos operando alrededor de 8,000 xg - 14,000 xg. La selección de una velocidad de flujo adecuada es esencialmente empírica y varía de forma drástica con la

naturaleza de la suspensión a clarificar y en sí del equipo mismo. Las centrifugas que expulsan sólidos por mecanismos continuos pueden utilizarse para la recuperación de biomasa bacteriana ó miceliana.

Las centrifugas de cestillo : emplean filtros centrifugos. La cámara está perforada y permite la salida del filtrado; la cavidad porosa está formada normalmente por algún medio filtrante (lonas, telas, de diversos materiales naturales y sintéticos ó también el uso de algún-filtro ayuda), el principal objetivo de estos equipos es la obtención de material particulado de gran tamaño.

La centrifuga de tornillo decantador es adecuada para eliminar agua de materiales sólidos gruesos a concentraciones elevadas de sólidos (arriba del 60 %), ha sido utilizada para la separación de hongos y levaduras (Ward, 1989). En Biotecnología son muy usadas en el tratamiento de aguas residuales para reducir el contenido de agua de los lodos. El uso en la precipitación de microorganismos ha sido mejorada actualmente con el empleo de la floculación ó coagulación y especialmente se ha mejorado la hidrodinámica del flujo y el cuidado en la excesiva desintegración de los flóculos por la maquina (Bell and Brunner, 1983, Bell, Hoare and Dunnill, 1983).

Las centrifugas con rotores cóncavos : estas presentan un rotor tubular que les permiten obtener un paso suficiente de flujo. De tal forma que cuando progresa la centrifugación se reducirá el diámetro efectivo de la cámara y por tanto la fuerza de centrifuga. Una de sus ventajas es que son muy fáciles de limpiar y con el uso de un dispositivo, la obtención del material depositado es virtualmente del 100 % ; el reacondicionamiento es también sencillo y rápido. Las centrifugas Penwalt son de las más conocidas, aunque existen también centrifugas similares como las procedentes de la compañía Carl Padberg, Lahr, West Germany. Las velocidades de flujo pueden determinarse empíricamente, pero para los depósitos de detritus celulares de la ruptura de bacterias, con velocidades de flujo alrededor de 50 Litros/hora es necesario utilizar equipos con mayores prestaciones. En la Tabla 7 se muestran algunas de las propiedades más importantes de las centrifugas comúnmente usadas.

Como se puede observar en esta tabla todos los equipos tienen desventajas individuales a las que debe ser añadidas las generales del costo de adquisición, mantenimiento, consumo de energía y elevación de temperatura (Schmidt, 1987).

Tabla 7. Propiedades de las centrifugas más usadas en Biotecnología

Tipo de centrifuga	Ventajas	Desventajas	Detalles técnicos
Cestillo	1) Buena eliminación de líquido 2) Fácil de limpiar 3) Posible lavado de la torta	1) Capacidad limitada de sólidos 2) Laboriosa recuperación de sólidos 3) Baja fuerza centrífuga 4) Operación discontinua	$n=500-2500\text{min}^{-1}$ $Z=300-1500$ $E=900-1800$
Centrifuga de espiral perforado	1) Posibilidad de clasificación de sólidos 2) Operación continua 3) Posibilidad de lavado de la torta	1) Baja fuerza centrífuga	$n=500-1000\text{min}^{-1}$ $Z=300-1500$
Centrifuga Tubular	1) Buena eliminación del líquido 2) Alta fuerza centrífuga 3) Fácil de limpiar 4) Cámara fácil de sacar Modelo D(cm) IP 4,5 6P 10,8	1) Capacidad limitada de sólidos 2) Laboriosa recuperación de los sólidos 3) Operación discontinua 4) Hace espuma 5) Baja E N(rev/min) RCF* 50.000 62,500 15.000 13,000	$n= 13.000 - 18.000\text{min}^{-1}$ $d= 75-150\text{mm}$ $Z= 13.000 - 17.000$ $E= 1500-4000$

Centrífuga con recipiente de cámara múltiple para sólidos	<ol style="list-style-type: none"> 1) No pierde eficiencia a medida que el tazón se llena de sólidos 2) Gran volumen de almacenamiento de sólidos 3) Buena eliminación de líquido 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Recuperación laboriosa de los sólidos 2) Operación discontinua 3) No descarga los sólidos 	$n = 5000 - 10.000 \text{ min}^{-1}$ $d = 125 - 530$ $Z = 6000 - 11.400$									
Centrífuga de espiral con descarga	<ol style="list-style-type: none"> 1) Adecuada para lechadas con alta concentración 2) Gran capacidad de lechada 3) Operación continua 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Baja fuerza centrífuga 	$n = 700 - 2500 \text{ min}^{-1}$ $Z = 350 - 1400$ $E = 900 - 2300$									
Centrífuga de rotor de discos	<ol style="list-style-type: none"> 1) Habilidad de descarga de sólidos 2) Operación parcialmente continua 3) Alta fuerza centrífuga 4) Descarga de líquido bajo presión <table style="margin-left: 20px; border: none;"> <tr> <td style="padding-right: 10px;">D(cm)</td> <td>N(rev/min)</td> </tr> <tr> <td>19</td> <td>12,000</td> </tr> <tr> <td>29</td> <td>6,000</td> </tr> </table>	D(cm)	N(rev/min)	19	12,000	29	6,000	<ol style="list-style-type: none"> 1) Baja capacidad de eliminación líquido 2) Funciona solamente con bajo contenido de sólidos en la suspensión 3) Difícil de limpiar <table style="margin-left: 20px; border: none;"> <tr> <td style="padding-right: 10px;">RFC*</td> </tr> <tr> <td>14,300</td> </tr> <tr> <td>5,900</td> </tr> </table>	RFC*	14,300	5,900	
D(cm)	N(rev/min)											
19	12,000											
29	6,000											
RFC*												
14,300												
5,900												
Centrífuga con recipiente de boquilla	<ol style="list-style-type: none"> 1) Operación continua 2) Alta fuerza centrífuga 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Baja capacidad de eliminación de líquido 	$n = \text{hasta } 10.000 \text{ min}^{-1}$ $Z = \text{hasta } 14.000$ $E = \text{hasta } 80.000$									

Decantadora	1) Descarga continua de sólidos	1) Baja fuerza centrífuga	
	2) Altas concentraciones de sólidos a la entrada		
	D(cm) N(rev/min)	RCF*	
	15 6,000	3,070	
	35 4,000	3,180	

*Fuerza centrífuga relativa (g)

2.1.3.1.6.- Ultracentrifugación.

Emplea altas aceleraciones, propiciando una sedimentación de las moléculas de acuerdo a su masa molecular, incluso para componentes solubles semejantes a las proteínas. Es una importante herramienta para el análisis de proteínas y ácidos nucleicos y en ingeniería genética para la purificación de plásmidos, sin embargo es una operación discontinua y tiene una restricción en cuanto a la capacidad del proceso. Comercialmente se encuentran disponibles equipos con rotor tubular manejado por una turbina de aire a 35,000 r.p.m. ó 90,000 xg. (Round y col, 1981).

2.1.4.- Métodos de Concentración subsecuentes en el procesamiento de bioproductos.

2.1.4.1.- Aspectos Generales.

En general deben ser adicionalmente concentrados los productos de interés antes de que sea posible una purificación económica; lo cual desde hace varias décadas se utiliza la evaporación a presión reducida que permite manejar temperaturas bajas, no obstante, esta operación es desnaturalizante, sobre todo para enzimas termolábiles. Debido a la labilidad de muchos productos, los métodos para su concentración de ven ser muy bien definidos y entre los cuales se encuentran (Bell y col, 1983; Flaschel y col. 1983):

- Procesos de membranas como (diálisis, ósmosis y ultrafiltración).
- Precipitación (sales, solventes, etc.).

- Métodos de Extracción.
- Procesos Térmicos ó que involucren un incremento de temperatura (destilación y evaporación).
- Procesos de Secado (atomización, liofilización, etc.).
- Cristalización.
- Métodos de adsorción/desorción (Cromatografía de adsorción y cromatografía de intercambio iónico).

Actualmente la mejor opción es la ultrafiltración como se observara a continuación, donde el ahorro de energía con respecto a la evaporación es significativo (Frost, 1986; Brocklebank, 1987).

2.1.4.2.- Procesos de Membranas.

Los sistemas de membrana típicos, consisten en fibras huecas ó en apilamientos de hojas con una configuración de cartucho ó de conjunto de placas (Ward, 1989). La filtración a través de membranas resulta ser un procedimiento muy versátil para la separación de diferentes moléculas ó partículas. Algunas de las aplicaciones de los métodos que emplean membranas, así como su eficiencia de separación se explica en la Tabla 8.

Tabla 8. Procesos basados en membranas

Tipo de Membrana	Aplicación	Masa molecular relativa
Microfiltración	Concentración de bacterias y virus	> 1 000 000 (ó partículas)
Ultrafiltración	Fraccionamiento; diálisis; Producción de enzimas, Producción de proteínas. Procesamiento del suero	> 10 000 (macromoléculas)
Osmosis reversa	Concentración de sustancias farmacéuticas, producción de lactosa; desalinización parcial de soluciones	> 200 (compuestos orgánicos)
Electrodialisis	Purificación y fraccionamiento de sustancias cargadas; desalinización	> 100 (compuestos orgánicos)

La diálisis se basa en la separación de moléculas en función de su tamaño a través de una membrana semipermeable; permite eliminar sales y bajo ciertas condiciones pueden concentrar una muestra (Sánchez, 1985).

La microfiltración puede reemplazar a la filtración para la separación de las células, e incluso metabolitos específicos, en los caldos de fermentación.

La ósmosis inversa y la ultrafiltración se utilizan extensamente para separar proteínas, enzimas y hormonas a partir de solutos de peso molecular bajo y dializarlos y concentrarlos. Los problemas de polarización por concentración, por lo que se produce un incremento de la concentración de soluto en la zona adyacente a la membrana, existentes en los sistemas de membranas convencionales. En la ósmosis inversa se pueden separar moléculas muy pequeñas y de tamaños similares, dependiendo de la difusión y de las interacciones en solución entre las moléculas y el material de las membranas.

2.1.4.2.1.- Ultrafiltración.

Es una técnica de separación de compuestos de alto peso molecular (concentración de soluciones proteicas) de otros de bajo peso molecular (agua, sales, azúcares, aminoácidos y péptidos), mejorando el producto considerablemente para finalmente obtener un producto de mayor pureza, de alta actividad enzimática, puesto que después estos componentes causan decoloración y olores durante el secado, inducen además a ser higroscópico el producto, encapsulan y aglomeran ó apelmazan a la enzima, alterando la actividad de la misma. Puede ser empleada como alternativa más viable a la diálisis para la concentración de soluciones diluidas de enzimas, como lo podemos observar en los ejemplos presentados en las Figuras 4, 5 y 6 , ó de gel filtración para la eliminación de sales . Cuando las concentraciones de sales a eliminar por ultrafiltración son altas, es más rápido un tratamiento de diafiltración (Figura 7) (Alba y col, 1973; Wang y col, 1979; Reed, 1982; Brocklebank, 1987). Cuando se emplean agentes precipitantes para precipitar proteínas, este método puede usarse para purificar tal proteínas. Ultimamente se han venido introduciendo membranas hidrofílicas, anisotrópicas, etc.; las cuales están compuestas de una ultra delgada capa montada sobre un soporte de fibras. Tales membranas muestran una suficiente permeabilidad hidráulica para operar al manejo de presiones. Mediante el uso de membranas anisotrópicas adecuadas es posible purificar una enzima de entre una mezcla de ellas.

Figura 4. ULTRAFILTRACION DE SOLUCIONES DE ENZIMAS INDUSTRIALES

Membrana	Aamilasa/Proteasa (1 x Sólidos Totales)	Proteasa (10 x Sólidos Totales)
	HFA-200	HFA-200
Presión, psi	15	20
Flujo, gfd	11	7.8
Retención de enzima x	97(amilasa) 96(proteasa)	99
Retención de sólidos totales x	—	15-30

Figura 5. CONCENTRACION Y RECUPERACION DE ENZIMAS EMPLEANDO MEMBRANA UN-1

Enzima	Vol. inicial (mL)	Vol. final (mL)	Volumen factor de concentración	Concentración de la enzima en (unidades de enzima/mL)			Eficiencia de recuperación ^a
				Muestra original	Concentrado	Filtrado	
Penicilinas	1000	150	12.3	100	950	0	79.3
β -galactosidasa	1000	33	30.3	0.75	5.44	0.03	24
Tripsina ^b	1400	310	4.52	24	99.5	0	91.3
Tripsina	1320	290	4.56	22.0	79.3	0	76.6

^a Eficiencia de recuperación se definió como: (Total de la enzima en el concentrado/Total de la enzima en la muestra original) x 100.

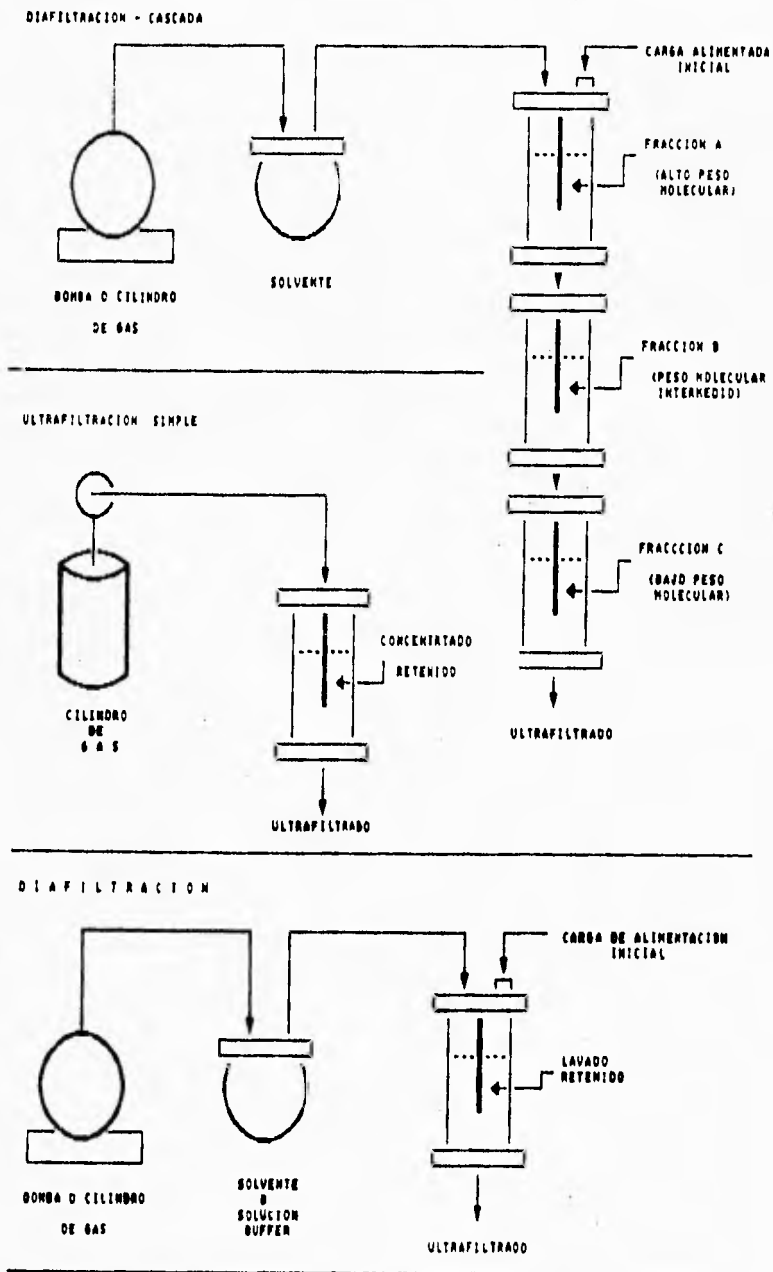
^b Filtrado llevado a 11°C; todos los otros estudios fueron llevados a 25-26°C.

Figura 6. CONCENTRACION Y RECUPERACION DE *Bacillus subtilis* fase SOP-1 a 25°C (Membrana UN-1; $\Delta P = 100$ psi)

Vol. inicial (mL/min)	Vol. ^a final (mL/min)	Relación de volúmenes inicial y final (mL/min)	Concentración de fase (PFU/mL) ^b en			Eficiencia de recuperación x
			Muestra original	Concentrado	Filtrado	
2.4	1.9	1160/27	1×10^{10}	6×10^{11}	2×10^8	140

^a Velocidad Final tomada después de 6.5 hr de filtración

^b PFU/mL = formando-placa unidad/mL



FUENTE - DURNILL, P. (1971)

Figura 7. Modelos de Ultrafiltración para el Procesamiento de Materiales Biológicos.

Esta aplicación con este tipo de membranas están en vías de optimización e implementación en escala industrial y depurándose con modelos de mezclas prefabricadas de proteínas (Frost, 1986). Es especialmente usada en la producción de enzimas extracelulares.

La ultrafiltración es un proceso el cual depende de las propiedades de la membrana y de su geometría, propiedades moleculares de los solutos involucrados y condiciones operacionales. La concentración final depende de la hidrodinámica de el sistema y de la máxima presión aplicable. Un problema serio en la ultrafiltración es el fenómeno llamado de "polarización de la concentración", la cual consiste en un aumento gradual en la concentración de los solutos al ir aproximándose a la membrana, dando como resultado una "segunda capa", con flujo y características de separación diferente. Esto puede disminuirse mediante alta velocidad de flujo a través de bombeo, induciendo flujo turbulento, ó mediante equipo con canales finos para alta velocidad de flujo laminar. Se encuentran disponibles unidades de filtración de fibra hueca para uso a escala piloto con una área de membrana superior a 6.4 m^2 , que operan a velocidades de flujo de ultrafiltración por encima de los 200 litros por hora, dependiendo de la concentración proteica. También existen sistemas con mayores prestaciones de velocidades de flujo de varios cientos de litros por hora, lo que permite disponer enzimas extracelulares es reportada a $10 \text{ }^\circ\text{C}$; pero un incremento en la capacidad de 1-3 %, puede ser logrado con el incremento de $1 \text{ }^\circ\text{C}$ en la temperatura. La ultrafiltración es un paso de mayor prioridad a un paso de secado, y podría ser antieconómica para llegar a obtener concentraciones altas de proteína en la solución. Los procesos de concentración son generalmente una operación discontinua, la cual recicla el concentrado en una membrana a presión constante, lo cual incrementa la concentración de soluto lentamente y manteniendo un flujo alto. A gran escala la ultrafiltración puede operar continuamente con un diseño de "cascada" (Figura 7), el cual se basa en el uso de resultados experimentales combinados con modelos teóricos para medir la polarización de las membranas. El mejoramiento, para una mayor resistencia química y funcionamiento de las membranas, consiste en limpiar y desinfectar periódicamente estas. Bajo condiciones normales estas membranas podrían ser usadas por un año ó más.

2.1.4.3.- Precipitación.

Generalidades.

Después que los insolubles son removidos el segundo paso es efectuar una bioseparación en el extracto, este proceso implica partir de una solución acuosa altamente diluida y remover la mayor cantidad de agua, el concentrado resultante podrá ser purificado por una variedad de métodos que tal vez no sean efectivos en soluciones diluidas, por ejemplo la cromatografía de elución, en este método la purificación se realiza a través de una subsecuente dilución. La precipitación es un método fácil y directo para obtener solutos biológicos aunque a veces es un proceso lento donde se obtienen precipitados amorfos y no cristalinos, que pueden ser agregados de muchas especies ó pueden contener cantidades significativas de sales adsorbentes ó solventes ocultos, desde este punto de vista los precipitados son impuros.

Se puede provocar la precipitación de varias formas, al adicionar un no solvente como el agua para precipitar un metabolito de una solución de etanol ó sulfato de amonio para precipitar una proteína. En cada caso el precipitado se removerá mediante centrifugación

Se utiliza frecuentemente para mejorar la recuperación de bioproductos u otros compuestos de pequeño tamaño; la velocidad de sedimentación de una partícula aumenta con su diámetro (Ley de Stokes). La precipitación puede ocurrir reversiblemente si las cargas sobre la superficie del producto de interés pueden neutralizarse por iones de carga opuesta e irreversiblemente si se forman puentes de moléculas poliméricas cargadas entre el producto. La precipitación depende tanto del floculante empleado como de otros factores, como la naturaleza del producto a separar, el ambiente iónico, la temperatura y pH principalmente. La precipitación selectiva emplea técnicas que involucran variaciones en el contenido salino, temperatura y/o solventes polares (más usados) ó no polares; para proteína de membrana se utilizan soluciones con detergentes. A cualquier precipitación, generalmente le sigue una operación de separación sólido-líquido, como la centrifugación. Por tanto, esta técnica es un elemento constante en la purificación de enzimas en general, y deberá ser considerada para la implantación del proceso en cuestión (Aiba y col, 1973; Wang y col, 1979; Frost, 1986).

2.1.4.3.1.- Precipitación mediante el uso de sales.

Este proceso es mejor conocido con el nombre de "salting out" y es el método más utilizado para el fraccionamiento de proteínas ya que es efectivo, relativamente económico y causa una ligera desnaturalización por lo que encuentra aplicación frecuente.

Esta operación es de las primeras y más usadas para la concentración y purificación de enzimas comerciales (Aiba y col, 1973; Wang y col, 1979; Reed, 1982). Se adicionan altas concentraciones de sales, p.e. sulfato de amonio, sulfato de sodio ó sulfato de magnesio. Los sulfatos son preferidos a los fosfatos por su mejor solubilidad. De entre las sales utilizadas el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es la sal más usada debido a importantes propiedades como alta fuerza iónica, a su alta solubilidad a baja temperatura, a su bajo costo, a su inocuidad para las enzimas (para alguna de las cuales es incluso estabilizante) y a su ausencia de toxicidad, solamente cuando se utiliza en alta pureza puesto que el de grado industrial contiene trazas de metales pesados que pueden ser suficientes para inactivar a una enzima. La mayoría de las proteínas precipitan en una solución saturada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70 %) bajando su densidad (Dunnill, 1971). Es aplicada a gran escala sin embargo esta sal tiene el inconveniente de liberar amonio, elevar el pH y de ser corrosiva, por este motivo en ocasiones se prefiere utilizar Na_2SO_4 (Wang y col, 1979; Reed, 1982; Frost, 1986). Otra desventaja es que la preparación enzimática contiene una concentración elevada de la sal y normalmente esta debe eliminarse mediante otros procesos como la diálisis, ultrafiltración ó columnas de desalado antes de continuar con la siguiente etapa de purificación.

Mediante la precipitación con sales se puede obtener una precipitación fraccionada de las proteínas, eliminar las que no son de interés y recuperar la deseada mediante alguna técnica de separación sólido-líquido, como la concentración. Una vez separado el flóculo, normalmente se procede a una resuspensión de la enzima en un medio apropiado como lo son las soluciones buffer características para cada tipo de enzima, en las cuales presentan una buena estabilidad.

La precipitación fraccionada se puede lograr en virtud de que diferentes proteínas tienen diferentes solubilidades a diferentes condiciones de pH, temperatura y a una concentración de sal dados, de acuerdo con la siguiente ecuación (Aiba y col, 1973; Wang y col, 1979; Brocklebank, 1987):

$$\ln S = B - KC$$

donde **S** es la solubilidad de la proteína, **B** es una constante dependiente de la proteína, pH y la temperatura, **K** es una constante dependiente de la proteína y **C** es la concentración de la sal. La técnica tiene la ventaja adicional que reduce el volumen de material, lo cual es normalmente un punto importante a considerar a este nivel. En principio, el método depende de la capacidad que presentan las concentraciones elevadas de sulfato de amonio para captar las moléculas de agua presentes y así evitan de manera efectiva la solvatación de las proteínas.

La elección de sales para su utilización puede realizarse tomando en cuenta las siguientes consideraciones :

- 1.- Los aniones son efectivos en este orden : Citrato > $\text{PO}_4^{=}$ > $\text{SO}_4^{=}$ > CH_3COO^- > Cl^- > NO_3^-
- 2.- Los cationes son efectivos en el siguiente orden : NH_4^+ > K^+ > Na^+
- 3.- Se seleccionan sales económicas pues se usará mucho de ella en el proceso.
- 4.- Se escoge una sal de tal forma que la densidad del precipitado sea diferente a la densidad de la solución. Esto se requiere para efectuar una separación sencilla por centrifugación.
- 5.- Añadir una sal en sólido en lugar de una solución salina para minimizar la dilución.

En condiciones específicas cada proteína puede precipitar en un rango de concentración característico y estrecho de sulfato de amonio. Una alternativa al fraccionamiento con sulfato de amonio es la utilización de solventes orgánicos, particularmente acetona ó alcoholes.

2.1.4.3.2- Precipitación mediante el empleo de Solventes.

El principio de este método está basado en la disminución de la constante dieléctrica del solvente de la enzima (agua), y además incrementan las interacciones electrostáticas intermoleculares. Son modificados por el pH, temperatura, fuerza iónica y concentración de proteínas, por lo cual deben ser controlados para obtener resultados confiables. Se puede lograr una precipitación fraccionada del producto de interés y resulta ser más efectivo que el uso de sales y además presentan una mayor disponibilidad encunto a pureza, son

relativamente fácil de recobrar y reciclar. Pero sin embargo la utilización de solventes presentan algunas desventajas : la mayoría son incompatibles con productos alimenticios por su toxicidad y naturaleza extraña a los mismos, por tanto, debe asegurarse su total eliminación del producto final; generalmente son inflamables y explosivos, lo que demanda estrictas medidas de seguridad industrial; y se requieren su recuperación, por lo cual es necesario redestilarlos. En general, el uso de solventes ha disminuido en los últimos años, aunque existen algunos fraccionamientos particularmente adecuados basados en esta metodología. Además de ser un proceso más drástico y agresivo para las enzimas; si el proceso se lleva a cabo a temperaturas superiores a 4 °C, pueden producirse desdoblamientos irreversibles de la estructura de la proteína y provocar pérdidas de actividad; esta operación debe realizarse a temperaturas menores a los 0 °C, incrementando el gasto económico del proceso global. Los solventes más usuales son el metanol, etanol, isopropanol y acetona; el etanol es el de mayor aplicación porque induce la desnaturalización en menor grado y no tiene problemas de toxicidad (Aiba y col, 1973; Wang y col, 1979; Reed, 1982; Frost, 1986).

2.1.4.3.3.- Precipitación con Agentes Floculantes.

Estos agregan las células ó partículas microbianas, elevando la velocidad de sedimentación, puesto que las partículas mayores tienden a sedimentar a una velocidad más alta. Sin embargo, en muchos casos los procesos de precipitación-sedimentación consumen demasiado tiempo, retardando la recuperación de productos inestables y aumentando a su vez el tiempo de fermentación. En tales casos se utilizan usualmente técnicas de centrifugación ó filtración. Los agentes floculantes incluyen las sales inorgánicas, hidrocoloides minerales, polieléctrolitos orgánicos. Entre los precipitantes orgánicos tenemos los polímeros acuosolubles, los cuales compiten con las proteínas por el agua disponible para solvatación. La solubilidad de las proteínas en presencia de polímeros hidrofílicos es influenciada por temperatura, fuerza iónica, pH y concentración de proteína, otros parámetros son el pH de el agente floculante, como el pH de la proteína deseada (Höng y Kula, 1976). Dentro de estos destaca el polietilenglicol, es el de mayor uso, por ser no tóxico, es poco inflamable y no es corrosivo, pero sin embargo produce aunque no en gran medida la desnaturalización de las proteínas. Su mecanismo de acción y aplicaciones las describen (Kula, 1977; Hau, 1980). Su aplicación principal es en el campo del procesamiento de la sangre. La separación fraccional con

polietilenglicol puede ser usado a bajas concentraciones de proteínas (< 10 mg/mL), puesto que de otra manera las grandes interacciones entre proteínas afectan la curva de precipitación (Foster et.al, 1973).

El uso de polieléctrolitos se debe a que actúan sobre las proteínas formando cadenas de polieléctrolitos y proteínas, esto depende de el número de iones contrarios disponibles sobre la superficie de la proteína. El polieléctrolito compete por el agua en la solución y podría ocasionar una exclusión de lo anterior. Los polisacáridos ácidos naturales como ejemplo alginato, pectina, carragenina, carboximetil celulosa, poliacrílico y polimetacrílicos ácidos, han sido usados para precipitar proteínas. Los polieléctrolitos aniónicos pueden ser empleados a pH bajos, del punto isoeléctrico de la proteína, mientras que los catiónicos tales como polietilen-imina son ocupados cercanos a el punto isoeléctrico, dentro de un rango en el cual generalmente es más compatible con la estabilidad de la enzima. El polietilen-imina con peso molecular de 40,000-60,000 es ampliamente demandado como un precipitante de proteínas (Bergmeyer y col, 1970). La reacción de precipitación por polieléctrolitos es fuertemente influenciada por el tipo y concentración de iones opuestos. Los complejos formados entre la proteína y polieléctrolitos pueden ser disociados a altas concentraciones de sal, lo cual permite la recuperación de el producto.

2.1.4.4.- Métodos de Extracción.

Cuando se emplean a bioproductos presentan las funciones de separación y concentración, es muy utilizado para la recuperación de sustancias lipofílicas. Los métodos de extracción son ampliamente avanzados en la industria farmacéutica y química; y recientemente han sido introducidas para recuperación de proteínas con actividad biológica (Kula y col, 1976), en la Figura 8 se describe la extracción de una enzima con polietilenglicol. Comúnmente se emplean solventes orgánicos para estos propósitos.

La solución ó suspensión que contiene el producto deseado, se mezcla con un solvente inmiscible en el que se disuelva u interacciones preferentemente y del que pueda ser más fácil y específicamente recuperado. En tal sistema acuoso de dos fases se provee de las condiciones favorables para la protección de las actividades biológicas de células, organelos y proteínas (Albertsson, 1971). Por selección de condiciones, los fragmentos celulares pueden ser llevados a una fase y la proteína de interés particionada preferentemente en otra fase. La distribución

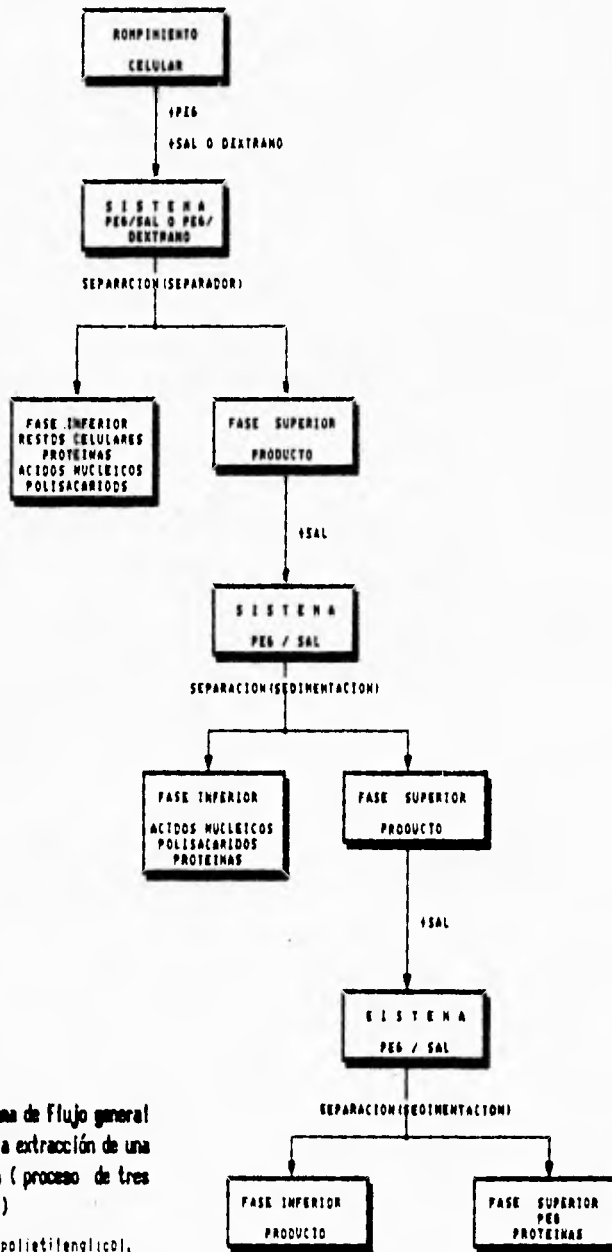


Figura 8. Diagrama de Flujo general para la extracción de una enzima (proceso de tres pasos)
PEG = polietilenglicol.

de una sustancia entre dos fases está representada por su coeficiente de partición :

$$K = \frac{\text{Concentración de la sustancia en la fase A}}{\text{Concentración de la sustancia en la fase B}}$$

La eficiencia de este proceso depende de los volúmenes relativos de los dos fases que son llevados a equilibrio. Cuando la sustancia va a ser extraída en un determinado volumen de solvente la extracción es más eficiente si se lleva a cabo con alícuotas sucesivamente menores, y cuando se busca la extracción diferencial de un componente más que de otros, la extracción reversa aumentará la selectividad. En la recuperación de antibióticos esta operación con solventes es frecuentemente una etapa temprana posterior a la eliminación de las células o de los residuos celulares. La extracción del caldo completo puede ser llevada a cabo utilizando extracción-decantación, columnas de extracción ó utilizando centrifugas de mezclado y sedimentación. Los métodos de recuperación del caldo completo conducen a una reducción en el número de etapas de recuperación y por consiguiente reducir las pérdidas de las etapas sucesivas. La reducción del tiempo en que los productos son mantenidos en la fase acuosa, en la que generalmente la degradación es más rápida, también será ventajoso. La separación de las enzimas a partir de las células ó restos celulares se puede llevar a cabo con obtención de altos rendimientos utilizando la extracción con sistemas acuosos en fase múltiple; en donde los restos celulares y las enzimas se distribuyen en mezclas acuosas de algún polímero como el polietilenglicol (con masa molecular de 6,000 D) y dextrana, que forman fases distintas y pueden por tanto ser separadas fácilmente, creándose un fenómeno de reparto entre las dos fases, y se obtiene un proceso muy eficiente de purificación. El rendimiento en la separación está modelado por la siguiente ecuación (Kula, 1979).

$$Y = \frac{100}{1 + (V_b / V_t K)}$$

donde Y es el rendimiento obtenido en la fase alta, V_b es el volumen de la fase baja, V_t es el volumen de la fase alta y K es el coeficiente de reparto, el cual está dado por el cociente de las concentraciones del soluto en la fase alta entre la fase baja (C_t / C_b). La localización exacta de una proteína específica en los sistemas acuosos bifásicos de polietilenglicol y dextrano ó de polietilenglicol y sales,

tales como el sulfato de amonio ó el fosfato de potasio, dependen de diferentes : de su peso molecular, del pH, de la mezcla y finalmente de sales polivalentes (Kula, 1979; Kula y col, 1982; Hustedt y col.).

Los ácidos nucleicos y polisacáridos son más hidrofílicos y pueden ser preferentemente extraídos en la fase rica en la sal. La segunda y/o tercera puede ser diseñada para separar eficientemente actividades que interfieran. La separación de la fase es fácilmente bajo gravedad; ocupando tiempos de separación de 60-90 min comúnmente; otro camino es el uso de separadores líquido-líquido que puede obtener una alta eficiencia de separación, con tiempos de residencia, menores a los 10 seg. En un paso final de extracción, la proteína podría ser cambiada a la fase rica en la sal, con lo cual se recobra una gran proporción de el suministro de polietilenglicol. Estos sistemas mencionados logran una recuperación más rápida y eficiente de enzimas a gran escala (Kroner y col., 1984) y con mayores ventajas en combinación con uso de la centrifugación (Kroner y col, 1982). La separación bifásica ha sido empleada para el aislamiento a gran escala y para la purificación de diversas enzimas como la pululanasa y 1,4-glucanfosforilasa y glutamina sintetasa a partir de *E.coli* (Takahashi y Adachi, 1982). Cuando se acopla un ligando al polietilenglicol, como el colorante azul de Cibacrón (purificación de la fosfofructoquinasa de levadura, (Kopperschlayer y Johansson, 1982), es posible incrementar el coeficiente de partición de una proteína en favor de la fase de polietilenglicol.

El método es aceptable debido a que no requiere del empleo de bajas temperaturas, además el sistema no sólo no es desnaturizante para las enzimas sino que las estabiliza, los polímeros no son tóxicos y su uso es permitido en alimentos, y en términos generales su operación es muy simple. Los polímeros usados son económicos y han sido usados para muchas enzimas a escala piloto (Kula, 1979; Reed, 1982), su aplicación a nivel industrial no ha sido implantada ya que el uso de grandes cantidades de estos materiales, que no pueden ser recuperados eficientemente, y además hay que considerar el tiempo de equilibrio de formación de las fases y partición y la separación mecánica de las mismas, ya que normalmente consume largos períodos obtener la partición ideal puesto que dependen de la difusión, hasta llegar al equilibrio, tornándose la operación desfavorable económicamente y por lo tanto no rentable (Frost, 1986); aunque un trabajo reciente sugiere que es posible utilizar dextrano crudo, lo que abate costos de manera significativa (Kroner y col, 1982); pero en general se requieren de estudios más afondo acerca de la recuperación de estos polímeros, para poder ser

una alternativa viable más que nada económicamente. Además, dado que K es dependiente de la composición de las fases, del peso molecular de los polímeros, de la fuerza iónica, del pH y de la temperatura, y todos estos parámetros están interrelacionados, se complica la predicción teórica del sistema. Por lo tanto, encontrar las condiciones óptimas de extracción que permitan obtener el más alto rendimiento en un solo paso, requiere de mucho trabajo experimental de prueba y error (Kula, 1979).

2.1.4.5.- Procesos Térmicos.

La destilación se utiliza para recuperar productos de fermentación volátiles, como por ejemplo etanol. La evaporación es la concentración de una solución acuosa usando métodos térmicos, por vaporación de agua y componentes volátiles. Se utiliza para obtener líquidos concentrados como productos finales ó para la preparación de materias primas para el secado posterior por atomización ó en tambor. Debe tenerse en cuenta la sensibilidad térmica del producto. Normalmente se aplica a las soluciones obtenidas por extracción con solventes y en donde se deben tener precauciones en la recuperación del mismo. Los fundamentos y principales equipos empleados en ambos procesos mencionados, son tratados en la Tabla 9. El evaporador de flujo continuo permite la concentración de productos lábiles en un rápido chorro directo. En los evaporadores de película descendente, la transferencia de calor que permite una mínima de temperatura entre el medio caliente y la solución. Los tiempos de residencia son del orden de un minuto. Los evaporadores de película fina, la capa fina se crea mecánicamente y es muy turbulenta, la transferencia del calor es muy efectiva y estos evaporadores pueden ser utilizados para la concentración de líquidos viscosos e incluso para la concentración hasta productos secos. Los evaporadores de capa fina en centrífuga, en los que la evaporación tiene lugar sobre las paredes cónicas calentadas dentro de un rotor necesitan tiempos de residencia más cortos. (Schmidt y col, 1987).

Tabla 9. Procesos de destilación y evaporación.

Proceso	Naturaleza del equipo	Fundamentos de la operación
Evaporación	Evaporador tipo tubo largo vertical y evaporadores de película descendente.	El líquido se evapora al pasar a través de tubos verticales en contacto con el vapor de agua.
Destilación	Plantas de destilación continuas y discontinuas.	Evaporación del solvente por calentamiento de la solución, separación de los componentes vaporizados en función de su volatilidad, recuperación del producto volátil por condensación.

2.1.4.6.- Procesos de Secado.

El secado de los bioproductos es normalmente el paso final por el que los productos son llevados a una forma estable adecuada para su manejo y almacenamiento. En esta etapa es muy importante considerar que la mayoría de los productos biológicos presentan sensibilidad a una mínima elevación de la temperatura, esto significa que es de suma importancia la elección de determinada técnica de secado; la cual conduzca a una eliminación de agua con la mínima alteración de la temperatura. En algunos casos, la termo estabilidad de los productos, como enzimas ó preparaciones farmacéuticas, es mejorada por la adición de azúcares, gomas u otros estabilizadores inertes. Para eliminar agua en forma de vapor de una mezcla se debe transferir calor a ésta. Existen diversos mecanismos de transferencia de calor, entre los más usados se tiene por conducción, convección ó radiación, ó por una combinación de ellas. Las condiciones y fundamentos de los distintos métodos mencionados para el secado de bioproductos son ejemplificados en la Tabla 10.

En el secado por conducción la transferencia de calor ocurre principalmente por contacto con superficies calentadas y debe tomarse en cuenta los cambios en las características de la fase líquida a medida que se hace más concentrada. Se emplean equipos en forma continua como tambores rotatorios de desecación a vacío ó en forma discontinua utilizando cámaras secadoras; en ambos casos se puede utilizar vacío. En el método de convección, en este la transferencia de calor,

el movimiento del producto y la eliminación del vapor son todas efectuadas por una corriente de gas (vapor). Es un proceso continuo que puede manejar grandes volúmenes. La solución que va a ser secada se aplica como una solución ó una lechada y es bombeada al atomizador para ser atomizada mediante un inyector ó un disco rotatorio. La corriente de gas caliente (150-250 °C) causa una evaporación casi instantánea, permitiendo que la temperatura de las partículas permanezca baja. Es utilizado para la desecación de enzimas ó antibióticos y cuando la presencia de otros materiales no causa ningún problema, se puede llevar a cabo la desecación del caldo de fermentación previamente separado de materiales que puedan tapan el sistema de atomización, por ejemplo para las enzimas con grado detergente ó los antibióticos para uso animal y muy usado en la industria alimentaria.

Tabla 10. Algunos procesos de secado

Proceso	Naturaleza del equipo	Fundamentos de la operación
Secado	Secado por atomización	El líquido ó la pasta son atomizados en forma de gotitas dentro del secador y su paso a través de una corriente gaseosa caliente, da lugar a la evaporación rápida.
	Secado en tambor	La solución alimentada lentamente a la superficie de un tambor rotatorio caliente, se evapora. Los sólidos secos se descargan mediante el empleo de una hoja rascadora.
	Liofilizador	El agua se separa del material congelado por sublimación.

2.1.4.6.1.- Concentración en frío.

La Liofilización se utiliza para secar materiales sensibles al calor, incluyendo células microbianas vivas y proteínas lábiles. Se basa en la sublimación del agua a partir de una masa congelada. Para la sublimación del vapor de agua deben ser transferidas por conducción desde las placas calentadas aproximadamente 680 kcal por kg de agua a la superficie de sublimación; esto se facilita bajando la

presión, y vapor se elimina por condensación a baja temperatura. La temperatura del sólido es regulada mediante control de la presión en la cámara de desecación utilizando un control muy sensible a la presencia de cualquier agua líquida presente en la masa. Se emplea para productos farmacéuticos por ejemplo virus, vacunas, hormonas, preparaciones de enzimas, ingredientes muy lábiles y caros para diagnosis; y en mayor escala también en la industria de alimentos.

Recientemente se ha estudiado una nueva modalidad de concentrado en frío que consiste en enfriar a bajo de 0 °C la solución acuosa, para inducir la formación de cristales, e ir concentrando la solución. Estos cristales son separados del residuo líquido. Una de las dificultades de estas operaciones es que los cristales no pueden ser lavados, porque pueden tender a deshacerse, diluyendo la solución concentrada; además los equipos usados para controlar la formación de los cristales son caros y su mantenimiento debe de ser muy cuidadoso para obtener buenos resultados.

2.1.4.6.2.- Cristalización.

La cristalización se utiliza principalmente para la purificación de compuestos de bajo peso molecular, como los antibióticos. Este proceso sirve como criterio de pureza y es muy utilizada para moléculas proteicas. Se emplean compuestos orgánicos de acuerdo a las características físico-químicas del producto y contaminantes, normalmente se emplean alcoholes como etanol, metanol, acetatos en solución alcohólica, éter, cloroformo, etc. A mayor escala, la cristalización se efectúa en la etapa final en la purificación de productos tales como el ácido cítrico, el glutamato sódico, etc. Su uso para recuperar enzimas es casi nulo debido a las condiciones drásticas y extremas de operación, principalmente de temperaturas muy altas y del uso de solventes (ya mencionadas sus desventajas).

2.1.5.- Criterio de Pureza y Almacenaje de Enzimas.

Los preparados comerciales deben tener características homogéneas entre un lote y otro y la actividad enzimática del producto del producto debe ser siempre la misma. En el laboratorio la homogeneidad total podría ser requerida y podría ser probada por técnicas de alta y ultra resolución tales como gel electroforésis, ultracentrifugación y secuenciación de aminoácidos.

El criterio de una pureza adecuada toma como base las siguientes especificaciones :

1.- Nivel y tipo de contaminantes.

(a) Las enzimas que se usan para ensayos clínicos deben ser removidos para que no interfieran.

(b) Las enzimas que se utilizan en alimentos deben contener ausencia de patógenos y cuentas totales reducidas, mientras que las enzimas destinadas para detergentes deben de tener cantidades menores a 50,000 microorganismos por gramo. En general, para reducir la cuenta microbiana se acostumbra filtrar los preparados a través de membranas con poros de diámetro promedio de 0.5 μm (Frost, 1986).

(c) Las enzimas farmacéuticas tales como asparaginasa no debe contener pirogenos;

(d) Las proteasas inyectadas, no deben contener materiales que causen efectos fisiológicos adversos.

2.- La concentración enzimática debe ser exacta y adecuada para permitir su conveniente-balanceado contra el costo de la pureza necesaria.

3.- Muchas enzimas industriales hechas como productos sólidos, en acarreadores, tales como el almidón, ciclodextrinas, etc. Ellas pueden ser diluidas a una actividad estandar y poder representar una fracción de un porcentaje de el total del producto sólido.

Otro aspecto importante es la vida de anaquel del producto, tanto en términos de estabilidad enzimática como de deterioro microbiológico. Para esto se adicionan algunos compuestos como el glicerol, polietilenglicol, sorbitol y sales, los cuales favorecen la estabilidad de la enzima y a la vez reducen la actividad de agua (adición de antiaglomerantes, encapsulantes) evitando la proliferación de microorganismos. Además, pueden adicionarse conservadores de grado alimentario como el benzoato ó el sorbato que evitan el desarrollo de hongos y levaduras (Frost, 1986; García-Garibay, 1992).

2.1.6.- Factores a considerar para definir la naturaleza del proceso de recuperación y purificación de una enzima específica.

1.-Tipo de fermentación (en medio líquido ó sólido, etc.) y de su control de condiciones (para evitar la formación de subproductos indeseables difíciles de separar) y cepas seleccionadas son recomendables usar.

2.-Propiedades físicas, químicas, y reológicas del medio que se parte para realizar la purificación.

3.-Naturaleza de los contaminantes (toda sustancia ajena a la enzima).

4.-Naturaleza de la enzima a aislar (propiedades físicas, químicas, cinéticas, etc.). En las Figuras 9, 10, 11, 12 y 13 se ejemplifican las etapas de separación, recuperación y purificación de algunas de las enzimas más utilizadas comercialmente.

5.-Concentración de dicho producto.

6.-Localización de la enzima de interés (intra ó extracelular; las Figura 14 y 15, describen de manera secuencial el procesamiento de obtención de tales enzimas respectivamente).

7.-La escala de operación (laboratorio, planta piloto ó a nivel industrial).

8.-Pureza deseada, junto con otras especificaciones, como actividad específica, estabilidad, etc.).

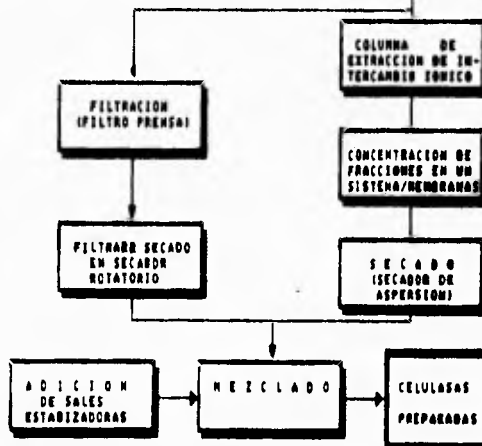
9.-Precio y eficiencia del proceso en general (tiempo, energía, disponibilidad de equipo, etc.).

Recuperación de alfa - amilasa termolabile de *Thermoactinomyces* sp.

Ob, et al. (1984)



Recuperación de Glucanasas de *Trichoderma reesei* (Planta piloto) Zurbriggen, et al. (1991)



Recuperación de Celulasas Pathak, et al. (1973)



Figura 9. Recuperación de Enzimas comerciales.

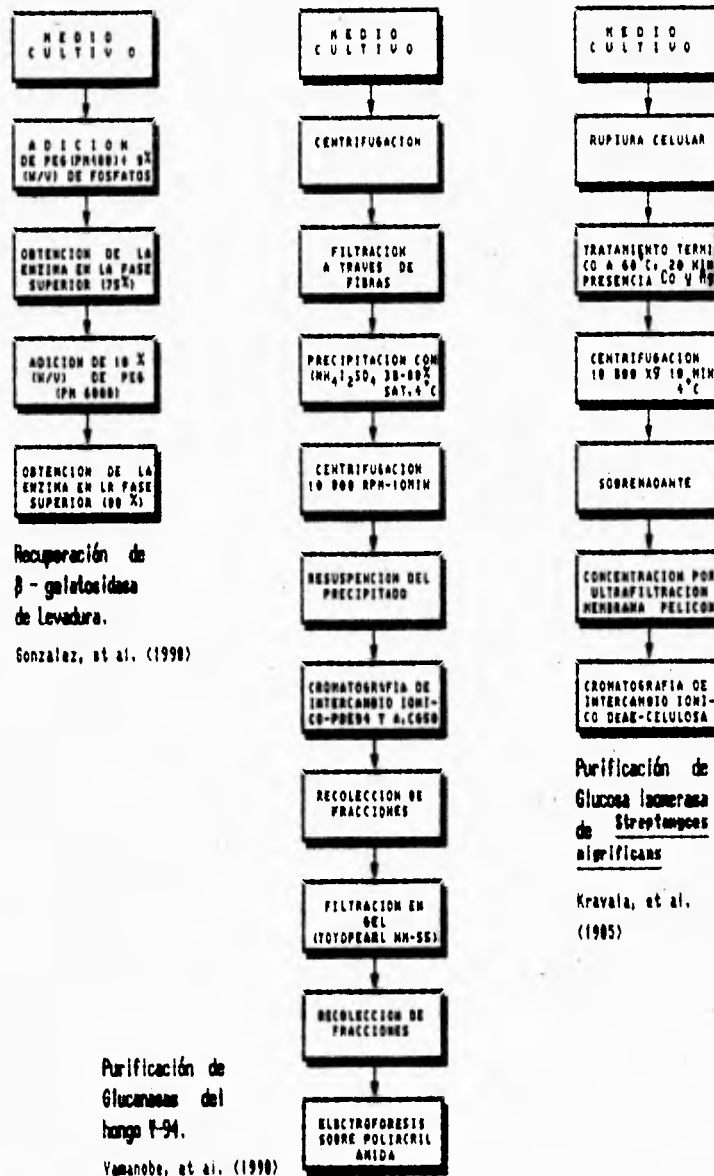


Figura 10. Recuperación de Enzimas comerciales.

FALLA DE ORIGEN

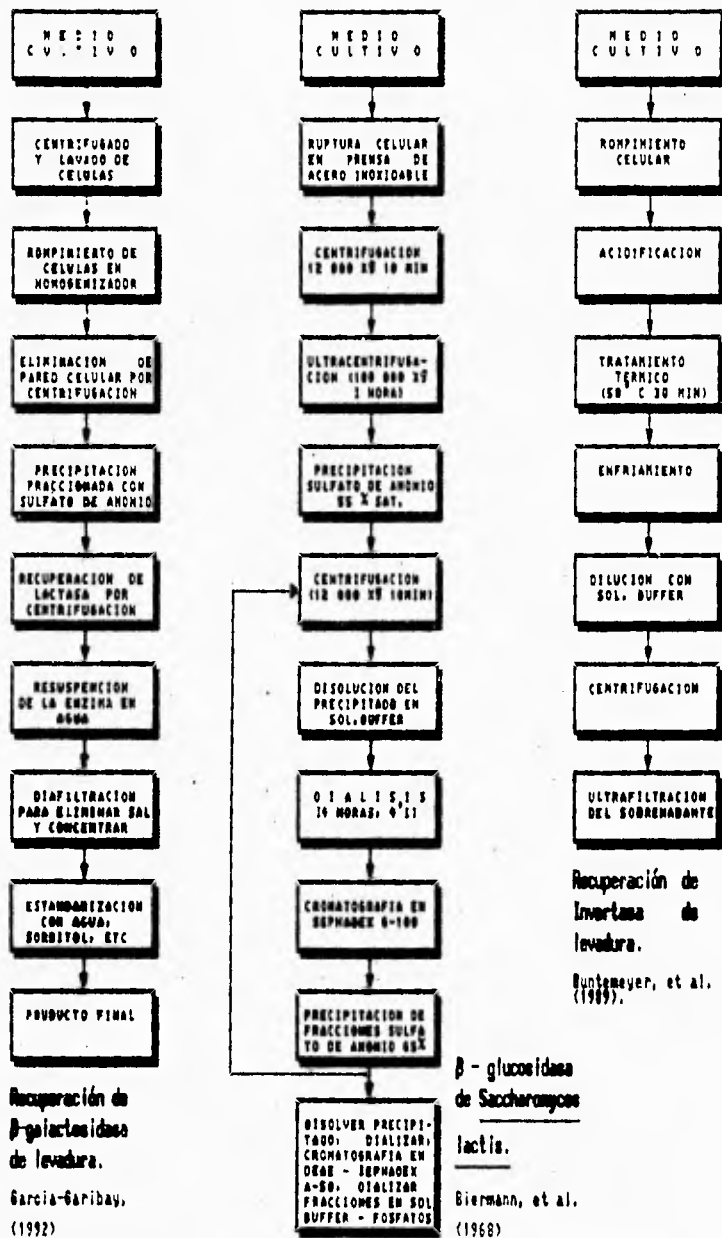


Figura 11. Recuperación de Enzimas comerciales.

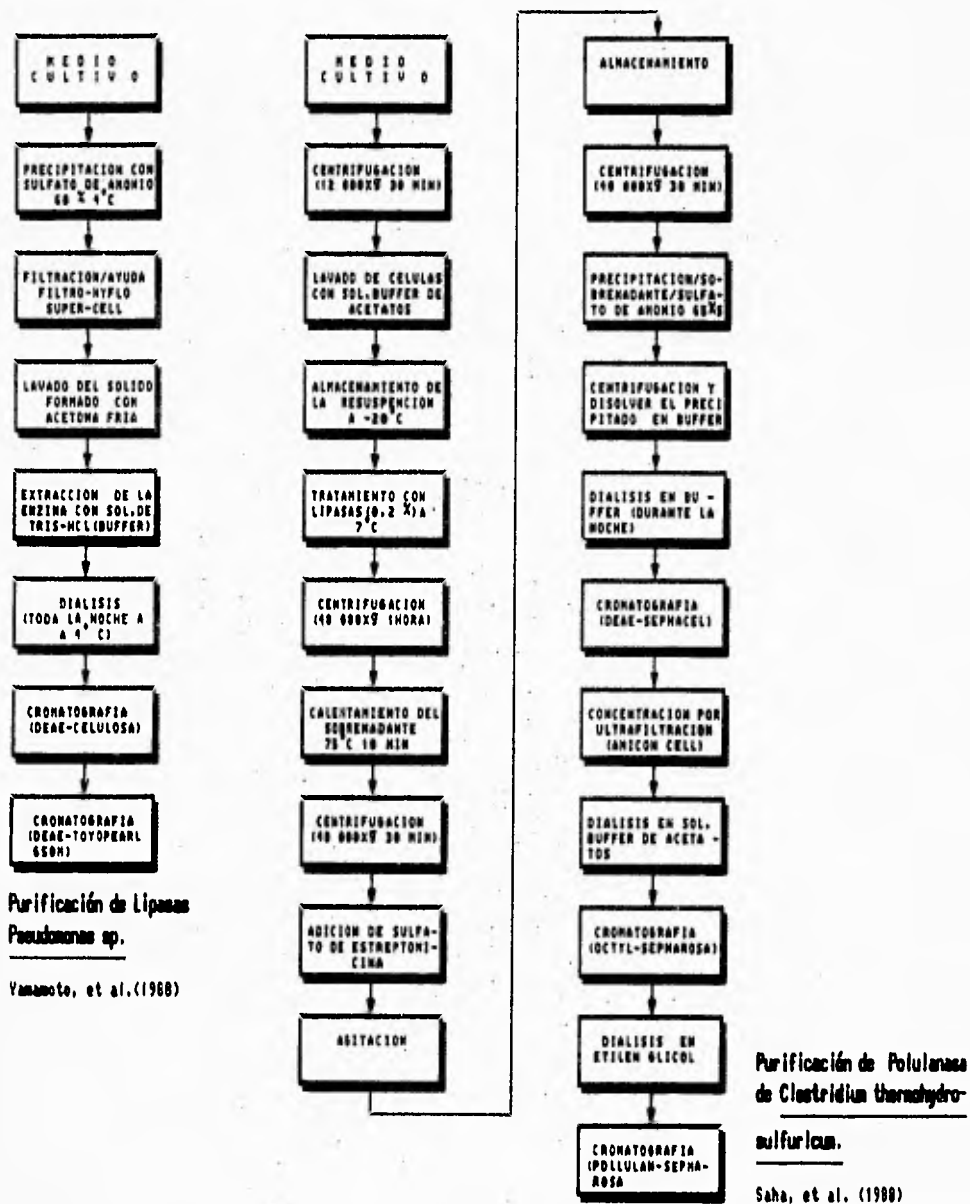
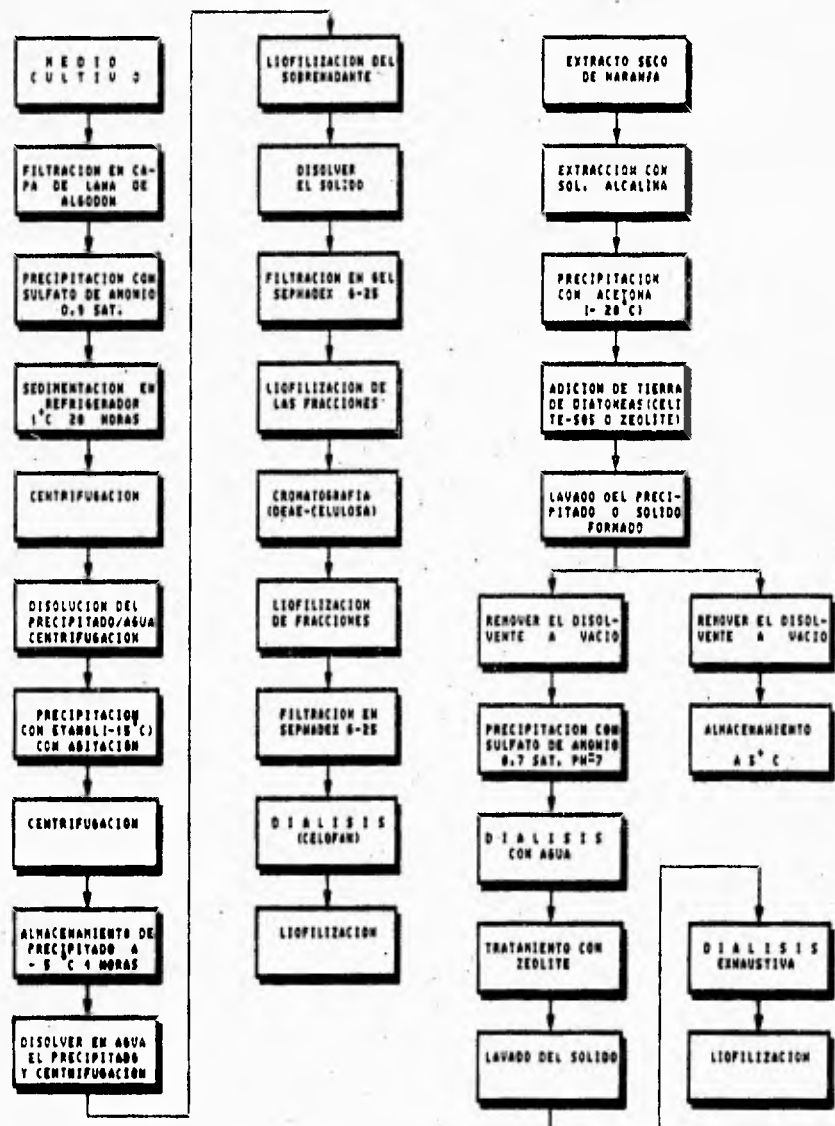


Figura 12. Recuperación de Enzimas comerciales.



Recuperación de Pectinasas de Aspergillus niger.
Rexova, et al. (1966)

Purificación de Pectinasas apartir de extracto seco de naranja.
I, et al. (1958)

Figura 13. Recuperación de Enzimas comerciales.

FALLA DE ORIGEN

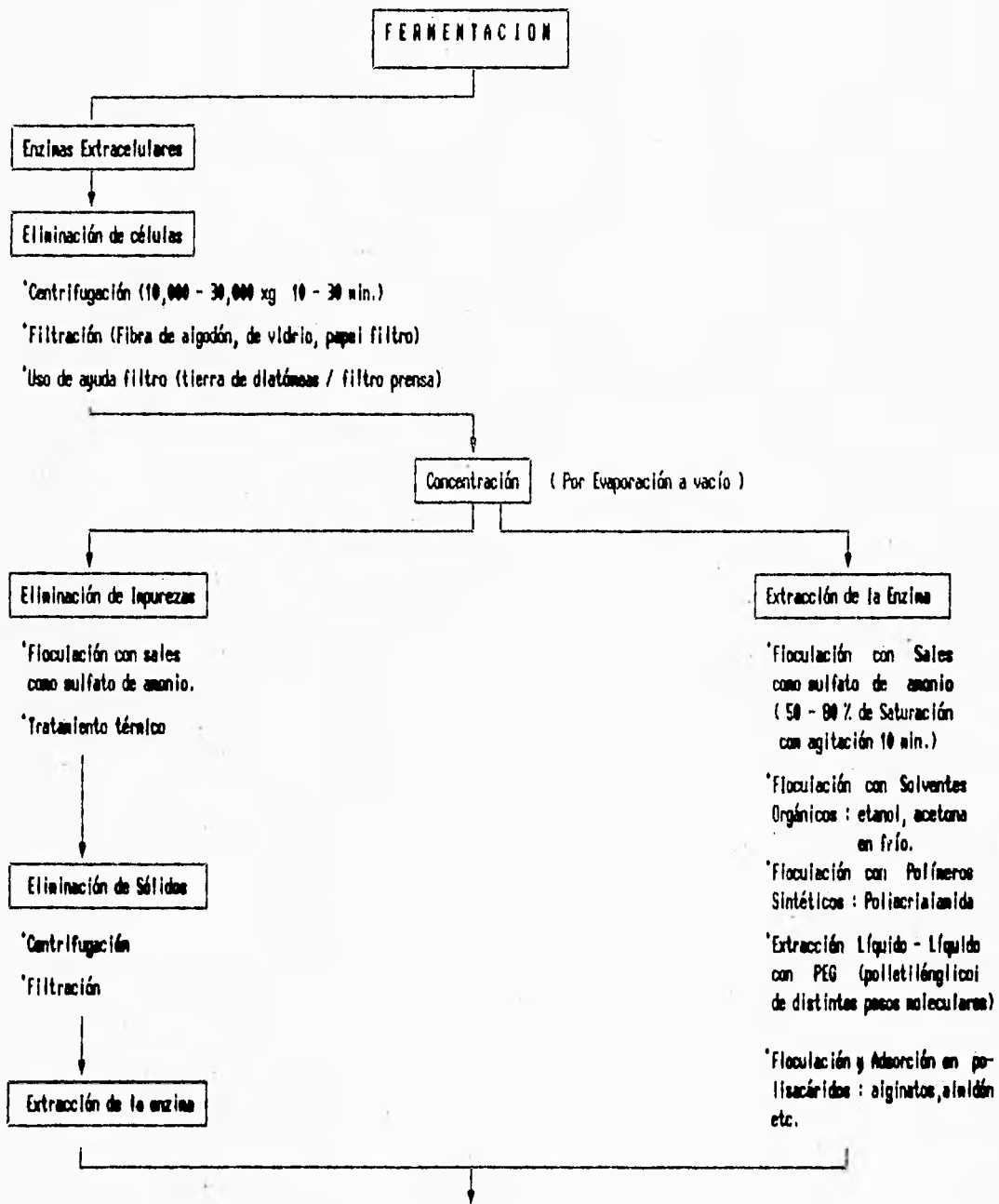


Figura 14. Recuperación de Enzimas Extracelulares.

FALLA DE ORIGEN

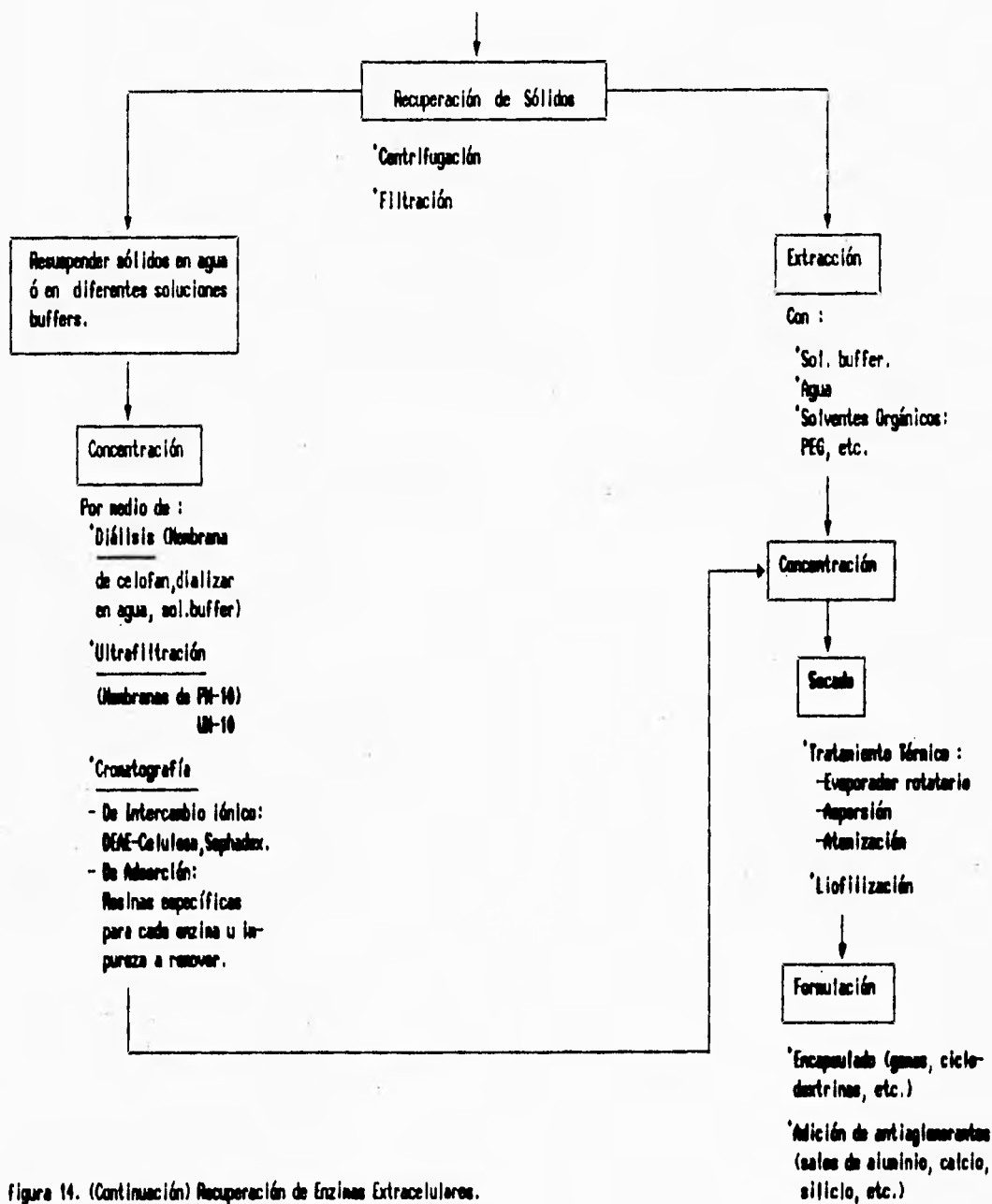


Figura 14. (Continuación) Recuperación de Enzimas Extracelulares.

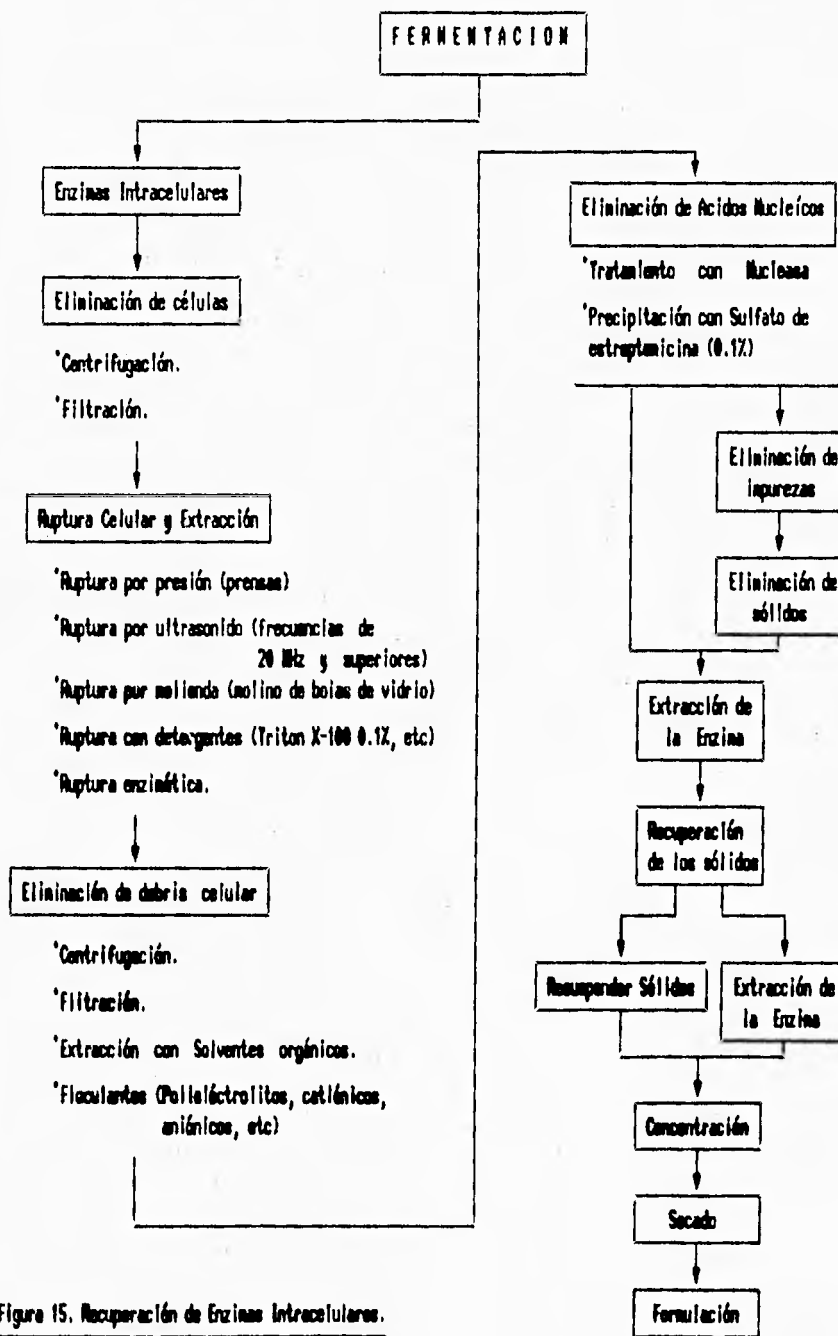


Figura 15. Recuperación de Enzimas Intracelulares.

2.1.7.- Estrategia para llevar a cabo la recuperación y purificación de una enzima específica.

- No existe un patrón general de purificación para todas las enzimas (es específica para cada una de ellas).
- Una vez elegida la fuente adecuada de material, desarrollar un ensayo de medida rápido y confiable de nuestro producto de interés.
- Establecer los pasos de separación molecular que se van a seguir durante la purificación.
- En términos generales se aconseja empezar con métodos y técnicas que se apliquen a grandes volúmenes como son : precipitación salina, temperatura, y solventes orgánicos, seguidos por una recolección de sólidos, por ejemplo, por decantación, filtración ó centrifugación, estas se pueden repetir y combinarse las veces que sean necesarias para eliminar la mayor cantidad de impurezas ó contaminantes ó para una mayor extracción de la enzima. Para la obtención de la enzima concentrada se puede llevar a cabo de manera eficiente por procesos de membrana (diálisis, ultrafiltración, ósmosis, etc.) y una concentración mayor por medio de un evaporador (rotatorio, a vacío, etc.) ó de un secado a alta ó baja temperatura (podemos citar la atomización o liofilización), para obtener una solución ó un polvo con determinada pureza y actividad.
- Controlar, verificar e ir controlando cada etapa del proceso mediante determinaciones subsecuentes a cada punto de purificación, de parámetros indispensables como actividad específica, % de proteína, etc.
- Finalmente debe de verificarse y determinar la pureza real de la enzima. Un criterio de pureza, rápido y sencillo de obtener, es la medida de la actividad específica de la enzima. La electroforésis en geles de poliacrilamida, en sus varias modalidades, es una de las técnicas más comúnmente usadas a nivel laboratorio, a lo igual que la secuencia directa ó secuenciación de aminoácidos de la cadena polipeptídica, es uno de los mejores criterios para verificar la pureza, no obstante, es un método laborioso y caro.

2.1.8.- Parámetros requeridos para la selección del tipo de equipo a emplear en un proceso global de obtención de un producto.

Estos aspectos incluyen el tipo de operación por lotes ó continuo, la velocidad de flujo, tipo, contenido y tamaño de sólidos, contaminante(s), tipos de producto y producto de interés y tipo de equipo adicional.

El tamaño de equipo podrá ser determinado de especificaciones y de los siguientes parámetros :

- 1.- Velocidad de flujo volumétrico.
- 2.- Limitación residente del producto.
- 3.- Tamaño de sólidos y eficiencia de separación.
- 4.- Area de interfase para transferencia de masas.
- 5.- Número de etapas de equilibrio.
- 6.- Area de transferencia de calor.
- 7.- Capacidad de sorción volumétrica.
- 8.- Grado de pureza (resolución).

Muchos productos biotecnológicos son solubles y se encuentra en el líquido de cultivo extracelular clarificado ó en la fracción soluble intracelular, y pueden procederse y purificarse posteriormente mediante técnicas de separación molecular que explotan propiedades como el tamaño (ya mencionada), la carga, la solubilidad, la volatilidad, la afinidad biológica, etc.

Se pueden llevar a cabo etapas adicionales para purificar el producto, cuando este, está acompañado por cometaólitos esencialmente similares que normalmente lo acompañarán a través de las etapas iniciales de recuperación. De esta forma estos pasos determinan el grado de resolución de la mezcla producto-metabólitos. Los dos métodos aplicados más comúnmente son la cristalización empleando compuestos orgánicos básicamente alcoholes (etanol, metanol, propanol, etc.) ó compuestos de baja temperatura de evaporación y varios tipos de procedimientos cromatográficos (en donde los principales variaciones entre estas radica en el tipo de soporte, solvente y condiciones de elución de la muestra); obteniendo una mayor pureza del producto final.

2.1.9.- Generalidades económicas de los procesos de recuperación y purificación.

Para una viabilidad económica óptima del proceso, hay que minimizar el número de etapas de purificación necesarias para conseguir un producto con unas

características específicas, ya que una proporción significativa de los costos totales de una planta de fermentación, la constituye la recuperación del producto.

Algunos procesos de purificación requieren de apoyos analíticos complicados y largos. éstos deben evitarse siempre que sea posible puesto que los costos pueden hacer que la etapa de purificación sea antieconómica. Además, el tiempo consumido en el control aumenta el tiempo global del proceso. Normalmente los costos de recuperación de los antibióticos representan entre el 40 % y el 60 % de los costos de producción, el costo del procesado post-fermentación representa del 80-90 % de los costos de los productos obtenidos con tecnologías de DNA recombinante.

La concentración de producto en el material de partida representa un factor clave en los costos totales de producción. En la Figura 16. se muestra la relación entre la concentración del producto a purificar del medio de partida y su precio de venta.

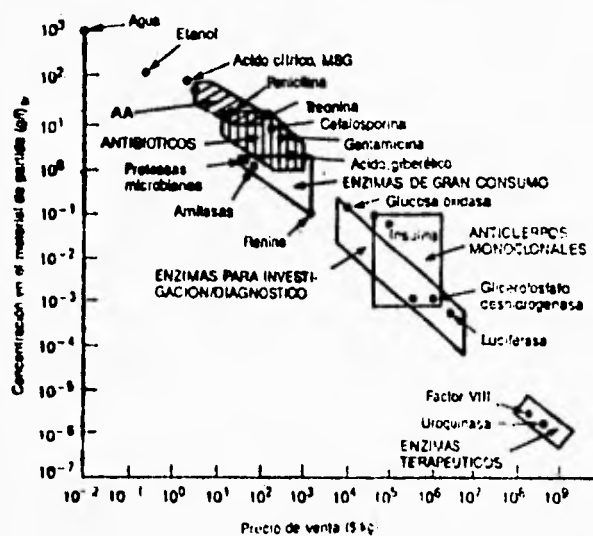


Figura 16. Relación entre la concentración del producto a purificar del medio y su precio de venta.

FALLA DE ORIGEN

2.2.- Características de las Sustancias Péclicas.

Las sustancias péclicas son polisacáridos de peso molecular variable entre 23,000 y 360,000 Daltons, constituidos principalmente por monómeros de ácido galacturónico unidos por enlaces glicosídicos α -(1-4). Los grupos carboxilo de estos monómeros pueden estar esterificados con grupos metilos. De acuerdo al grado de esterificación los polisacáridos péclicos se agrupan de la siguiente forma: a) **Protopectina** se le llama al precursor de la sustancia péclica que es insoluble en el agua y de la cual por hidrólisis se obtienen las sustancias péclicas; b) **Ácidos péclicos**, se les llama a los ácidos poligalacturónicos coloidales que contienen una pequeña proporción de grupos metilo; c) **Ácidos péclicos**, son ácidos poligalacturónicos coloidales libres de grupos metilos; d) **Pectina**, son ácidos poligalacturónicos solubles en agua cuyo contenido de grupos metoxilo puede ser variable (Comité de la Sociedad Americana de Química, Informe 1944).

2.3.- Clasificación de las Pectinasas.

Las pectinasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de las sustancias péclicas y dependiendo de la forma de atacar al sustrato; hasta a hora se han descrito 12, las cuales se agrupan principalmente en dos grupos (Kilara, 1982; Rexová-Bencová y col, 1976): las **esterasas** que catalizan la desesterificación de las unidades de ácido metilgalacturónico de la pectina produciendo metanol y ácido poligalacturónico (Figura 17); y las **despolimerizantes**, responsables de la ruptura de los enlaces glicosídicos α -(1-4) de los polímeros péclicos, y pueden ser de dos tipos: **exo** y **endo**. Las **exo** atacan el extremo no reductor de las moléculas de pectina y ácidos poligalacturónicos, produciendo ácidos galacturónicos como grupos reductores; mientras que las enzimas de tipo **endo** atacan el sustrato (pectina y ácido poligalacturónico) de una forma aleatoria, ocasionando una disminución rápida de la viscosidad del medio con dichos polímeros (Figura 18).

Dependiendo de el sustrato y la forma como actúan en el, las liasas reciben su nombre, así las liasas que atacan a las pectinas se denominan **endo-polimetilgalacturonasa liasa (endo-PMGL)** ó **endo-pectin liasa**, **exo-polimetilgalacturonasa liasa (exo-PMGL)** ó **exo-pectin liasa** y las liasas que actúan sobre ácidos poligalacturónicos toman el nombre de **endo-poligalacturonasa liasa (endo-PGL)** ó **endo-pectato liasa**, **exo-**

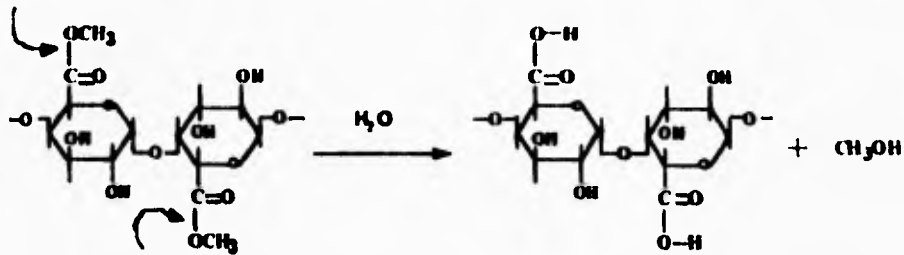


Figura 17. Actividad de las enzimas pécticas-esterasas.

Como se puede apreciar las enzimas degradan los enlaces metil-éster del carbono 6 de las unidades del ácido metilgalacturónico.

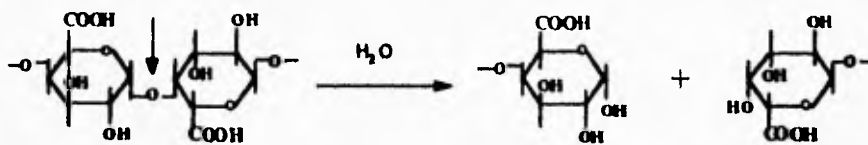


Figura 18. Forma de ataque de las endo-pectinasas.

Dentro de el grupo de despolimerasas se encuentran las liasas, las cuales catalizan una reacción de transeliminación, originando una doble ligadura entre el carbono 4 y 5 del sustrato (Figura 19).

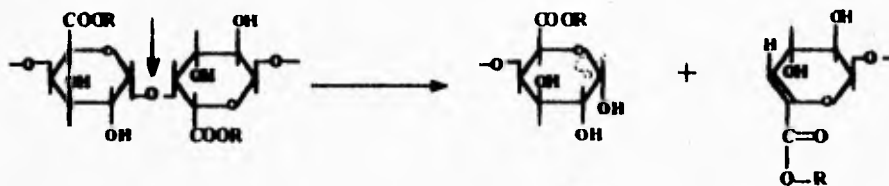


Figura 19. Forma de acción de las enzimas pectin-liasas

poligalacturonasa liasa (exo-PGL) ó exo-pectato liasa (Fogarty y Kelly, 1983; Kilara, 1982; Pilnik, 1981; Whitaker, 1984).

Las PMGL son producidas por hongos y no han sido encontradas en bacterias ni plantas superiores. Las endo y exo-PGL son típicas de las bacterias, pocos hongos las producen y no han sido encontradas en plantas superiores. La exo-PMG no ha sido encontrada en la naturaleza (Pilnik y Rombouts, 1981), las oligogalacturonasas se han encontrado en algunas bacterias de los géneros *Bacillus* y *Erwinia* (Fogarty y Kelly, 1983 ; Rombouts y Pilnik, 1980). En la Tabla 11 se resume la clasificación de las actividades enzimáticas de las enzimas pécticas en base al sustrato en el cual actúan, sus principales productos y su nomenclatura, de acuerdo a la Comisión de Nomenclatura de Enzimas (Fogarty y Ward, 1974).

2.4.- Producción de Pectinasas.

Las enzimas pécticas son producidas por microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) (Tabla 12), algunos insectos, nemátodos, protozoarios y plantas superiores (Tabla 13). Dependiendo del microorganismos y del tipo de enzima su localización es intracelular, extracelular ó periplásmica y generalmente producen en forma simultánea más de un tipo de actividad pectinolítica, sin embargo, no se ha encontrado microorganismo capaz de producir todas las enzimas mencionadas en la Tabla 11. La fuente industrial más importante de pectinasas está representada por los sistemas microbianos. Muchos son los microorganismos capaces de sintetizar tales enzimas; sin embargo, las producidas por el género *Aspergillus* poseen gran interés industrial en la actualidad. Las enzimas pécticas son enzimas inducibles (principalmente por pectina) y producidas en forma extracelular; cuya síntesis y secreción se encuentra asociada a las condiciones de crecimiento de los microorganismos productores. Existen diversos reportes científicos sobre la producción de pectinasas fúngicas, los cuales demuestran, que el tipo, variedad y cantidad de las actividades pectinolíticas, en cada caso, esta en función de las características biológicas ó tipo de microorganismo utilizado (bacteria, hongo ó levadura), de la composición del medio de cultivo (naturaleza y concentración del sustrato inductor), tipo de proceso que se utilice (lote, continuo ó alimentado) y condiciones ambientales. En la producción de actividades pectinolíticas por fermentación sumergida, se ha estudiado principalmente sobre la optimización de medios de cultivo y en donde destaca la concentración de sustratos y en el efecto de la fuente de nitrógeno

Tabla 11. Clasificación de las actividades enzimáticas que actúan sobre las sustancias pectínicas.

ENZIMA	ENLACE SOBRE EL QUE ACTÚA	SUBSTRATO SOBRE EL QUE ACTÚA	MECANISMO DE RUPTURA DEL ENLACE	PATRÓN DE ACCIÓN SOBRE EL POLÍMERO	PRODUCTO PRINCIPAL DE LA REACCIÓN	NOMENCLATURA	CLASIFICACIÓN
Esterasas metil-éster		pectina	desesterificación	variable	ácido pectico	pectin-esterasa(PE)	E.C.3.1.1.11.
Despolimerasas	glicosídicos α-(1-4)	pectina	hidrólisis	al azar	oligómeros de ácido metilgalacturónico	endo-polimetilgalacturonasa (endo-PMB)	
				terminal	ac. metilgalacturónico	exo-polimetilgalacturonasa (exo-PMB)	
			trans-eliminación	al azar	oligogalacturonato esteres insaturados en el extremo no reductor	endo-polimetilgalacturonatoliasa (endo-PMBL)	E.C.4.2.2.10.
				terminal	ac. metilgalacturónico insaturado	exo-polimetilgalacturonatoliasa (exo-PMBL)	
		ácido pectico	hidrólisis	al azar	oligómeros de ácido galacturónico	endo-poligalacturonasa (endo-PG)	E.C.3.2.1.15.
				terminal	ácido galacturónico	exo-poligalacturonasa (exo-PG1)	E.C.3.2.1.67.
					ácido digalacturónico	(exo-PG2)	E.C.4.2.2.02.
			trans-eliminación	al azar	oligogalacturonatos insaturados en el extremo no reductor	endo-poligalacturonatoliasa (endo-PGL)	E.C.4.2.2.2.
				terminal	ac. digalacturónico insaturado	exo-poligalacturonatoliasa (exo-PGL)	E.C.4.2.2.9.
						oligogalacturonasa (OG)	
oligogalacturonatoliasa (OGL)	E.C.4.2.2.6						

Adaptado de Fogarty y Kelly, 1987.

Tabla 12. Principales microorganismos productores de Pectinasas

Tipo de Pectinasa	Fuente microbiana	Ref.
Poligalacturonatoliasa	Las bacterias comumente la producen.	Fogarty y Ward, 1974.
Poligalacturonatoliasa Pectina esterasa ó Poligalacturonasa Pectina esterasa	Clostridium multiformans Erwinia carotovora	
Poligalacturonasa Polimetilgalacturonasa Pectina esterasa	Aspergillus niger Fusarium roesum Sclerotinia fructigena Colletotrichum trifolii	Fogarty y Ward, 1974.
Pectina esterasa	Fusarium oxysporum Fusarium lycopersicum	Waggoner y col, 1955.
endo-PG	hongos del género Verticillium A.saitoi A.niger	Yanasaki y col, 1966. Tuttobello y Mill, 1967.
Poligalacturonasa (Tipo I: licuefaccion)	Aspergillus aureus Aspergillus faetidus Aspergillus niger Bacillus neaentericus Byssochlamys fulva	Jensen y col, 1950. Ayres y col, 1952. Ashby y col, 1955. Brooks y col, 1955. Jansen y col, 1945. Maber y col, 1945. Pallmann y col, 1946. Natus, 1940. Schubert, 1952. Schubert, 1954. Saito, 1954. Ozawa y col, 1955. Boaven y col, 1949. Aid, 1950. Aid, 1951.

Tabla 12. (Continuación) Principales microorganismos productores de Pectinasas.

Tipo de Pectinasa	Fuente microbiana	Ref.
Poligelacturonasa (Tipo I: Licuefacción)	<i>Clostridium felsineum</i>	Kaji, 1953. Kaji, 1954.
	<i>Clostridium ulmi</i>	Backman, 1956.
	<i>Fusarium moniliforme</i>	Singh y col, 1956.
	<i>Neurospora crassa</i>	Ruelofsen, 1953. Okamoto y col, 1956.
	<i>Penicillium expansum</i>	Ozawa, 1951. Takahana y col, 1955.
	<i>Rhizopus tritici</i>	Ozawa y col, 1953. Takahana y col, 1955.
	<i>Saccharomyces fragilis</i>	Luh y col, 1951. Luh y col, 1954. Furuchi y col, 1954.
	<i>Solanum lycopersicum</i>	McCready y col, 1955. Ozawa y col, 1955. Luh y col, 1956.
	<i>Verticillium dahliae</i>	Kamal y col, 1955.
	Polimetilgalacturonasa (Tipo II: Licuefacción)	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacterium aridobae</i>		Wood, 1951. Wood y col, 1952. Wood, 1955.
<i>Botrytis cinerea</i>		Jennyn y col, 1950. Tribe, 1955.
<i>Erwinia carotovora</i>		Atai y col, 1955.
<i>Pythium de Baryanum</i>		Wood, 1955.
Poligelacturonasa (Tipo III: Sacarificación)	<i>Aspergillus foetidus</i>	Ayres y col, 1952. Abby, 1955.
	<i>Aspergillus niger</i>	Brooks y col, 1955. Notus, 1948. Saito, 1954. Saito, 1955.
	<i>Clostridium butyricum</i>	Kaji, 1953. Kaji, 1954.
	<i>Clostridium felsineum</i>	Kaji y col, 1955.
	<i>Daucus carota</i>	Ozawa y col, 1955.
	<i>Sclerotinia libertiana</i>	Ishibaahl y col, 1951. Takahana y col, 1954.

FALLA DE ORIGEN

Tabla 13. Algunas plantas superiores productoras de pectinasas.

Planta Superior	Tipo de Pectinasa						
	PE	PG	PGL	PMG	PMGL	OG	OGL
Cítricos	*						
Tomate	*	*					
Manzana	*	*					

PE : Pectinesterasa; PG : Poligalacturonasa; PGL : Poligalacturonato-liasa; PMG : Polimetilgalacturonasa;

PMGL : Polimetilgalacturonato-liasa; OG : Oligogalacturonasa; OGL : Oligogalacturonato-liasa.

Adaptado de Fogarty y Kelly, 1983; Pilnik y Rombouts, 1981.

(Tabla 14); debido al precio alto de la pectina, esta no puede ser empleada en la formulación del medio de producción a nivel comercial.

Comercialmente se producen a partir de desechos agroindustriales, suplementado con nitrógeno inorgánico (sulfato de amonio) y algunos otros nutrientes; encontrando que hay una producción de dichas enzimas en cáscara de limón de casi el doble del producido, por cada uno de los medios restantes (Tabla 15). Las bacterias comúnmente producen poligalacturonasa y solo algunas producen además pectinesterasa; las bacterias del género *Erwinia* producen prácticamente la mayoría de las actividades (Fogarty y Kelly, 1983). Los hongos en cambio, producen una mayor variedad de actividades pectinolíticas y varios hongos del género *Verticillium* producen hasta 3 ó 4 actividades diferentes (Fogarty y Ward, 1974), dentro de las cuales, las más comunes son poligalacturonasa, polimetilgalacturonasa y pectinesterasa. Las poligalacturonas actúan a pH de 4.0 a 6.5; mientras que las pectin-liasas requieren algunas de iones divalentes para su actividad; estas y otras características bioquímicas y

Tabla 14. PRODUCCION DE PECTINASAS.

Factor que Interviene en la Producción de Pectinasas	Ref.
<u>Composición del medio :</u>	
<u>Efecto de la Fuente de Carbono.</u>	
Efecto de varias fuentes de Carbono :	Saito, 1955.
ac.galacturónico, ac. glucónico,	Phaff, 1957.
ac.poligalacturónico, galactosa,	Tuttobello y Hill, 1961.
glicerol, glucosa, fructosa,	Yamazaki y col, 1966.
sacarosa, pectina	Mjiri, 1968.
	Zetelaki-Horvath y Be -
	kassy-Molnar, 1973;1975.
	Finkelman y Zajic, 1970.
	Srivastava y col, 1982.
	Antapovich y col, 1985.
	Chopra y Nahta, 1985.
	Ravelomanana y col, 1986.
	Aguilar y col, 1987
	Alana y col, 1989.
	Aguilar y col, 1990.
Efecto de Carbohidratos y Aminoácidos	Nahta, 1985.
<u>Uso de subproductos agroindustriales</u>	
ricos en materiales pécicos como	
fuente de carbono.	
* Pulpa de remolacha azucarera	Szajer, 1976;1978.
	Zetelaki-Horvath, 1976.
	Zetelaki-Horvath y Vas, 1981.
* Pulpa de manzana	Szajer, 1976.
* Cascara de cítricos	Fogarty y Ward, 1974.
	Maldonado y col, 1986.
* Pulpa de henoquén	Rombouts y Piliñk, 1988.
	Sevel, 1985.
Residuos Lácteos	García-Garibay y col, 1987.
Otros Sustratos como:	Murad y Foda, 1992.
residuos agrícolas y de pescado	Sharma y Joseph, 1984.

*Sustratos empleados para la producción a nivel comercial de Pectinasas en algunos países industrializados (Fogarty y Ward, 1974; Rombouts y Piliñk, 1988).

FALLA DE ORIGEN

Tabla 14. (Continuación) PRODUCCIÓN DE PECTINASAS.

Factor que Interviene en la Producción de Pectinasas	Ref.
<u>Fuente de Nitrógeno y Sales.</u>	Chopra y Mehra, 1985.
Agua de cocimiento de maíz	Yamasaki y col, 1966.
Salvado de trigo	Tuttobello y Mill, 1961
Harina de soya y Urea	
Nitrato de Sodio	
Nitrato de amonio	
Fosfato de amonio, potasio.	Ashour, 1956.
Sulfato de amonio	Sawal, 1985.
Sales grado analítico y grado industrial (pH)	
Surfactantes (Tween 80)	
<u>Efecto del Tamaño, Edad y Morfología del Inóculo.</u>	Alana y col, 1989. Fiedoruk y col, 1989. Friedrich y col, 1990. Fiedoruk y col, 1992.
Efecto de la goma de Tragacanto como inductor en la formación de Pectinasas.	Sawal, 1985.
<u>Condiciones ambientales :</u>	
<u>Oxigenación y velocidad de agitación</u>	Yamasaki y col, 1966. Winborne y Rickard, 1978. Zetelaki-Horvath y Bekassy, 1975. Zetelaki-Horvath y Uae, 1981. Sawal, 1985.
<u>Temperatura</u>	Endo, 1964a; 1964b; 1964c. Yamasaki y col, 1966. Liu, 1978. Zetelaki, 1981. Veda, 1982. Fellous y Morgan, 1984. Sawal, 1985. Sille, 1986. Bailey, 1990. Kotzekidou, 1991. Stutzenberger, 1991.

FALLA DE ORIGEN

Tabla 14. (Continuación) PRODUCCION DE PECTINASAS.

Factor que Interviene en la Producción de Pectinasas	Ref.
pH	Silleg, 1986. Kotzakidou, 1991.
<u>Tipo de Proceso de Fermentación.</u>	
En Cultivo Continuo	Zetelaki-Horvath, 1983.
En Cultivo de Alimentación por Lotes	Aguilar y col, 1986.
Fermentación en Estado Sólido	Budiatzan y Lomene, 1987. Hours y col, 1988a y 1988b. Desgranges y Durand, 1990. Garzon y Hours, 1992.
En Cultivo Sumergido	Herneroberfer y col, 1984.
Escalanteo	Mjiri, 1960.

FALLA DE ORIGEN

Tabla 15. Producción de Pectinasas de *Aspergillus sp.* a partir de diferentes desechos agroindustriales.

Desecho Agroindustrial	Concentración del desecho en el medio (%)	Concentración de pectina en el desecho (%)	Actividad Pectinolítica ^a	
			Exo (mg Az. red/mL)	Endo (unidades de cambio en fluidez relativa/mL)
Pulpa de Henequén	2.0	7 ^b	4.5	0.16
Cáscara de limón	1.0	29 ^c	0.4	0.22
Cáscara de piña	1.0	22 ^c	3.8	0.12
Cáscara de naranja	1.0	20 ^c	5.2	0.18
Pulpa de remolacha	0.45	30 ^c	4.3	0.14

El medio de cultivo contenía: sales industriales, agua de la llave y el sustrato correspondiente. Las fermentaciones se llevaron a cabo en jarras de 14 litros a 37 °C, con agitación de 200 rpm y aeración 10 litros x min⁻¹.

a) La actividad se midió en el filtrado libre de células a las 120 horas de fermentación.

b) Fuente: Rivera, 1981.

c) Fuente: Fogarty y Ward, 1974.

funcionales de las enzimas pécticas son reportadas y tratadas por los referencias presentadas en la Tabla 16.

FALLA DE ORIGEN

Tabla 16. Características Cinéticas y Funcionales de las Pectinasas.

Enzima Pécica	Referencias.
<u>Pectinesterasas :</u>	McCulloch y col, 1947. Piñuela y col, 1948. Colemanick y col, 1950. Edwards y col, 1952. Bryan y col, 1954. Guyer y col, 1956.
<u>Péctin-asa</u>	Mikhalova y col, 1991.
<u>Poligalacturonasas :</u>	Pallmann y col, 1946. Raji, 1953; 1954. Schubert, 1954. Cole, 1956. Koch, 1956. Millan y col, 1956. Bengascki y col, 1983. Bester y Visser, 1990. Alana y col, 1991. De L'Impiazzi y col, 1991. Belourdas y col, 1991. Pardo y col, 1991. Schoppain y Dietrich, 1991.

FALLA DE ORIGEN

2.4.1.- Perspectivas en la producción de pectinasas.

La economía en la producción de enzimas puede ser incrementada mediante la obtención de cepas mutantes que presenten alteraciones de los mecanismos que regulan la síntesis de sus enzimas, como las insensibles, represión catabólica, las hiperproductoras ó aquellas que sintetizan mayor cantidad de enzimas sin la necesidad de un inductor. El mejoramiento genético de un microorganismo con el fin de sobreproducir las enzimas pécticas depende básicamente del manejo de todos aquellos principios generales involucrados en la síntesis y regulación de estas enzimas. La manipulación genética se emplea para originar cambios que eliminen propiedades no deseables, incrementen las adecuadas, ó introduzcan otras nuevas para incrementar los rendimientos en los productos de fermentación, ya que en la industria las altas productividades son esenciales para reducir ó mantener los costos de producción (cepas hiperproductoras). Hay pocos trabajos reportados sobre mejoramiento genético para la producción de pectinasas; las cuales han utilizado esencialmente las técnicas de mutagénesis y de recombinación genética (Tabla 17).

Tabla 17. Mejoramiento Genético en la Producción de Pectinasas.

Tipo de Enzima Péctica	Referencia.
Pectato liasa	Hugouviour-Cotte y Baudouy, 1989. Wing y col, 1990. Liao, 1991.
Péctin esterasa	Ray y col, 1988. Albani y col, 1991. Louchterberger y Mayer, 1991. Spok y col, 1991. Louchterberger y Mayer, 1992.
Péctin liasa	Gysler y col, 1990. Hansen y col, 1990. McEvoy y col, 1990. Nishida y col, 1990. Kusterovansomeran y col, 1991. Louchterberger y Mayer, 1991. Louchterberger y Mayer, 1992.
Péctin metilesterasa	Hugouviour-Cotte y Baudouy, 1989. Harriman y col, 1991. Heikinheimo y col, 1991. Whan y col, 1991.
Endo-poligalacturonasa	Scottcraig y col, 1990. Louchterberger y Mayer, 1991. Louchterberger y Mayer, 1992.
Exo-poligalacturonato liasa	Brooks y col, 1990.
Poligalacturonasa	Smith y col, 1990. Allen y col, 1991. Bussink y col, 1991. Louchterberger y Mayer, 1991. Louchterberger y Mayer, 1992.

2.5.- Importancia y aplicación de las pectinasas.

En la Tabla 18 se hace referencia a las enzimas permitidas para uso en alimentos y las fuentes microbiológicas, reconocidas como GRAS (generalmente reconocidas como seguras) por la FDA (Food and Drug Administration, EUA).

La turbiedad presente en los jugos de frutas, se debe principalmente a la presencia de pectina la cual se libera durante la meceración de las frutas. Las enzimas pécticas intervienen biológicamente de manera importante, desde las etapas de germinación, desarrollo de las plantas (elongación celular), maduración de frutas, vegetales, etc; hasta la caída de las hojas (Kertesz, 1951; Devel, y Stutz, 1958; Fogarty y Ward, 1974; Neubeck, 1975; Rexová-Benková y Markovic, 1976). La importancia de las pectinasas deriva justamente de su capacidad para hidrolizar la pectina, presente en productos derivados de frutas y vegetales en donde contribuye con las propiedades reológicas y en la estabilidad fisicoquímica de los mismos, de aquí que su principal interés sea en la industria alimentaria.

Las pectinasas producidas por hongos son las que presentan mejores características para su aplicación industrial principalmente por que son extracelulares, tienen mayor capacidad de degradación de la pectina y se facilita su recuperación del caldo de cultivo. De las actividades pectinolíticas, la más importante desde el punto de vista industrial son las **endo**, que como ya se mencionó rompen al azar las cadenas de la pectina presente en los jugos de frutas, ocasionando una disminución de la viscosidad de éstos facilitando así su procesamiento. Estas enzimas intervienen directamente en el procesamiento de residuos de origen vegetal, puesto que ayudan a evitar la acumulación de estos, ya que degradan los tejidos de las plantas (Fogarty y Ward, 1974; Neubeck, 1975; Rexová-Benková y Markovic, 1976; Piilnik y Rombouts, 1979; Rombouts y Piilnik, 1980). En la Tabla 19 se presentan algunas de las aplicaciones de las pectinasas, en donde destaca, por su importancia la aplicación en la industrialización de frutas y vegetales. El uso de enzimas pécticas en el procesamiento de frutas fue introducido por Kertesz en los Estados Unidos alrededor de 1930; junto con enzimas celulolíticas (Kilara, 1982).

Tabla 10. Enzimas permitidas para uso en alimentos por el CFR (código de regulación federal) ó reconocidas como GRAS por la FDA, en los Estados Unidos).

Enzima	Fuente	
α-amilasa	A. niger	GRAS
	A. oryzae	GRAS
	R. oryzae	GRAS
	B. subtilis	GRAS
	Malta (cebada)	GRAS
	B. licheniformis	GRAS(+)
β-amilasa	Malta (cebada)	GRAS
Celulasa	A. niger	GRAS
α-galactosidasa	H. vinacea	CFR
	A. niger	GRAS
	R. oryzae	GRAS
	S. fragilis	GRAS
	L. lactis	GRAS(+)
Pectinasa	B. niger	GRAS
	B. oryzae	CFR
Glucosa isomerasa	S. rubiginosus	GRAS(+)
	A. missouriensis	GRAS(+)
	S. olivaceus	GRAS(+)
	S. olivochromogenes	GRAS(+)
	B. coagulans	GRAS(+)
	A. globiformis	GRAS(+)
Catalasa	A. niger	GRAS
	Hígado (bovinos)	GRAS
	H. isodeikticus	CFR
Glucosa oxidasa	A. niger	GRAS
Bromelina	Pina (Ananas comosus)	GRAS
Ficina	Hígado (Ficus spp.)	GRAS
Papaina	Papaya (Carica papaya)	GRAS
Renina	4 ^o estómago rumiantes	GRAS
	E. parasitica	CFR
	B. coagulans	CFR
	H. miehei	CFR
	H. pusillus	CFR
Pepsina	Estómago porcinos, bovinos	GRAS
Tripsina	Páncreas	GRAS
Proteasa	A. niger	GRAS
	B. subtilis	GRAS
Lipasa	Tejido pancreático	GRAS
	A. niger	GRAS
	R. oryzae	GRAS
Lipasa-esterasa	H. miehei	GRAS(+)

(+) Sujeta a petición GRAS.
Fuente: Godfrey y Reichelt, 1983.

Tabla 19. Aplicaciones de las Pectinasas en la Industria.

Aplicación en :	Importancia	Referencias
Industria de frutas y vegetales	favorece la maceración de tejidos vegetales y frutas durante la elaboración de purés.	Fogarty y Ward, 1974 Kulp, 1975. Neubeck, 1975. Rexová-Benková y Markovic, 1976. Taylor y Richardson, 1979. Rombouts y Pilnik, 1978. Baumann, 1981.
	disminuye la viscosidad de los néctares y concentrados de frutas, facilitando su filtración.	Grampp, 1981, 1982 Kilara, 1982.
	solubiliza las sustancias pécticas presentes en los jugos, favoreciendo su clarificación, abrillantamiento, estabilidad y color del mismo.	Robbins, 1968. Fogarty y Ward, 1974 Kilara, 1982. Whitaker, 1984.
	aumenta los rendimientos en la obtención de jugos.	Velasco, 1968.
	en la producción de bases de néctares y alimentos de bebés.	Platt, 1962.
	en jugos fermentados intervienen en la licuefacción y fermentación. En el tratamiento de la pulpa de coco y las aceitunas para incrementar los rendimientos en la recuperación del aceite.	Omran y col, 1989.
	en la limpieza de la cáscara de frutas para su uso en confitería.	Phaff, 1974.

Industria de Encurtidos	en encurtidos principalmente en pepinos la presencia de pectinasas ayudan a obtener la textura deseada.	Bell y col, 1950 Bell, 1951 Bell y col, 1951. Bell y col, 1956. Demain y col, 1957.
Industria de Aceites	extracción de aceites esenciales. Para mejorar la filtración del a ceite de oliva.	Hamdi y Elouz, 1992.
Industria Vinícola	favorece la fermentación de jugos destinados a la elaboración de vinos y sidras.	Urlaub, 1978. Felix y Villettaz, 1983.
	favorece la extracción del color durante la etapa de maceración de las uvas para la elaboración de vinos tintos y rosados.	Velasco, 1968.
	eliminan la turbiedad y la viscosidad de la sidra ó delloor de mandarina.	Naganishi, 1954.
Industria Cervecera	en la estabilidad de la cerveza.	Henriksson y Haikara, 1991.
Industria Téxtil	para el enriado de las fibras textiles, en donde las pectinasas hidrolizan los materiales pécticos presentes en las fibras, disminuyendo e incluso eliminar su dureza y facilitando así su desfibración (lino, cáñamo y yute).	Deuel y Stutz, 1958. Ward y Fogarty, 1971 Fogarty y Ward, 1974 Avrova, 1975. Rombouts y Pilnik, 1980.
Industria Cafetalera, Chocolatera y Tabaquera	intervienen en la fermentación del café, cocoa y del tabaco.	Deuel y Stutz, 1958. Taylor y Richardson, 1980. Rombouts y Pilnik, 1980. Pilnik y Rombouts, 1979, 1981.
Industria Maderera	en el tratamiento de maderas de coníferas favoreciendo a la permeabilidad a los preservadores.	Fogarty y Ward, 1974 Rombouts y Pilnik, 1980.

Investigación Génética.	en la producción de protoplastos.	Eb y col. 1985. Lee y Tan. 1988. Martínez y col. 1989. Zhou y Wang. 1989.
-------------------------	-----------------------------------	--

Las actividades más importantes de los preparados comerciales, son la endo-poligalacturonasa (endo-PG) y la endo-polimetilgalacturonasa (endo-PMG), las cuales causan una disminución de la viscosidad de los jugos de frutas y facilitando su filtración y procesamiento en general.

2.6.- Situación en México respecto a la producción e importación de pectinasas.

Las compañías productoras de enzimas son relativamente escasas (alrededor de 25 empresas), al menos las que participan en el mercado internacional, de éstas sólo seis dominan claramente el mercado y se trata de compañías extranjeras, europeas principalmente. Industrias Novo (Dinamarca), cubre el 50 % del mercado internacional, Gist Brocades (Holanda), 20 % adicional y Laboratorios Miles (E.U), participa con un 12 % aprox. Estas cifras deben ser analizadas con reserva, ya que una proporción de las enzimas producidas no está disponible en el mercado libre, si no que son empleadas dentro de las mismas compañías.

La expansión de las compañías productoras de enzimas es frecuente. Industrias Novo recientemente triplicó su capacidad de producción en una de sus plantas en E.U. En 1982 dedicó más de 60 millones de dólares a la investigación, de éstos, el 10 % se dirigió a investigación básica, un 20 % al desarrollo de nuevos productos, un 20 % al mejoramiento de productos existentes, un 5 % a disciplinas técnicas, un 15 % a servicios técnicos y un 30 % a servicios administrativos.

Actualmente en México existe un productor local de importancia que es Pfizer S.A., que además junto con con Farmex, representa una de las pocas empresas que se han interesado en la industrialización de enzimas. Otra empresa Enmex S.A. distribuye preparados enzimáticos de Miles laboratorios. (Ininter, 1987). El mercado de enzimas tiene aún un enorme campo de expansión de aproximadamente 2000 enzimas descubiertas y caracterizadas pero no más de 150 son industrializadas. Cerca del 62 % de las enzimas producidas encuentran su

aplicación en alimentos, entre 33 % en detergentes y 5 % en textiles y curtiduría. (Leblond, 1990).

La distribución de las pectinasas en el mercado total se encuentra en un 3% (Tabla 20) ; mientras que los principales países productores de estas son República Federal de Alemania, Suiza, Dinamarca, Estados Unidos y Japón (Perlman, 1977; Rombouts y Pilnik, 1980) y los productos comerciales de estas enzimas y las compañías productoras se enlistan en la Tabla 21.

Tabla 20. Distribución de enzimas de interés industrial.

Grupo	Enzima ó area de aplicación	Porcentaje del mercado	Total %
Proteasas	Alcalinas (detergentes)	25	59
	Alcalinas	6	
	Neutras	12	
	Acidas	3	
	Reninas	10	
	Tripsina	3	
Carbohidrasas	β -amilasa	13	28
	α -amilasa	5	
	Celulasa y Lactasa	1	
	Isomerasas	6	
	Pectinasas	3	
Lipasas	Lipasa	3	3
Otras	Area analítica	10	10
	Area farmacéutica		
	Otras		

Fuente: Godfrey y Reichelt, 1983.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla 21. Principales compañías productoras y comercializadoras de pectinasas en el mundo.

Enzimas	Industrias Novo	Gist Brocades	Laboratorios Miles
Pectinasa	Pectinex Ultrazym	Klerzyme Rapidase CX, CXP	Clarex Spark-L

Las preparaciones comerciales de pectinasas son una mezcla de diferentes actividades pectinolíticas, principalmente poligalacturonasa y pectinesterasa y otras actividades enzimáticas entre las que se encuentran celulasas, xilanasas, amilasas, glucosidasas y proteasas (Urtaub, 1978; Pilnik y Rombouts, 1979; Rombouts y Pilnik, 1980) producidas en fermentación sumergida ó semisólida por hongos entre los que se encuentran *Aspergillus niger* (Nuebeck, 1975; Meyrath, 1975; Barbesgaard, 1977; Pilnik y Rombouts, 1979; Rombouts y Pilnik, 1980), *A. oryzae*, *A. wentii*, *A. flavus* (Fogarty y Ward, 1974; Kilara, 1982), *Penicillium simplicium* (Sears, 1979) y *Coniothyrium diploidiella* (Endo, 1963). Actualmente la producción de pectinasas se lleva a cabo utilizando sistemas de fermentación sumergida ó semisólida.

La Tabla 22 nos enlista algunos de los preparados pectinolíticos disponibles en el mercado y algunas de sus características importantes para su uso práctico en la clarificación de jugos. Algunos estudios indican que la temperatura óptima para Pectinol D es de 50 °C (Urtaub, 1978; Grampp, 1982) y también para la Pectinasa IEC (Enzimas y Productos Químicos, S.A., 1981). Para otras preparaciones comerciales solo se indica la temperatura que debe utilizarse (Kilara, 1982; Biocon, Ltd. B/14-10/79) y solo aquellas denominadas HT (high Temperature) son activadas a temperaturas mayores a 50 °C. En otros estudios se cita que la temperatura óptima para las endo-PG de una preparación comercial producida por *Coniothyrium diploidiella* fué de 45 °C (Endo, 1964b; 1964c).

Tabla 22. Rendimientos de la clarificación de jugo de manzana por la acción de algunas preparaciones de Pectinasas.

Preparación enzimática	Cantidad de proteína adicionada (μg)	Volumen de jugo clarificado a las 2 h (mL)	Rendimiento (b)	% Del máximo
Clarex	68.0	90	0.90	100
Ultrazym 100	68.2	90	0.90	100
Biopectinasa	67.6	60	0.60	66.7
Pectinasa IEC	79.8	52	0.52	57.8
Klerzyme	74.8	30	0.30	33.3
Rapidase	60.6	37	0.37	41.1
Filtrado de <i>Aspergillus sp.</i>	74.4	85	0.85	94.5
Control sin enzima	0	26	0.26	28.9

(b) Rendimiento expresado como volumen de jugo clarificado / volumen inicial de jugo.

Fuente: Saval, 1985.

En México se sabe que la demanda de las pectinasas existe ya que algunas empresas del sector alimentario las emplea y va en aumento. No se producen en México, por lo que su importación en forma de preparados proviene de Japón, Estados Unidos de Norteamérica y otros países. Aunque en México si se tienen dichos materiales pécnicos, no es posible su aplicación en la producción de enzimas debido a que estos sustratos (Tabla 14), su producción es muy variable, estacional y además subutilizados; pero existen otras alternativas como paja de trigo, cascarilla de arroz, bagazo de la caña de azúcar, pulpa de henequén y otros que están disponibles todo el año, se producen en grandes cantidades y están siendo subutilizados (Saval, 1985).

2.7.-Justificación.

- Las pectinasas y en especial las endo-pectinasas son biocatalizadores que hoy en día presentan múltiples aplicaciones industriales y principalmente en la industria alimentaria (procesamiento de frutas y vegetales). Debido a que en México aún no se produce algún producto con esta actividad enzimática y a que se tiene una dependencia importante de concentrados pectinolíticos producidos en el extranjero, surge la necesidad de estudiar y optimizar la producción de pectinasas a partir de subproductos industriales (cáscara de limón) considerando además que el mercado de su uso muestra una tendencia creciente.
- Un proceso biotecnológico esta formado fundamentalmente por dos partes. La primera que concierne a la producción del ó los metabolitos de interés (antibióticos, enzimas, etc...) y una segunda parte cuya finalidad es la separación, extracción y purificación del producto deseado. Esta parte puede involucrar más del 50 % de la inversión global del proceso, dependiendo de la complejidad química ó bioquímica del producto, del grado de pureza deseado y principalmente del uso que se le va a dar; todas estas consideraciones conducen a un incremento importante en el precio final del mismo, por lo que es fundamental estudiar y conocer las operaciones unitarias que se pueden emplear en esta etapa.

" Producción y Separación de Pectinasas ".

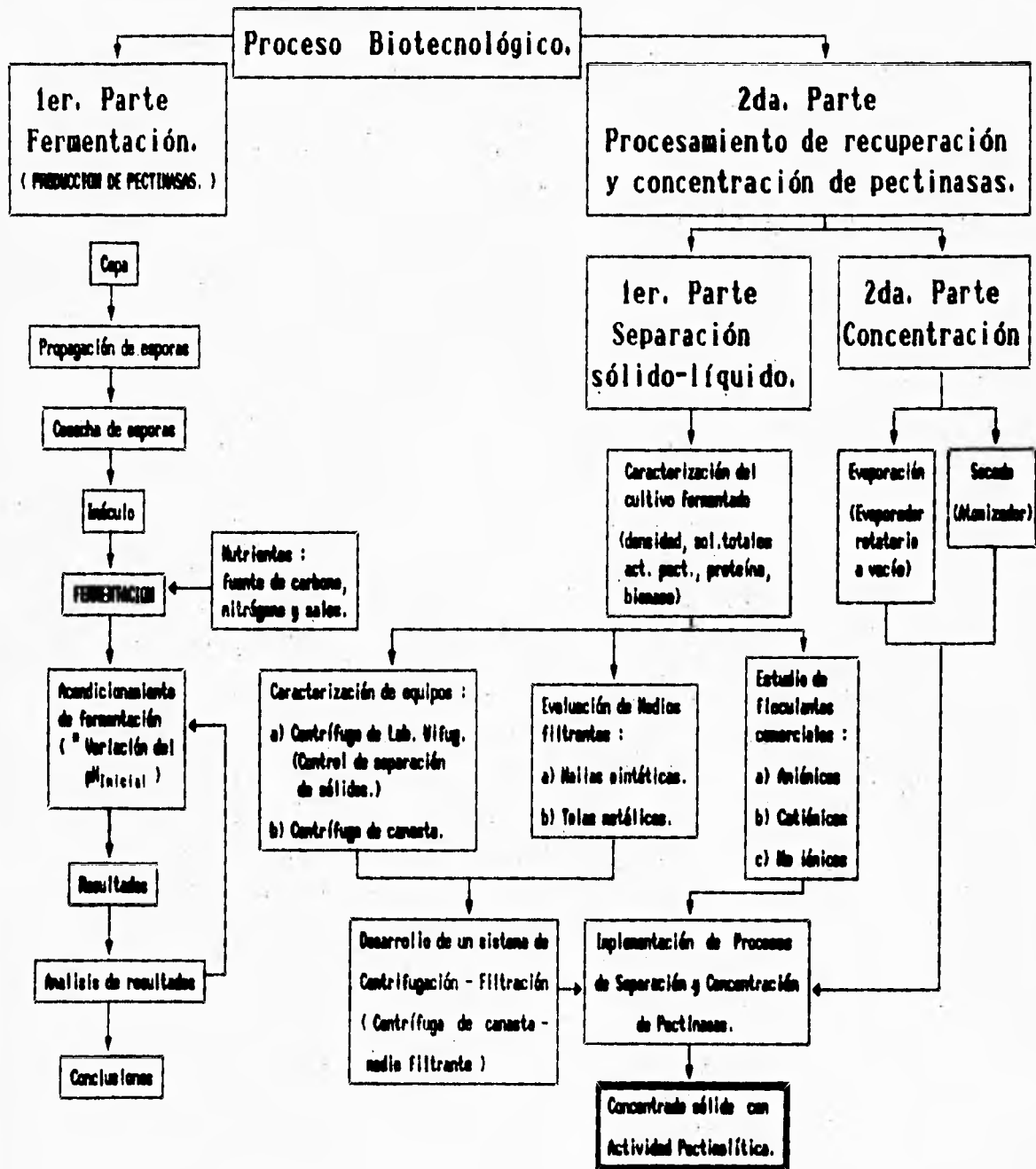
2.8.-Objetivo General.

- Determinar la influencia del pH inicial de fermentación sobre la producción de pectinasas.
- Estudiar algunas operaciones unitarias para la separación y concentración de pectinasas.

-Objetivos Específicos.

- Evaluar el efecto del pH inicial de fermentación en la producción de pectinasas.
- Analizar el efecto de las operaciones unitarias a emplear sobre la separación de sólidos y la actividad pectinolítica.
- Estudiar el efecto del uso de diferentes medios filtrantes en la separación de sólidos y en la actividad pectinolítica.
- Observar la influencia del uso de floculantes sobre la separación de sólidos y su repercusión sobre la actividad pectinolítica.
- Obtención de un concentrado con actividad pectinolítica.

2.9.- Diagrama de Flujo del Trabajo Experimental.



III.- MATERIALES Y METODOS.

El plan de trabajo se desarrollo en dos fases experimentales. La primera enfocada a evaluar la influencia del pH inicial de fermentación en la producción de enzimas pécticas mediante fermentación en cultivo sumergido empleando un fermentador de 14 L. Se cuantificó la actividad pectinolítica (endo y exo), biomasa y proteína producida a lo largo de la fermentación.

La segunda etapa se enfocó a estudiar algunas operaciones unitarias de separación y concentración de pectinasas; para lo cual, se realizaron las siguientes actividades:

a) Se determinó la eficiencia de separación de sólidos insolubles del medio fermentado de una centrífuga de canasta, manejando diferentes volúmenes de alimentación y caracterizando el líquido centrifugado.

b) Se evaluó la capacidad de separación de sólidos insolubles de diversos medios filtrantes (mallas sintéticas de diversos materiales y telas metálicas de acero inoxidable de diferentes aberturas), con la finalidad de seleccionar los medios filtrantes más eficaces para este propósito considerando además de su capacidad de filtración, su costo, maleabilidad, mantenimiento y disponibilidad en el mercado. También se probó su funcionalidad en una centrífuga de canasta.

c) Se estudió la capacidad de separar sólidos por medio de la floculación de éstos, utilizando diferentes tipos de floculantes comerciales (aniónicos, catiónicos y no iónicos) y además se observó su repercusión sobre la actividad pectinolítica. La selección del mejor floculante en esta etapa fue tomando como base la concentración necesaria para lograr la mayor precipitación de sólidos (eficiencia de separación de sólidos), su influencia sobre la actividad pectinolítica del cultivo, su disponibilidad y precio. Finalmente el mejor floculante seleccionado se utilizó en combinación con otras operaciones unitarias de separación y concentración, durante el proceso de recuperación de pectinasas.

d) Se realizaron varias secuencias de recuperación y concentración de pectinasas, empleando diferentes equipos : centrífuga de canasta, centrífuga de discos, evaporador rotatorio y secador; se midió la eficiencia de separación de sólidos y su influencia en la actividad pectinolítica de cada etapa.

3.1.- Reactivos :

3.1.1.- Analíticos.

Acido 3,5 dinitrosalicílico, agar papa dextrosa se obtuvieron de Merck de México. Pectina cítrica (grado de esterificación 49 %), albúmina sérica bovina, Tween 80 y reactivo de Fenol Folin-Ciocalteu se consiguieron de Sigma Chemical Co (U.S.A y México S.A). Acido sulfúrico, ácido clorhídrico, cloruro de sodio, carbonato de sodio, fenol, hidróxido de sodio, glucosa, metabisulfito de sodio, tártrato doble de sodio y potasio, de J.T. Baker de México, S.A.

3.1.2.- Industriales.

Fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio y sulfato de amonio se adquirieron en la Droguería Cosmopolita, México S.A. La cáscara de limón se obtuvo como subproducto de la industrialización del limón, de una Planta situada en Tecomán, Colima y el cual se seco a la intemperie y fue triturado antes de emplearse.

3.2.- Medios Filtrantes.

Las telas metálicas de acero inoxidable de calibre 10 x 10 (abertura = 1.91 mm), 16 x 16 (1.13 mm), 20 x 20 (0.864 mm) y los tamices de No. 30 (0.59 mm), No. 40 (0.42 mm), No. 80 (0.177 mm) y No. 150 (0.105 mm), fueron obtenidos de la compañía Telas Metálicas de Inoxidables y Nylon (Av. año de Juarez # 198, Granjas de San Antonio, México D.F.).

Las mallas sintéticas de Nylon (615 μ), Poliéster (150 μ) y Polipropileno (300 μ y 800 μ), se adquirieron de Telas Metálicas Industriales (Area de sintéticos, Naucalpan, Edo. de México).

3.3.- Floculantes.

Se obtuvieron los floculantes de dos empresas : De Mazer de México : Los floculantes, MAFLOC-781, MAFLOC-837, MAFLOC-861, MAZTREAT-SDC, MAZTREAT-SDC-C. Estos floculantes son de naturaleza catiónica. De Proveedores Técnicos Galgon : CAT FLOC (catiónico), CAT FLOC K-5 (catiónico), COAG-235

(catiónico), HYDRAID-777 (catiónico), HYDRAID-5515 (catiónico), L690-EZ (aniónico), POLEZ-652 (no iónico), WT-2640 (catiónico).

3.4.- Fermentación.

3.4.1.- Microorganismo

Se utilizó una cepa de *Aspergillus sp.* aislada y seleccionada de muestras de suelo de una zona henequenera del Estado de Yucatán, por su capacidad de producir enzimas pécticas extracelulares a 37 °C (Aguilar y Huitron, 1986, 1987, 1990; Saval, 1985).

3.4.2.- Composición del Medio de Cultivo.

Medio de Producción de Pectinasas.

A nivel Matraz Fernback (3 L) y Fermentador de 14 L, el medio usado para la producción de enzimas pectinolíticas fué compuesto por las siguientes especies químicas :

Reactivo	Concentración (%)
Cáscara de limón	3
Fosfato de Potasio Monobásico (K_2HPO_4)	0.05
Fosfato de Potasio Dibásico (KH_2PO_4)	0.05
Sulfato de Amonio ($(NH_4)_2SO_4$)	0.4

El pH se ajustó al deseado con ácido sulfúrico y posteriormente los matraces y fermentadores se esterilizaron a 121 °C durante 30 min.

3.4.3.- Preparación del Inóculo.

La cepa fue crecida en matraces Erlenmeyer con medio de agar papa dextrosa (PDA), incubándose a 37 °C durante 72 h. Posteriormente se realizó la cosecha de esporas; para lo cual, se utilizó agua destilada estéril y con una asa de siembra se raspo suavemente, hasta tener una densidad óptica de 5.0 a $\lambda = 540$ nm.

3.4.4.- Producción de Pectinasas en Matraz Fernback (3 L).

Matraces Fernback (3 L) con 1L del medio de producción de pectinasas (ya mencionado), fueron inoculados con 20 mL de la suspensión de esporas y fueron incubados a 37 °C en un agitador rotatorio (New Brunswick Scientific Co.) a 200 r.p.m. Durante el transcurso de la fermentación se tomaron muestras de aprox. 20 mL, las cuales se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 15 minutos. Al sobrenadante se le determinó actividad pectinolítica (endo y exo) y proteína extracelular.

3.4.5.- Influencia del pH Inicial sobre la Producción de Pectinasas en Fermentador (14 L).

Se utilizaron tres fermentadores de vidrio de 14 L (Labroferm, New Brunswick Scientific Co.). Se trabajó con un volumen total en cada fermentador de 10 L del medio de producción de pectinasas. Para lo cual, se colocaron las sales inorgánicas y la fuente de nitrógeno (referidas a 10 L) en 2 L de agua de la llave. Por otra parte la cáscara de limón (referida a 10 L) se colocó en 9 L de agua de la llave. Con el fin de saber el efecto del pH inicial sobre la producción de las enzimas mencionadas; posteriormente se ajustó el pH con ácido sulfúrico de tal manera que después de llevar a cabo la esterilización a 121 °C por 30 min, se obtuviera el pH inicial a probar (2.0, 2.5, 2.8, 3.0, 3.2 y 3.5). Una vez mezcladas ambas partes en el fermentador, se inoculó cada fermentador, con 1L de inóculo de 24 h. Este último se preparó de la misma forma que la producción de pectinasas en matraz Fernback (3 L), únicamente con 24 h de fermentación. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 37 °C, con agitación de 200 rpm y suministro de aire de 10 L/min a una presión de 1.05 kg/cm². Durante la fermentación se tomaron muestras de aprox. 100 mL en forma aséptica, de las cuales se tomó 20 mL y se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min. En el sobrenadante se

determinó la proteína extracelular y actividad pectinolítica (endo y exo). Al volúmen sobrante de cada muestra se le determinó su densidad aparente y su contenido de sólidos totales.

3.5.- Determinación de la actividad pectinolítica.

Las determinaciones fueron realizadas a los filtrados libres de células, obtenidos de centrifugar las muestras a 3500 rpm por 15 min.

3.5.1.- Actividad pectinolítica por grupos reductores(Exo-Pectinolítica).

Consiste en cuantificar el incremento de grupos reductores solubles fotométricamente producidos por la acción de las pectinasas sobre la pectina, por el método del ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS) (Miller, 1956). El sistema de reacción contiene : 1 mL de solución de pectina al 0.9 %, 0.7 mL de buffer de acetatos 0.17 M, pH 5.0. Los tubos de ensayo con la solución fueron preincubados, en baño María, a 45 °C por 5 min. Después se adicionaron 0.3 mL del filtrado correspondiente, exceptuando los blancos y se incubaron a 45 °C durante una hora. La reacción se detuvo por adición de 3.0 mL de reactivo de DNS, se mantuvo a ebullición durante 5 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionó agua destilada hasta completar 20 mL. Antes de leer densidad óptica (D.O) a $\lambda = 550$ nm, las muestras fueron centrifugadas a 3500 r.p.m. por 15 min. Se leyó la D.O en un espectrofotómetro Baush & Lomb. La concentración de grupos reductores se calculó a partir de una curva estandar de ácido galacturónico. La actividad se expresó como mg de azúcares reductores por mL de filtrado.

3.5.2.- Actividad pectinolítica por viscosimetría (Endo-Pectinolítica).

La actividad se determinó cuantificando la reducción de la viscosidad de una solución de pectina, ocasionado por la acción de las pectinasas sobre los enlaces glicosídicos α - (1 - 4) del polímero. En este método se empleo un viscosímetro tipo Cannon-Fenske tamaño 200, sumergido en un baño de agua con circulación continua y a una temperatura constante de 30 °C. El sistema de reacción esta formado por 10 mL de pectina al 1.0 % en amortiguador de acetatos 0.016 N, con NaCl al 0.34 % ajustado a pH = 4.2; esta mezcla de reacción se incubó 10 min a 30 °C. Al tiempo cero se adicionaron 0.5 mL del filtrado libre de células, se agitó

rápida y inmediatamente se adicionó por el tubo ancho al viscosímetro y se aplicó succión por el tubo angosto hasta que la solución quedó por encima de la línea superior marcada en el viscosímetro. Se midió el tiempo de flujo de la solución al bajar por las líneas superior e inferior. Esta operación se repitió 4 veces durante 10 min de tiempo total de reacción. El blanco del sustrato y del agua se prepararon adicionando a un tubo 10 mL de la solución de pectina más 0.5 mL de agua destilada respectivamente y se realizó la operación anteriormente descrita obteniendo el tiempo de flujo promedio. Para calcular el cambio en fluidez relativa de cada muestra, se calcularon en principio los valores de fluidez relativa y de tiempo de reacción a partir de las siguientes ecuaciones :

$$F_r = (T_s - T_w) / (T_t - T_w)$$

$$T_n = (T_t / 120) + T_r$$

Donde :

F_r = Fluidez relativa para cada tiempo de reacción.

T_s = Tiempo de flujo promedio del blanco de sustrato, en segundos.

T_w = Tiempo de flujo promedio del blanco de agua, en segundos.

T_t = Tiempo de flujo de la mezcla de reacción, en segundos.

T_r = Tiempo de reacción desde la adición de la enzima al sustrato hasta cada inicio de la medición del tiempo de flujo, en minutos.

T_n = Tiempo de reacción más la mitad del tiempo de flujo, en minutos.

Para calcular el valor de la actividad pectinolítica, se grafican los valores de la fluidez relativa en las ordenadas y de los tiempos de reacción en las abcisas, la pendiente de la línea recta obtenida corresponde al cambio de la fluidez relativa por minuto.

3.6.- Determinación de proteína extracelular.

Esta determinación se realizó en el filtrado libre de células, una vez dializado en membranas de celulosa con un corte de 12,000 daltons contra agua a 4 °C, durante 48 h y con agitación. Se determinó la proteína en alícuotas de 0.5 mL y llevando a volumen de 1 mL con agua destilada, por una modificación del método de Lowry (Lowry, 1956).

3.7.- Procesos de recuperación y concentración de pectinasas.

3.7.1.- Separación de sólidos insolubles del medio fermentado utilizando una centrifuga de laboratorio Wifug.

Este trabajo se realizó con el fin de tener un control de separación de sólidos insolubles del medio fermentado y además nos permitiera evaluar que tan eficiente para este propósito era cada una de las operaciones unitarias utilizadas en la recuperación de pectinasas. Para esta prueba se empleo una centrifuga de laboratorio de la marca Wifug con las siguientes condiciones de operación : 5000 r.p.m. durante 15 minutos. Se colocaron 10 mL del medio fermentado en un tubo para este tipo de centrifuga (puesto previamente a peso constante en una estufa felisa a una temperatura de 80 °C). Se colocaron seis tubos con el medio en la centrifuga, de tal manera que el sistema estuviera equilibrado en peso y se centrifugaron bajo las condiciones descritas. Una vez transcurrido el tiempo de operación se separó el sobrenadante del tubo, por decantación. El tubo con los sólidos sedimentados se pesaron y por diferencia de peso (peso del tubo a peso constante — peso del tubo más sólidos sedimentados) se calcularon los sólidos separados ó sedimentados en base húmeda. Se tomó una muestra de éstos sólidos y se determinaron los sólidos separados en base seca. Se obtuvo un promedio de las seis determinaciones realizadas tanto en base húmeda como en base seca. Estos resultados se relacionaron con el total de sólidos presentes en el medio fermentado (determinadas por densitometría y en base seca) para cuantificar la eficiencia de separación de esta técnica. Este valor determinado de eficiencia fue considerado como nuestro 100 % de eficiencia de separación de sólidos al tomarse como control, para las etapas de recuperación de pectinasas que se probaron. Finalmente se empleó una muestra del sobrenadante separado para medir los sólidos residuales y la actividad pectinolítica (endo y exo).

3.7.2.- Separación de sólidos insolubles del medio fermentado utilizando una centrifuga de canasta.

Para este estudio se utilizó una centrifuga provista de una canasta de lona como medio filtrante (con diámetro de poro variable). Se manejaron diferentes volúmenes de alimentación (3, 5, 10, 15, 20 y 30 litros) del medio fermentado a la centrifuga de canasta, con la finalidad de determinar la capacidad de eliminación de sólidos insolubles de esta operación y su influencia sobre la actividad pectinolítica; para lo cual se caracterizó, tanto el caldo clarificado (medición de sólidos residuales y actividad pectinolítica) como los sólidos separados en la canasta (cuantificación de sólidos separados en base húmeda y base seca).

Centrifuga de canasta.

Marca y modelo : Centrifuga extractora 305 SPQ, Mexicana de maquinaria S.A de C.V.

Condiciones de operación.

Medio filtrante de la canasta : Lona

Velocidad de operación : 2100 r.p.m..

Volumen de alimentación : especificado en cada proceso.

Flujo de alimentación : especificado en cada proceso.

Temperatura de trabajo : Temperatura ambiente ($\approx 28^{\circ}\text{C}$)

3.7.3.- Evaluación de la capacidad de separación de sólidos insolubles de diversos medios filtrantes.

Los medios filtrantes utilizados fueron : mallas sintéticas (nylon 615 μ , poliéster 150 μ , polipropileno 300 μ y 800 μ) y telas metálicas (No : 30, 40, 80 y 150). Estas se probaron para determinar el comportamiento en la filtración de un medio fermentado con actividad pectinolítica y así poder seleccionar aquellos materiales más eficientes en la separación de sólidos insolubles. Posteriormente éstos materiales seleccionados se probaron en la centrifuga de canasta para tratar de aumentar el rendimiento de separación de sólidos del cultivo fermentado. Para éste propósito se implementó un sistema de filtración que consistió de un matraz

kitasato (6 L) conectado al vacío (Presión de vacío . 100 mm Hg) y al cual se le colocó un filtro Buchner provisto del medio filtrante de interés (círculo del medio filtrante con diámetro de 11.3 cm y area de 1m²). Al iniciar la filtración se abrió el sistema de vacío, se homogeneizó perfectamente el volumen de alimentación del extracto crudo y se fue adicionando lentamente através del embudo. Los sólidos eliminados se separaron del medio filtrante y se cuantificaron en base húmeda y seca. Posteriormente el líquido clarificado (filtrado) se caracterizó, determinando sólidos residuales, actividad pectinolítica (endo y exo) y proteína total. Cada corrida se repitió por triplicado para tomar un promedio de las mismas. Para la selección del medio filtrante se tomó en cuenta la capacidad de filtración, la calidad del clarificado, el costo del medio, mantenimiento, maleabilidad y su disponibilidad en el mercado.

3.7.4- Estudio de la funcionalidad de algunos medios filtrantes en unacentrífuga de canasta.

La centrífuga de canasta una vez caracterizada, se determinó principalmente el volumen de alimentación óptimo (20 L) para lograr una eficiente separación de sólidos en un tiempo de proceso razonable. Se estudiaron varios materiales filtrantes de los cuales, se seleccionaron bajo los criterios ya mencionados : poliéster 150 μ y 300 μ y mallas metálicas del No 16 y 20. Considerando éstos resultados obtenidos experimentalmente, se procedió a implementar un sistema de centrifugación-filtración que nos permitiera aumentar la eficiencia de separación de sólidos insolubles del cultivo crudo en las primeras etapas de recuperación de pectinasas. Este tipo de centrífuga esta provista de una " bolsa " ó canasta normalmente de un tejido de lona (diámetro de poro variable). Para esta etapa experimental se elaboraron canastas de los dos materiales seleccionados y se analizó su comportamiento en la centrífuga de canasta. Se estudiaron de manera individual, alimentando un volumen constante de 20 L del cultivo fermentado. Se determinaron los sólidos separados en base húmeda y base seca y se relacionaron con los resultados correspondientes obtenidos del control (centrífuga de laboratorio Wifug, 5000 r.p.m., t = 15 min.) para calcular la eficiencia de separación de sólidos. Al filtrado se le determinó sólidos residuales y actividad pectinolítica (endo y exo). Por último se seleccionó el sistema centrifugación-medio filtrante más eficiente en la separación de sólidos para utilizarse posteriormente junto con otras operaciones unitarias para el procesamiento y recuperación de

pectinasas, con el objeto de obtener un concentrado final con dicha actividad.

3.7.5.- Determinación de la capacidad de separar sólidos por medio de la floculación de éstos, utilizando diferentes tipos de floculantes comerciales (aniónicos, catiónicos y no iónicos).

Para efectuar las pruebas se uso un vaso de precipitado de 200 mL, en el cual se tomó una muestra del medio fermentado (100 mL). Se fijó un sistema de agitación magnética a baja velocidad que permitiera solo una homogeneidad en el ensayo. Después se adicionó lentamente a los vasos 0, 5, 10, 15, 20 y 100 ppm del floculante a probar, se dejó actuar éste por 10 minutos; una vez transcurrido éste tiempo, se apaga el agitador, se deja tres minutos más en reposo la solución y se mide el volumen sedimentado, el cual corresponde a los flóculos insolubles formados por el agente. En seguida se mide el volumen de compactación, para lo cual, se manejan 10 mL en un tubo de centrifuga de la suspensión a la cual se le determinó el volumen sedimentado y se centrifuga a 5000 r.p.m. por 5 min. El volumen de compactación corresponde a los sólidos insolubles precipitados en el tubo y se reportan una vez medidos por diferencia de peso y restado el valor de sólidos precipitados por la operación de centrifugación sola (muestra sin floculante) como sólidos separados en base húmeda. Posteriormente se emplea una muestra de éstos sólidos para cuantificar los sólidos separados en base seca, simplemente secando dicha muestra en un estufa felisa a una temperatura de 80 °C. Una alícuota del sobrenadante separado fue ocupada para determinación de sólidos residuales bajo las mismas condiciones de secado que en el caso anterior. Con lo que respecta a la influencia de éstos agentes sobre la actividad pectinolítica se determinó dicha actividad antes y después de aplicar el floculante y observando y midiendo las variaciones presentes. Por último se seleccionó el mejor floculante en base a su eficiencia de separación ó floculación de sólidos, su repercusión sobre la actividad de interés, precio y disponibilidad del mismo; con el objetivo de aplicarse en una secuencia de etapas de recuperación de pectinasas de un cultivo fermentado.

3.7.6.- Implementación de una metodología de recuperación y concentración de pectinasas de un extracto crudo.

Se realizaron varios procesos de separación y concentración de los biocatalizadores de interés, en donde se utilizaron diferentes operaciones unitarias que involucraron equipos disponibles en la planta con la finalidad de obtener un producto concentrado con actividad pectinolítica. El diseño de los procesos de los procesos de obtención de tales enzimas fue realizado considerando los resultados de las técnicas de recuperación caracterizadas previamente. Se llevó a cabo un seguimiento de eliminación de sólidos, sólidos residuales, actividad pectinolítica (endo y exo) y proteína total entre etapa y etapa de recuperación con el objeto de ir evaluando la eficiencia de recuperación y concentración de pectinasas en cada una de las etapas y al final del proceso poder obtener un rendimiento del producto de interés; lo cual nos permitió evaluar de manera importante la funcionalidad y calidad de cada uno de los procesos realizados.

Las condiciones manejadas en cada uno de los equipos empleados se mantuvieron constantes en todos los procesos probados y estas fueron las siguientes :

Centrífuga de canasta.

Marca y modelo : Centrífuga extractora 305 SPQ, Mexicana de maquinaria S.A de C.V.

Condiciones de operación.

Medio filtrante de la canasta : Poliéster 150 μ .

Velocidad de operación : 2100 r.p.m.

Volumen de alimentación : especificado en cada proceso.

Flujo de alimentación : especificado en cada proceso.

Temperatura de trabajo : Temperatura ambiente (≈ 28 °C)

Centrífuga de discos.

Marca y modelo : Westfalia separator SAOH 205 , AG. Oelde / Alemania.

Condiciones de operación.

Velocidad de operación : 4200 r.p.m.

Volumen de alimentación : especificado en cada proceso.

Flujo de alimentación : especificado en cada proceso.

Temperatura de trabajo : Temperatura ambiente ($\approx 28\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Evaporador rotatorio al vacío.

Marca y modelo : CENTRI-THERM CT-1B-2, Alfa laval, Sweden.

Condiciones de operación.

Temperatura de entrada del vapor al evaporador : $120\text{ }^{\circ}\text{C}$

Temperatura de salida del vapor del evaporador : $30\text{ }^{\circ}\text{C}$

Temperatura de evaporación del extracto crudo clarificado dentro del evaporador : $30\text{ }^{\circ}\text{C}$

Temperatura en la salida del evaporador : $34\text{ }^{\circ}\text{C}$

(Temperatura de salida del extracto crudo clarificado del evaporador)

Presión de evaporación : 60 cm Hg.

Secador.

Modelo y marca : PRODUCTION MINOR de NIRO ATOMIZER

Condiciones de operación.

Temperatura de alimentación al secador : $130\text{ }^{\circ}\text{C}$

Temperatura de salida del secador : $85\text{ }^{\circ}\text{C}$

Gasto de aire de secado : 380 Kg/h

Velocidad del disco atomizador : 15 000 r.p.m.

Se estudiaron y analizaron cinco procesos de recuperación de pectinasas empleando las siguientes secuencias de operaciones unitarias :

1er. Proceso :

- a) Centrifugación : Centrífuga de canasta.
- b) Secado : Atomizador.

2do. Proceso :

- a) Centrifugación : Centrífuga de canasta.
- b) Evaporación : Evaporador rotatorio a vacío.
- c) Secado : Atomizador.

3er. Proceso :

- a) Centrifugación : Centrífuga de canasta.
- b) Centrifugación : Centrífuga de discos.
- c) Secado : Atomizador.

4to. Proceso :

- a) Centrifugación : Centrífuga de canasta.
- b) Centrifugación : Centrífuga de discos.
- c) Evaporación : Evaporador rotatorio a vacío.
- d) Secado : Atomizador.

5to. Proceso.

- a) Centrifugación : Centrífuga de canasta.
- b) Floculación : Floculante catiónico Mafloc-861.
- c) Centrifugación : Centrífuga de discos.
- d) Secado : Atomizador.

3.7.7.- Evaluación de la eficiencia de separación y concentración de sólidos de las operaciones unitarias empleadas (centrifugación, filtración y floculación)

3.7.7.1.- Caracterización del medio fermentado, del cultivo clarificado y de los sólidos separados de cada etapa.

3.7.7.1.1.- Determinación de la densidad aparente del extracto crudo.

Esta medición se realizó por un método volumétrico-gravimétrico al medio de cultivo, una vez terminado el tiempo de fermentación (120 h). Para lo cual se

tomó por triplicado una muestra de 20 mL de líquido filtrado en una probeta graduada, esta probeta se pesó seca sin muestra y después con muestra la diferencia de pesos fue dividida entre el volumen de la muestra para encontrar su relación masa/volumen y considerando la temperatura del ensayo (T ambiente).

3.7.7.1.2.- Cuantificación de sólidos totales del extracto crudo.

Se obtuvo de la siguiente manera : se tomaron tres muestras de 10 mL de volumen del medio fermentado, estos se colocaron en cajas petri de vidrio (previamente puestas a peso constante), se pesaron y posteriormente se secaron en una estufa Felisa a 80 °C, hasta registro de peso constante en balanza analítica. Para los cálculos se consideró la diferencia de pesos en un inicio y al final del secado y el volumen empleado de la muestra.

3.7.7.1.3.- Medición de sólidos separados en base húmeda del medio fermentado.

Se midieron, separando los sólidos retenidos en el medio filtrante después de llevar a cabo la centrifugación ó filtración según el caso y se pesaron en una balanza granataría.

3.7.7.1.4.- Cuantificación de sólidos separados en base seca del medio fermentado.

Una vez cuantificados los sólidos separados en base húmeda; se tomaron tres muestras de 10 g de estos sólidos y se llevaron a sequedad en una estufa Felisa a 80 °C, hasta obtener el peso constante de las muestras. Se calculó el promedio de sólidos en base seca, considerando los valores obtenidos de las tres muestras por diferencia de peso.

3.7.7.1.5.- Determinación de sólidos residuales.

Se tomaron tres muestras de 10 mL de volumen de filtrado ó centrifugado, estos se colocaron en cajas petri de vidrio (previamente puestas a peso constante), se pesaron y posteriormente se secaron en una estufa Felisa a 80 °C, hasta registro de peso constante en balanza analítica. Para los cálculos se consideró la

diferencia de pesos en un inicio y al final del secado y el volumen empleado de filtrado ó centrifugado según el caso.

3.7.7.1.6.- Medición de la acción de flocculantes sobre la separación de sólidos del medio fermentado.

Para efectuar las pruebas se usaron vasos de precipitado (200 mL), en los cuales se tomaron muestras del medio fermentado (100 mL). Se fijó un sistema de agitación magnética a baja velocidad que permitiera una homogeneidad en el ensayo. Después se adicionó lentamente a los vasos 0, 5, 10, 15, 20 y 100 ppm del flocculante y se deja actuar este por 10 min. Una vez transcurrido este tiempo de acción del flocculante se apaga el agitador y se mide el volumen sedimentado, el cual corresponde a los flóculos insolubles formados por el agente. Finalmente se mide el volumen de compactación, para lo cual, se toman 10 mL en un tubo de centrifuga, de la suspensión a la cual se le midió el volumen sedimentado y se centrifuga a 5000 r.p.m. por 5 min. El volumen de compactación corresponde a los sólidos insolubles precipitados en el tubo.

3.7.7.1.7- Determinación de humedad al concentrado sólido con actividad pectinolítica obtenido.

Se peso 2 g de los sólidos con actividad pectinolítica obtenidos del secado por atomización, en una caja petri de vidrio previamente puesta a peso constante. Se seco la muestra en una estufa Follisa a 80 °C, hasta el registro de peso constante. Finalmente se calculo el contenido de húmeda por diferencia en el peso de la muestra y se reporto en %. Este ensayo se realizó por triplicado para cada muestra encontrando un valor promedio de la humedad determinada.

$$\%H = \frac{A - B}{M} \times 100$$

A = Peso de la caja petri más la muestra.

B = Peso de la caja petri más la muestra después de secar a la estufa.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados obtenidos se presentan en tres etapas. La primera enfocada a la producción de pectinasas; en donde se evaluó la influencia del pH inicial de fermentación sobre la producción de pectinasas, proteína y crecimiento (biomasa) por fermentación sumergida. Estos ensayos se realizaron con el fin de encontrar el pH inicial, que nos permitiera obtener, la mayor cantidad de enzimas pécticas indispensables para realizar los estudios posteriores de recuperación y concentración.

El proceso de caracterización del extracto crudo se describe en la segunda etapa e involucra la determinación de sólidos totales, actividad pectinolítica (endo y exo) y proteína total. Esta etapa también incluye el estudio y evaluación de la capacidad de separación de sólidos insolubles de una centrifuga de canasta, de diversos medios filtrantes y floculantes comerciales; observando además su influencia en la actividad pectinolítica presente en el caldo fermentado. Esta fase es de suma importancia pues nos permitió seleccionar flujos de alimentación adecuados (en el caso de la centrifuga de canasta), los medios filtrantes y floculantes más eficientes para el propósito estudiado. Por último, la tercera parte concernió a la aplicación del medio filtrante y del floculante de mayor eficiencia de separación de sólidos, a un proceso global de recuperación enzimática, utilizando además otras operaciones unitarias, tales como : centrifugación, evaporación y secado. Se implementaron diversas metodologías de recuperación y concentración de pectinasas, hasta la obtención de un concentrado sólido con la actividad pectinolítica. Se analizó el efecto de cada una de las etapas, en la separación de sólidos, recuperación de actividad pectinolítica y en la concentración de proteína total. Finalmente se seleccionó la metodología más eficiente para la obtención de enzimas pécticas, considerando los parámetros mencionados.

4.1.- Influencia del pH Inicial de fermentación sobre la producción de pectinasas por *Aspergillus sp.*

Con el fin de estudiar el efecto del pH sobre la producción de dichas enzimas por *Aspergillus sp.* se llevaron a cabo una serie de fermentaciones, ajustadas a diferentes pH 's iniciales (2.0 a 3.5), en fermentadores de 14 litros. Los resultados de los parámetros determinados : actividad pectinolítica, biomasa y

proteína total, se muestran en las figuras 4.1 y 4.2. En la gráfica de influencia del pH inicial sobre la producción de pectinasas (Figura 4.1), se observa que con un pH inicial de 2.8, la actividad determinada por viscosimetría durante las primeras 72 horas fue muy cercana a la que se obtuvo a pH's iniciales de 2.5, 3.0 y 3.2, mientras que a valores de pH muy lejanos de 2.8 (2.0 y 3.5), se obtuvo una baja producción de actividad endopectinolítica. Después de este tiempo se observó que la actividad, en la fermentación con pH inicial de 2.8, se siguió produciendo rápidamente y de manera importante hasta alcanzar su valor máximo (80 U / mg Pr- / min ó 72 U / mL) a las 120 horas, lo cual corresponde a un 19 % y 66 % más, de la actividad obtenida con pH's iniciales de 2.5 y 3.5 respectivamente. Al final de la fermentación (144 horas) se registró en todos los casos, una ligera disminución en la producción de actividad, debido probablemente a degradación proteolítica de endo-pectinasas. Se logro incrementar en 12 veces más la actividad endo-pectinolítica producida por *Aspergillus sp* en fermentación sumergida (6 U / mL) utilizando como fuente de carbono pulpa de henequén (Saval, 1985). Esta mejoría importante en la producción de pectinasas además de deberse a las condiciones óptimas encontradas de pH; el efecto inductor de la naturaleza química de la pectina y su disponibilidad presente en el sustrato (cáscara de limón) es reportado que puede influir de manera significativa en tal suceso (Solis, 1988).

En la curva de crecimiento y producción de pectinasas por *Aspergillus sp* utilizando un pH inicial = 2.8 (Figura 4.2), no se observó un fase de adaptación (latencia), lo que indica que el microorganismo se adaptó rápidamente a las condiciones del medio. El microorganismo creció rápidamente alcanzado la máxima producción de biomasa (25 g/L) a las 120 horas, para posteriormente declinar (23 g/L) al final de la fermentación (144 horas).

La producción de actividad endo-pectinolítica y proteína extracelular, fue asociada al crecimiento y presentado un comportamiento cinético similar a este. La producción de pectinasas podría pensarse que debería estar asociada al crecimiento asumiendo de que necesita estas enzimas para hidrolizar el sustrato (cáscara de limón) y obtener su fuente de carbono. En las primeras 48 horas de fermentación prácticamente no se observa una producción de pectinasas, pero sin embargo, se detectó un crecimiento significativo, esto podría deberse a la presencia de oligosacáridos de bajo peso molecular, presentes en el medio (provenientes del sustrato y también por hidrólisis del mismo durante el proceso de esterilización) suficientes para satisfacer sus necesidades de crecimiento durante este período: pero cuando la concentración de éstos se ve limitada, el

microorganismo se ve obligado a producir enzimas pécticas capaces de hidrolizar el sustrato. Es por eso que se observó una aparición importante de actividad pectinolítica a las 72 horas de fermentación y esta se incremento notablemente en el transcurso de la fermentación. La mayor actividad específica (80 U / mg Pr- / min) se presenta a las 120 horas de fermentación y posteriormente se ve un decremento en las curvas de actividad, biomasa y proteína, probablemente debido a una actividad proteolítica generalizada.

Los resultados obtenidos muestran un efecto importante del pH sobre la producción de endo-pactinasas por *Aspergillus sp* y se encontro que los mejores rendimientos se obtienen a un pH=2.8. Estos datos concuerdan con las observaciones realizadas por algunos autores (Savai, 1985; Tuttobello, 1961) quienes encontraron una mayor producción de estas enzimas a valores bajos de pH.

Para los estudios posteriores de recuperación y concentración enzimática, se detuvo la fermentación a las 120 horas, tiempo en donde se encontró la mayor producción de actividad endo-pectinolítica.

Influencia del pH inicial sobre la producción de pectinasas por *Aspergillus sp.*

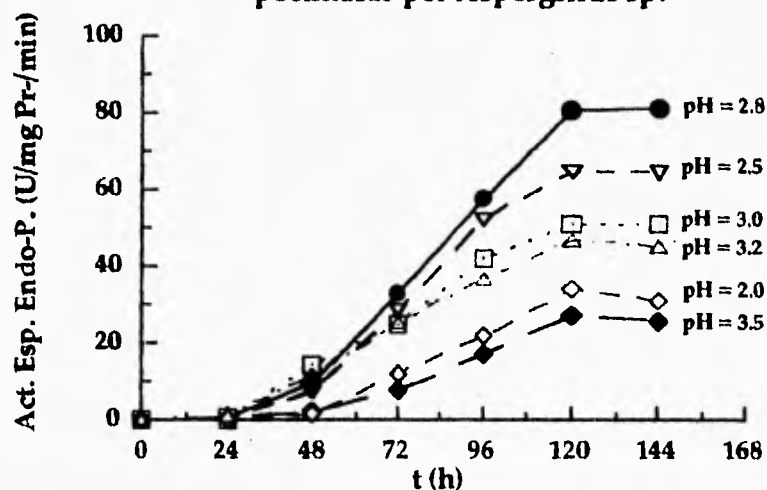


Fig. 4.1. Efecto del pH inicial sobre la producción de pectinasas por *Aspergillus sp.* en fermentadores de 14 litros .

Medio : cáscara de limón 3 %, sulfato de amonio 0.4 %, fosfato de potasio monobásico y dibásico al 0.05 % y agua de la llave.

Condiciones :

El pH inicial se ajusto con ácido sulfúrico a 2.0, 2.5, 2.8, 3.0, 3.2 y 3.5.

Temperatura : 37 °C. Agitación : 200 r.p.m.

Aeración : 10 litros de aire x min⁻¹.

La actividad específica reportada se define como el cambio de fluidez originado por mg de proteína por minuto.

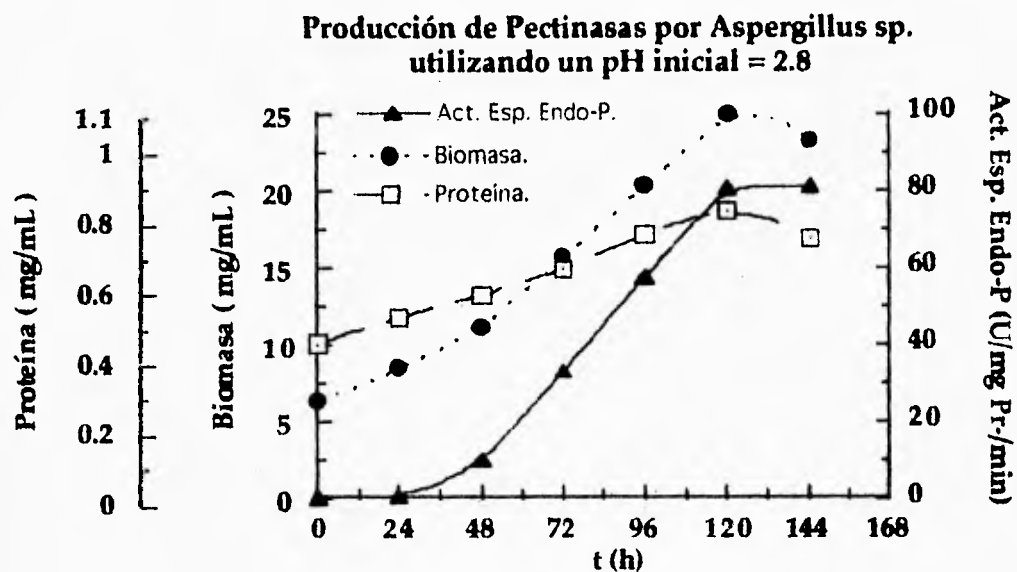


Fig. 4.2. Producción de pectinasas por *Aspergillus sp.* en fermentadores de 14 litros .

Medio : cáscara de limón 3 %, sulfato de amonio 0.4 %, fosfato de potasio monobásico y dibásico al 0.05 % y agua de la llave.

Condiciones :

El pH inicial se ajusto con ácido sulfúrico a 2.8.

Temperatura : 37 °C. Agitación : 200 r.p.m.

Aeración : 10 litros de aire x min⁻¹.

La actividad específica reportada se define como el cambio de fluidez originado por mg de proteína por minuto.

4.2.- Procesos de recuperación y concentración de pectinasas.

El objetivo principal en la primera etapa de recuperación de enzimas extracelulares es la eliminación de las partículas sólidas en suspensión, células microbianas y micelio, mediante alguna técnica de separación sólido-líquido como : centrifugación, filtración ó floculación. Estas operaciones unitarias se analizaron de manera individual , alternada y secuencial con la finalidad de encontrar un proceso convencional de separación de pectinasas que nos permitiera obtener un concentrado con la actividad enzimática de interés.

4.2.1.- Caracterización del extracto crudo.

A la suspensión obtenida al final de la fermentación (120 h) ó extracto crudo se le determinó su densidad aparente y su contenido de sólidos totales. Los promedios de los resultados, son los siguientes :

Densidad aparente (extracto crudo) 25°C = 1.2513 – 1.0160 g/mL

Sólidos Totales (base seca) : 0.1247 – 0.1013 g/mL

Se cuantificó además, la actividad endo y exo-pectinolítica (con especial interés en la act. endo-pectinolítica por su importancia comercial) y la proteína total del medio fermentado (especificadas en cada caso), con la finalidad de tener estos parámetros iniciales de referencia e ir evaluando la eficiencia de separación de sólidos y concentración de pectinasas de cada una de las operaciones unitarias probadas.

4.2.2.- Separación de sólidos insolubles del medio fermentado (extracto crudo) utilizando una centrifuga de laboratorio Wifug.

Una vez caracterizado el extracto crudo, se procedió a determinar la capacidad de remoción de sólidos de la centrifuga mencionada (5000 r.p.m., 15 min.). Con el fin de ser nuestro control y marco de referencia en la separación de sólidos insolubles de las técnicas de remoción de sólidos estudiadas.

Los resultados son presentados en la Tabla 4.1, y podemos observar que este equipo puede eliminar un 37 % del total de sólidos insolubles (base seca) presentes en el medio fermentado, sin modificar la actividad pectinolítica presente. Estos datos mostrados fueron tomados como parámetros de control, para evaluar la eficiencia de separación de sólidos insolubles de cada una de las técnicas de recuperación estudiadas.

Tabla 4.1. Remoción de sólidos insolubles de una Centrífuga de laboratorio Wifug.

Sólidos base húmeda	Separados base seca	Sólidos base húmeda	Separados base seca	Sólidos base	Residuales seca	Eficiencia Separación Sólidos base seca
[g/L]	[g/L]	[%]	[%]	[g/L]	[%]	[%]
337.3	13.25	26.96	37.69	31.21	62.30	100

4.2.3.- Separación de sólidos insolubles del extracto crudo utilizando una Centrífuga de Canasta.

Se manejaron diferentes volúmenes de alimentación del extracto crudo al equipo mencionado y se operó bajo las condiciones descritas previamente. Los resultados son presentados en la Figura 4.3. Se encontró que las bajas eficiencias de separación de sólidos (E.S.S) se presentaron cuando se utilizaron bajos volúmenes de alimentación, así la menor correspondió a 3L de extracto crudo (29 %) mientras que la mayor E.S.S se observó a 30L (82 %). Este comportamiento se puede deber a que conforme se va aumentando el volumen del extracto crudo se van acumulando de manera importante en el medio filtrante los sólidos separados, formando capas, las mismas que actúan como una especie de "ayuda filtro", reteniendo y ayudando a tener una mayor separación de sólidos (aún de menor tamaño a los que originalmente podrían atravesar el medio filtrante) y un valor menor de sólidos residuales en el líquido clarificado. Esta formación de capas filtrantes involucran además de una mayor eliminación de sólidos insolubles un tiempo de operación mayor (tiempo de operación : 95 min., para $V_{\text{alimentación}} = 30$ L), factor que en la mayoría de los procesos es limitante en términos económicos y sobre todo no es recomendado en el manejo de productos biológicos (enzimas)

por su susceptibilidad a factores ambientales como : temperatura, pH, O₂, inhibidores enzimáticos y al ataque proteolítico.

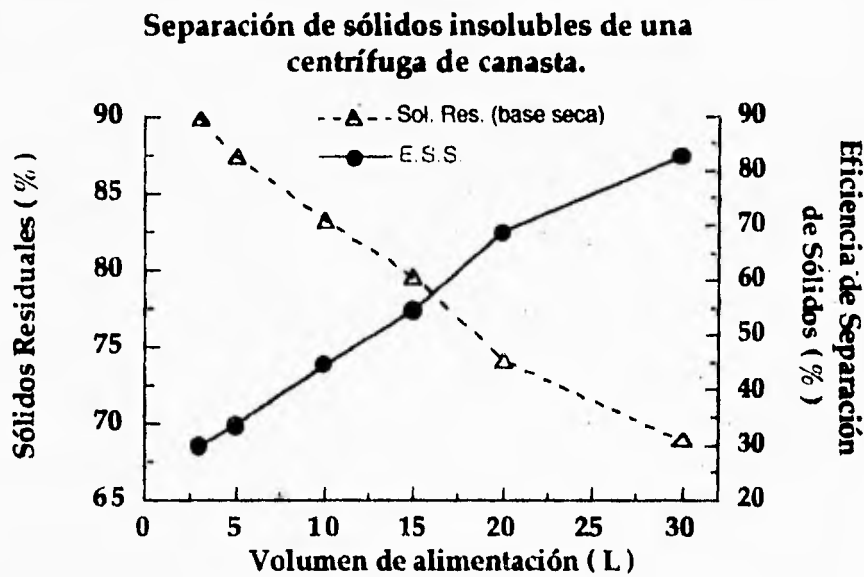


Fig. 4.3. Eficiencia de remoción de sólidos insolubles de una centrifuga de canasta.

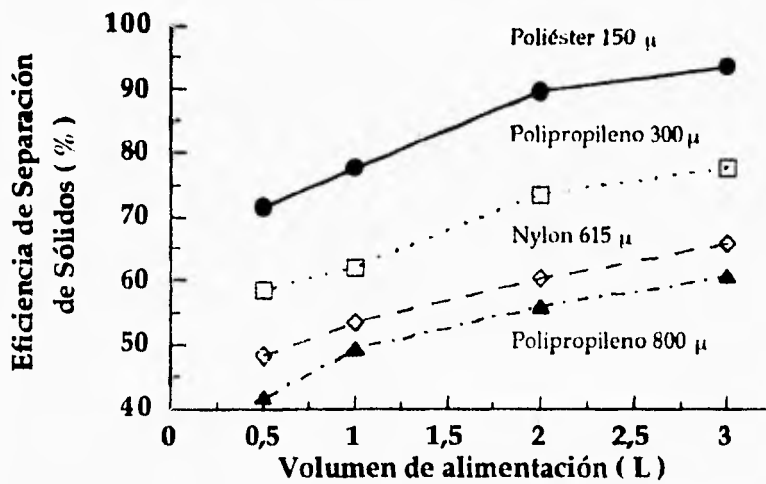
También se pudo apreciar un efecto de concentración de las pectinasas, lo cual se detecta de manera importante cuando se manejan altos volúmenes de alimentación (20 y 30 L) pues se elimina una mayor cantidad de sólidos y se registra un incremento de actividad superior a 5 U/mL (Act. Endo-Pinai - Act. Endo-Pinical), después del proceso de centrifugación. Finalmente se seleccionó como volumen de alimentación para esta etapa 20 litros de extracto crudo, considerando que a este volumen se tiene una buena remoción de sólidos (E.S.S = 68 %) y un tiempo de operación razonable (t = 50 min.). Esta selección se realizó por que esta técnica se utilizó en conjunto con medios filtrantes para aumentar la eficiencia de separación de sólidos de esta etapa y emplearse finalmente junto con otras operaciones unitarias, en un proceso global de recuperación y concentración de pectinasas.

4.2.4.- Capacidad de separación de sólidos insolubles de diversos medios filtrantes.

4.2.4.1- Eficiencia de separación de sólidos insolubles de mallas sintéticas.

Los resultados de la capacidad de separación de sólidos de los medios filtrantes estudiados (Figura 4.4), muestran una tendencia de remoción de sólidos muy parecida, en el sentido, de que al ir aumentando el volumen de alimentación en la filtración se va aumentando la eficiencia de separación de sólidos en el extracto y la disminución marcada en el porcentaje de sólidos residuales en el clarificado, esto se presenta por la posible formación de capas (por acumulación de los sólidos del cultivo separados) sobre el material filtrante. Este fenómeno se observa marcadamente cuando se manejaron volúmenes de extracto de 0.5 a 2 L; mientras que entre 2 y 3L no se observa una notable diferencia en la separación de sólidos, posiblemente por que llega un momento en la filtración, que las capas generadas (por la acumulación de sólidos separados) no son lo suficientemente importantes para eliminar una mayor cantidad de sólidos. De las cuatro mallas analizadas (Fig. 4.4) se observó que el polipropileno 800 μ , fue el medio filtrante que removió el menor porcentaje de sólidos del medio fermentado (E.S.S = 60 %, $V_{\text{alimentación}} = 3L$) en tanto que el poliéster 150 μ eliminó la mayor cantidad de estos (E.S.S = 93 %, $V_{\text{alimentación}} = 3L$). En forma global separó un 16 %, 27 % y 32 % más que los medios filtrantes : polipropileno 300 μ , nylon 615 μ y polipropileno 800 μ respectivamente, sin tener alguna influencia sobre la actividad endopectinolítica. Se seleccionó el poliéster 150 μ como el material filtrante adecuado para nuestros propósitos, por que presentó la mayor eficiencia de separación de sólidos, por sus buenas características de maleabilidad (es muy maleable en comparación al propileno, el cual presenta una rigidez importante, lo que dificulta su fácil moldeado y manejo), es de buena disponibilidad en el mercado y además su precio (N\$25.00 / m²) resulta ser menor que el propileno 800 μ (N\$29.00 / m²).

Capacidad de filtración de mallas filtrantes sintéticas.



Nota: La actividad endo-pectinolítica inicial (medio fermentado) no se vió alterada después del proceso de filtración.

Fig. 4.4. Eficiencia de eliminación de sólidos insolubles de mallas filtrantes sintéticas.

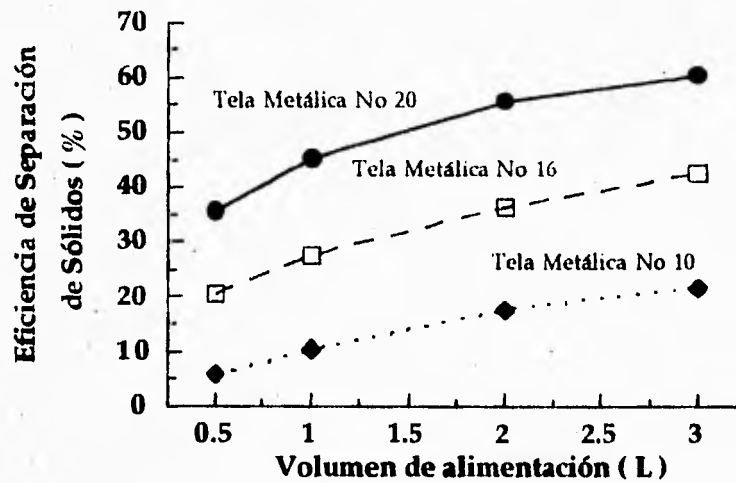
4.2.4.2- Remoción de sólidos insolubles de telas metálicas.

La tela metálica No 20 resultó ser la mejor en el proceso de filtración (Fig. 4.5), por su alta capacidad de separación de sólidos (E.S.S = 60.30 %, $V_{\text{alimentación}} = 3L$); en tanto que la tela metálica No 10 presentó los valores más bajos de eficiencia de separación de sólidos (E.S.S = 21.66 %, $V_{\text{alimentación}} = 3L$). En la Figura 4.5, se observa prácticamente el mismo comportamiento de la E.S.S que en el caso de filtración a través de mallas sintéticas, pues esta variable se incrementa conforme se va aumentando el volumen de alimentación en la operación; observándose marcadamente ó de manera proporcional la eliminación de sólidos a los volúmenes de alimentación de 0.5 a 2 L, mientras que cuando se manejó 3 L de extracto crudo, en todos los casos, la separación de sólidos fue mayor que la obtenida a 2 L, pero no variando en la misma proporcionalidad que

para los volúmenes inferiores (0.5 a 2L).

En términos generales la tela metálica No 20 separó un 18 % y 39 % más que las telas metálicas No 16 y No 10 respectivamente. Otras ventajas adicionales de estos medios filtrantes es su alta inocuidad hacia los productos biológicos, resistentes a las condiciones de pH y temperatura de los medios de fermentación, su fácil limpieza y manejo. Pero quizás la gran desventaja es su precio elevado (15 veces más, que el precio de una malla sintética del mismo calibre ó diámetro) y la falta del desarrollo de tecnologías que permitan utilizarlas en procesos continuos, pues normalmente se saturan de sólidos, lo cual obliga a parar la etapa, para descargar los sólidos y limpiar los filtros.

Capacidad de separación de sólidos insolubles insolubles de telas metálicas.



Nota : La actividad endo-pectinolítica inicial (medio fermentado) no se vio alterada después del proceso de filtración.

Fig. 4.5. Eficiencia de separación de sólidos insolubles de telas metálicas.

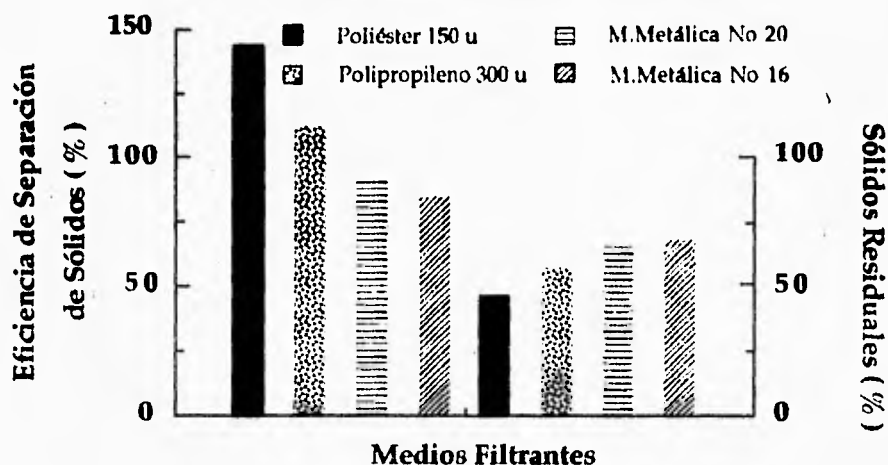
4.2.5.- Funcionalidad de algunos medios filtrantes en una centrífuga de canasta.

Una vez seleccionados los medios filtrantes (poliéster 150 μ , polipropileno 300 μ , malla metálica No 20 y No 16) más eficientes para la remoción de sólidos insolubles del extracto crudo; estos se probaron en una centrífuga de canasta, encontrando los resultados mostrados en la Figura 4.6. En esta se hace destacar que se logró aumentar la eficiencia de separación de sólidos de la centrífuga de canasta (para un volumen de 20 L y una canasta de lona; E.S.S = 68.60 %) desde un 16.5 % hasta un 74.7 % utilizando el mismo volumen de alimentación de extracto crudo y canastas de malla metálica No 16 y poliéster 150 μ respectivamente.

Otro punto importante que se encontró fue que el sistema de centrifugación-filtración que empleó polipropileno 300 μ y poliéster 150 μ , manifestaron una más alta eliminación de sólidos insolubles, que el obtenido por nuestro control : centrífuga de laboratorio Wifug (E.S.S = 100 %), siendo para cada caso la E.S.S de 112.6 % y 143.3 % respectivamente.

De los medios filtrantes estudiados, el poliéster 150 μ logró separar la mayor cantidad de sólidos (E.S.S = 143.3 %), representando este valor el 30.7 %, 57.7 % y 58.2 % más de sólidos eliminados del extracto crudo que los materiales filtrantes polipropileno 300 μ , malla metálica No 20 y No 16 respectivamente. También se logró incrementar la actividad endo-pectinolítica inicial del cultivo fermentado (70 U/mL) en 7 y 16 U/mL después del proceso de filtración utilizando la malla metálica No 16 (72 U/mL) y el poliéster 150 μ (86 U/mL). Además de su alta E.S.S, el poliéster 150 μ , seleccionó como el mejor medio filtrante para nuestros propósitos por su menor precio (N\$25.860 / m²) respecto a los demás evaluados (polipropileno 300 μ = N\$28.700 / m²), mientras que el precio de las mallas metálicas es 15 veces más que el de las mallas sintéticas), es de fácil disponibilidad, resistente a las condiciones (pH, T, etc.) presentes en el extracto crudo, alta maleabilidad, moldeado (formación de la canasta), manejo y limpieza. Este sistema centrífuga de canasta - poliéster 150 μ , se escogió también con el objetivo de emplearse junto con otras operaciones unitarias en un proceso global de separación y concentración de pectinasas para obtener un producto final con actividad pectinolítica.

Separación de sólidos insolubles de medios filtrantes utilizados en una centrifuga de canasta.



Nota : Volumen de alimentación = 20 L extracto crudo.

Fig. 4.6. Eficiencia de separación de sólidos insolubles de algunos medios filtrantes utilizados en una centrifuga de canasta.

4.2.6.- Capacidad de separación de sólidos de flocculantes comerciales.

Los resultados de la funcionalidad de estos agentes químicos, en la eliminación de sólidos, son presentados en la Tabla 4.2 y Figura 4.7. En esta figura se hace resaltar que los flocculantes catiónicos permitieron separar la mayor cantidad de sólidos y de acuerdo a su peso molecular, su capacidad de precipitación de sólidos se distinguió de manera importante, así los flocculantes de alto peso molecular presentaron los valores más altos de separación de sólidos, en seguida los de peso molecular medio y por último aquellos de peso molecular bajo. Dentro de los flocculantes catiónicos, Mafloc-861 (alto peso molecular), separó la mayor cantidad de sólidos (E.S.S = 57 %, utilizando 100 ppm) en tanto que Mafloc-837 (bajo peso molecular), fue el que eliminó la menor cantidad de sólidos (E.S.S = 19.48 %, utilizando 100 ppm). También se analizó el efecto de un agente

precipitante aniónico (L690-E2) y uno no iónico (POL EZ 652) en la floculación de sólidos del extracto crudo, encontrando que el primero precipitó sólidos únicamente cuando se utilizó a concentraciones superiores a 15 ppm, alcanzando su máxima eficiencia de remoción de sólidos a 100 ppm (E.S.S = 10.99 %), valor que corresponde aproximadamente a la mitad de lo separado por el floculante catiónico de menor eficiencia (Mafloc-837, de bajo peso molecular). El precipitante no iónico (POL EZ 652) no separó sólidos por precipitación a ninguna concentración utilizada de este (Tabla 4.2), lo cual pudo deberse a que al no presentar cargas parciales definidas (+ ó -) no puede interaccionar de manera efectiva con los sólidos presentes, restos celulares (que presentan una carga neta), etc., para formar agregados ó flóculos capaces de precipitar cuando estos llegan a ser inestables en solución por su tamaño ó carga neta principalmente. En la mayoría de los casos (con excepción del floculante no iónico) se vió incrementada la separación de sólidos a medida que se aumento la concentración del floculante en el extracto crudo, esto es debido a que se tiene un mayor número de " centros de formación " de flóculos . También se pudo observar que la actividad pectinolítica no fue afectada de manera importante por los precipitantes catiónicos ni por el no iónico, pues en todos ellos, cuando se emplearon en una concentración de 20 ppm, la recuperación de actividad pectinolítica fue superior al 95 %. Cuando se utilizaron estos, en una concentración de 100 ppm se observa en general una disminución significativa de la actividad pectinolítica (aproximadamente de 12 U/mL), lo cual se pudo deber a un efecto de dilución, con la solución del floculante adicionada (20 mL) al extracto crudo (100 mL). Para el caso del polímero aniónico L690-E2, se pudo apreciar una influencia marcada sobre la actividad pectinolítica, aún a bajas concentraciones (5 a 15 ppm) y aumentando drásticamente al utilizar 20 y 100 ppm, encontrando una disminución aproximada en actividad pectinolítica de 50 y 60 % respectivamente; lo cual puede explicarse por una inactivación ó precipitación de las enzimas pécticas con este agente.

Una vez determinada la eficiencia de separación de sólidos de los floculantes analizados, se seleccionó el floculante catiónico de alto peso molecular Mafloc-861, para utilizarse en un proceso global de recuperación de pectinasas junto con otras operaciones unitarias de separación y concentración, por su alta capacidad de separación de sólidos, su inocuidad sobre la actividad pectinolítica, buena disponibilidad y su precio intermedio (N\$ 15.00 / Kg. de floculante) respecto al resto de los floculantes (N\$ 8.00-48.00 / Kg. de floculante).

Tabla 4.2. Capacidad de separación de sólidos insolubles de algunos floculantes comerciales.

FLOCULANTE	Concentración	*Recup. de Actividad Endo-P.	Sólidos Separados (base seca)	Sólidos Residuales (base seca)	Eficiencia Separación Sólidos (base seca)
	[ppm]	[%]	[%]	[%]	[%]
MAFLOC-861 (Catiónico)	5	98.74	18.40	81.59	48.83
	10	98.26	18.71	81.28	49.65
	15	97.41	19.31	80.68	50.24
	20	96.67	19.43	80.26	51.51
	100	88.64	21.73	78.26	57.66
L690-E2 (Aniónico)	5	96.00	0	100.00	0
	10	89.64	0	100.00	0
	15	74.00	0.56	99.43	1.49
	20	57.17	2.36	97.63	6.27
	100	41.88	4.14	95.85	10.99
POL EZ 652 (No iónico)	5	99.81	0	100.00	0
	10	99.15	0	100.00	0
	15	98.98	0	100.00	0
	20	97.87	0	100.00	0
	100	89.65	0	100.00	0

Nota : *Recuperación de Act. Endo-Pect. (%) = $\frac{\text{Act. Endo-Pect. inicial} - \text{Act. Endo-Pect. final}}{\text{Act. Endo-Pect. inicial}} \times 100$

Eficiencia de separación de sólidos de floclantes.

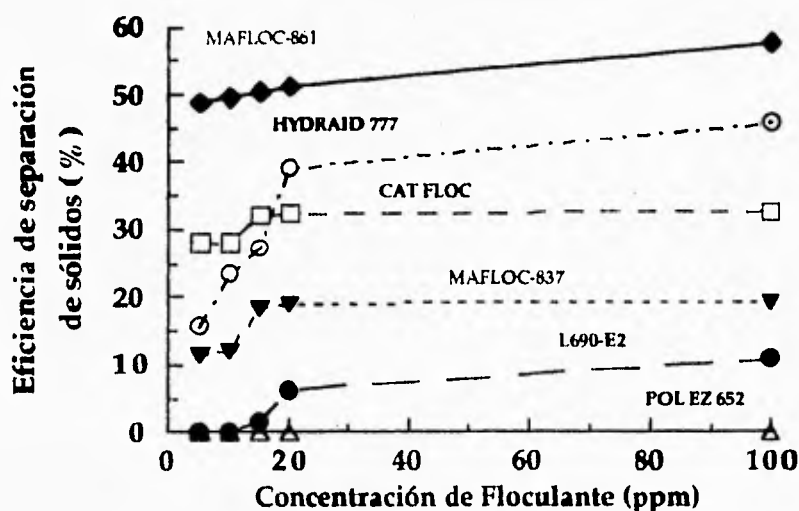
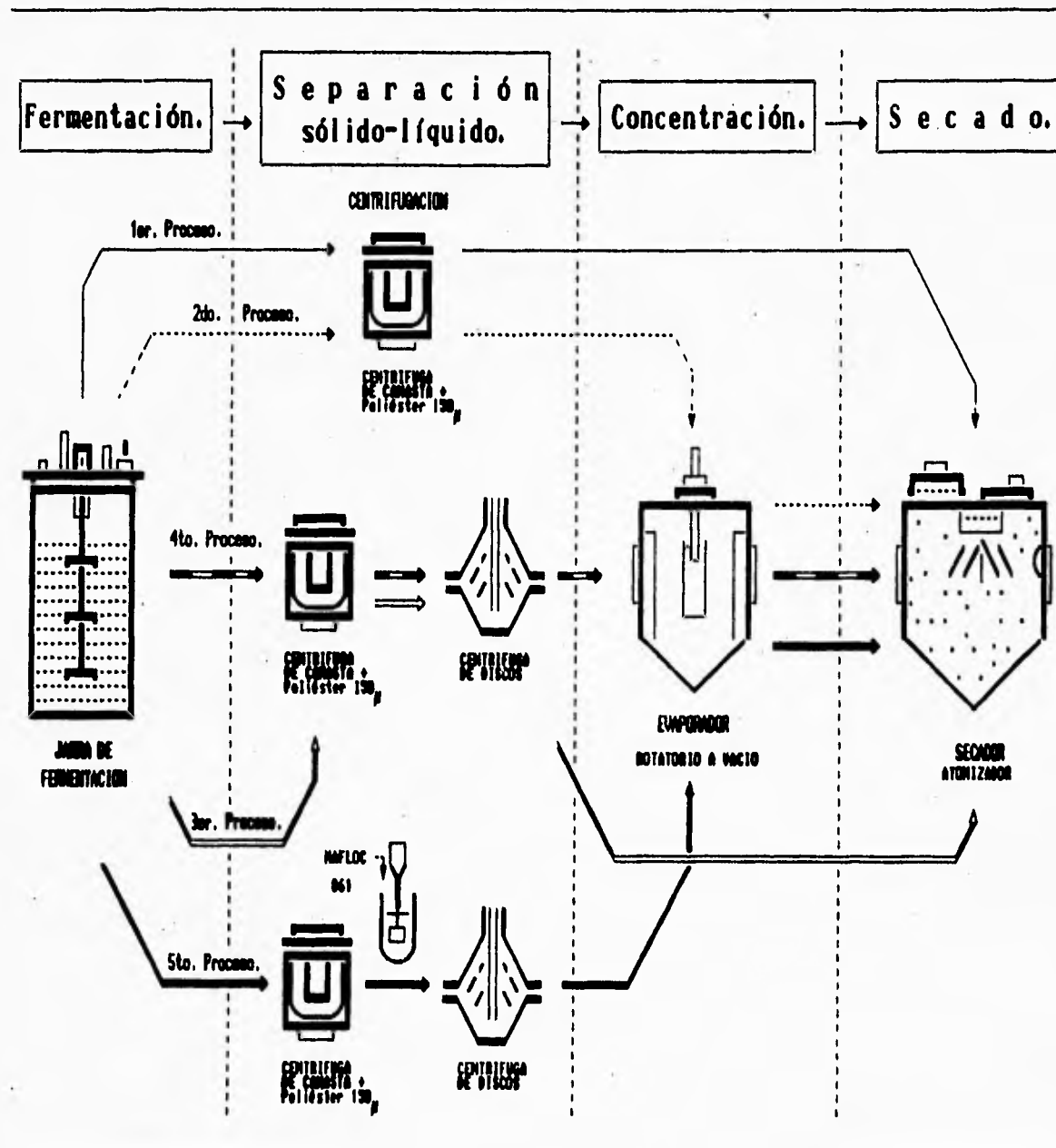


Fig. 4.7. Eficiencia de separación de sólidos de diversos floclantes comerciales.

4.2.7.- Procesamiento de pectinasas : separación y concentración a partir de un extracto crudo.

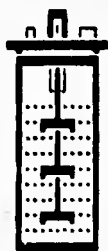
Una vez caracterizadas las técnicas de separación descritas, se probaron de manera alternada y secuencial junto con otros equipos disponibles (centrífuga de discos, evaporador rotatorio y un atomizador), en cinco procesos de recuperación y concentración de enzimas pécticas (Figura 4.8); obteniendo en todos ellos un concentrado sólido con diferente actividad pectinolítica, concentración de proteína y contenido de sólidos totales (impurezas, etc.). En todos los procesos como primera etapa de separación de sólidos insolubles se utilizó la centrifugación-filtración (centrífuga de canasta + poliéster 150 μ), logrando separar en promedio un 51 % de los sólidos totales (base seca) presentes en el extracto crudo, concentrando el contenido de proteína en el medio clarificado en un 123.5 % y la actividad endo y exo-pectinolítica en un 119 % y 120 % respectivamente. En los procesos 3 y 4 como segunda operación secuencial de eliminación de sólidos se evaluó la centrifugación, empleando una centrífuga de discos; obteniendo que este equipo

Fig.4.8. Diagrama de flujo general de las operaciones unitarias involucradas en el procesamiento de pectinasas.



PROCESAMIENTO DE PECTINAS.

(1er. Proceso)



JARRA DE FERMENTACION

$V_t = 30,000$ L
 $V_p = 18,360$ L

A.Endo-P. (U/mL) = 67.93
A.Exo-P. (mgR/mL) = 6.82
Pr-Total E. (µg/mL) = 819.99
A.E.Endo-P. (U/mgPr) = 82.84
Sól.Totales (g/L) = 38.91



CENTRIFUGACION
CENTRIFUGA DE
CONSTA + Poliéster 150_p

$V_t = 18,300$ L
 $V_p = 14,300$ L

A.Endo-P. (U/mL) = 78.41
A.Exo-P. (mgR/mL) = 8.29
Pr-Total E. (µg/mL) = 995.38
A.E.Endo-P. (U/mgPr) = 78.77
Sól. Resid. (g/L) = 19.40



SECADO
ATOMIZADOR

Entrada :

$V_t = 14,250$ L
A.Endo-P. (U/mL) = 78.41
A.Exo-P. (mgR/mL) = 8.29
Pr-Total E. (µg/mL) = 995.38
A.E.Endo-P. (U/mgPr) = 78.77
Sól. Resid. (g/L) = 19.40

Sólidos Totales de
Entrada = 276.45 g

Salida :

A.Endo-P. (U/mL) = 68.81
A.Exo-P. (mgR/mL) = 7.18
Pr-Total E. (µg/mL) = 1000.12
A.E.Endo-P. (U/mgPr) = 68.74
% Recuperación de
Act. Endo - P. = 77.56
% Recuperación de
Act. Esp. Endo-P. = 87.27
% Recuperación de
Act. Exo - P. = 86.73
 $N_p = 241.97$ g (Esp.)

% Sólidos = 94.92

Sólidos Totales de
Salida = 229.68 g

% Recuperación de Sólidos = 83.09

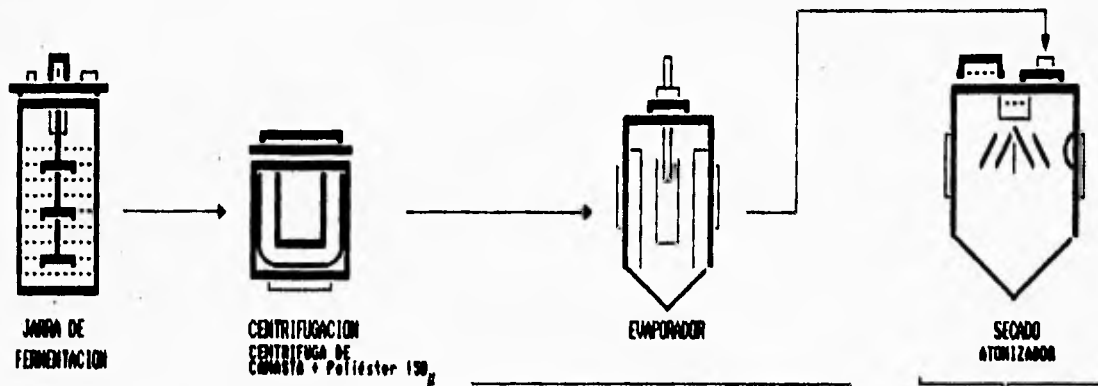
Nota : Sólidos Residuales son reportados en Base Seca

Estas determinaciones se realizaron ajustando las muestras a un volumen equivalente de $V = 14,250$ mL.

FALLA DE ORIGEN

PROCESAMIENTO DE PECTINASAS.

(2do. Proceso)



JARRA DE FERMENTACION
 $V_i = 30,000 \text{ L}$
 $V_f = 19,520 \text{ L}$
 A. Endo-P. (U/ml) = 72.35
 A. Exo-P. (ngOR/ml) = 7.79
 Pr-Total E. (µg/ml) = 870.43
 A.E. Endo-P. (U/ngPr) = 83.12
 Sól. Totales (g/L) = 35.90

CENTRIFUGACION CENTRIFUGA DE CAMBIO + Poliester 130µ
 $V_i = 18,470 \text{ L}$
 $V_f = 15,050 \text{ L}$
 A. Endo-P. (U/ml) = 82.40
 A. Exo-P. (ngOR/ml) = 9.27
 Pr-Total E. (µg/ml) = 1037.37
 A.E. Endo-P. (U/ngPr) = 79.43
 Sól. Resid. (g/L) = 17.23

1 ^{er} Evaporado.		2 ^{da} Evaporado.	
$V_i = 15,000 \text{ L}$		$5,950 \text{ L}$	
A. Endo-P. _i (U/ml) =	82.40	181.28	
A. Exo-P. _i (ngOR/ml) =	9.27	24.93	
Pr-Total E. _i (µg/ml) =	1037.37	2683.45	
A.E. Endo-P. (U/ngPr) =	79.43	67.55	
Sól. Resid. (g/L) =	17.23	44.97	
$V_f = 6,000 \text{ L}$		$3,360 \text{ L}$	
A. Endo-P. _f (U/ml) =	181.28	270.10	
% A. Endo-P. _f (%) =	92.45	87.09	
A. Exo-P. _f (ngOR/ml) =	24.93	48.86	
% A. Exo-P. _f (%) =	95.72	92.16	
Pr-Total E. _f (µg/ml) =	2683.45	5420.03	
A.E. Endo-P. (U/ngPr) =	67.55	49.83	
% Recuperación de Act. Endo-P. =	85.04	62.73	
Sól. Resid. (g/L) =	44.97	82.79	

SECADO ATOMIZADOR
Entrado :
 $V_i = 3,300 \text{ L}$
 A. Endo-P._i (U/ml) = 270.10
 A. Exo-P._i (ngOR/ml) = 48.86
 Pr-Total E._i (µg/ml) = 5420.03
 A.E. Endo-P. (U/ngPr) = 49.83
 Sól. Resid. (g/L) = 82.79
 Sólidos Totales de Entrada = 271.55 g

Salida :
 A. Endo-P._f (U/ml) = 236.44
 A. Exo-P._f (ngOR/ml) = 42.40
 Pr-Total E._f (µg/ml) = 5440.75
 A.E. Endo-P. (U/ngPr) = 42.88
 % Recuperación de Act. Endo-P. = 79.34
 % Recuperación de Act. Exp. Endo-P. = 86.85
 % Recuperación de Act. Exo-P. = 87.68
 $M_f = 240.70 \text{ g (Exp.)}$
 % Sólidos = 93.37
 Sólidos Totales de Salida = 224.82 g
 % Recuperación de Sólidos = 82.79

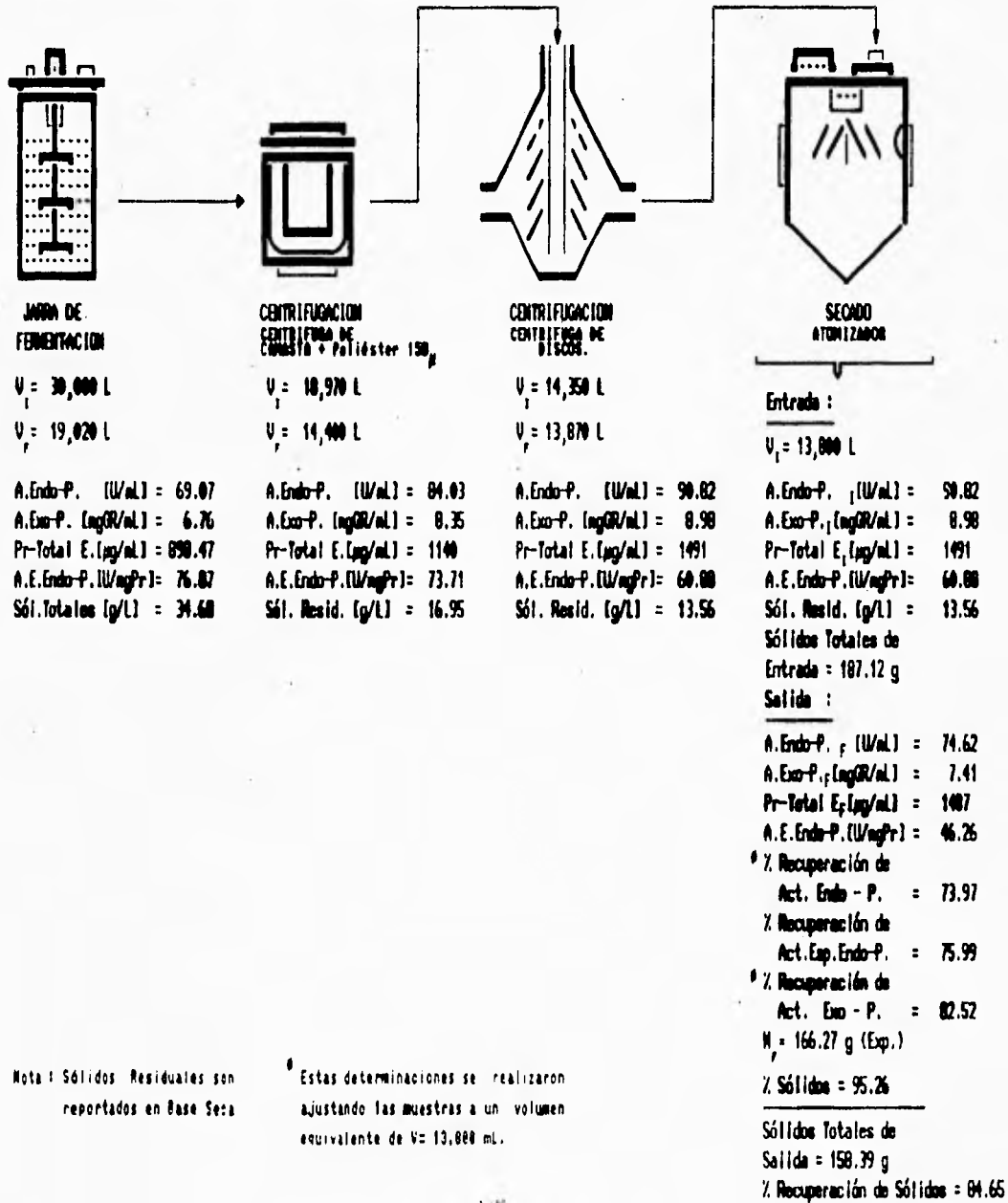
Nota 1 Sólidos Residuales son reportados en Base Seca

Estas determinaciones se realizaron ajustando las muestras a un volumen equivalente de $V = 15,000 \text{ mL}$.

FALLA DE ORIGEN

PROCESAMIENTO DE PECTINASAS.

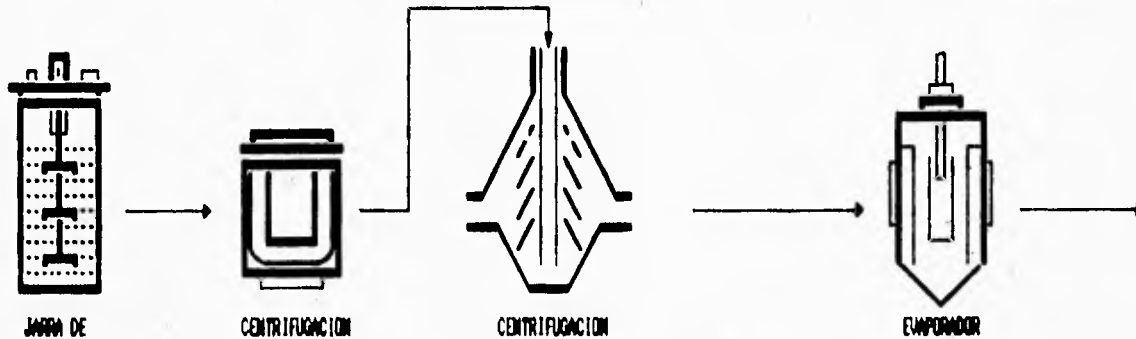
(3er. Proceso)



FALLA DE ORIGEN

PROCESAMIENTO DE PECTINASAS.

(4to. Proceso)



JARRA DE FERMENTACION
 $V_1 = 30,000$ L
 $V_p = 17,600$ L

A.Endo-P. (U/ml) = 70.65
 A.Exo-P. (ngOR/ml) = 7.52
 Pr-Total E. (µg/ml) = 904.14
 A.E.Endo-P. (U/ngPr) = 78.14
 Sól.Totales (g/L) = 37.25

CENTRIFUGACION CENTRIFUGA DE CANSITA + Poliéster 150µ
 $V_1 = 17,550$ L
 $V_p = 12,900$ L

A.Endo-P. (U/ml) = 84.83
 A.Exo-P. (ngOR/ml) = 8.97
 Pr-Total E. (µg/ml) = 1140
 A.E.Endo-P. (U/ngPr) = 74.41
 Sól. Resid. (g/L) = 18.28

CENTRIFUGACION CENTRIFUGA DE DISCOS.
 $V_1 = 12,900$ L
 $V_p = 12,550$ L

A.Endo-P. (U/ml) = 92.55
 A.Exo-P. (ngOR/ml) = 9.57
 Pr-Total E. (µg/ml) = 1505
 A.E.Endo-P. (U/ngPr) = 61.49
 Sól. Resid. (g/L) = 14.37

EVAPORADOR

1ª Evaporada.		2ª Evaporada.	
$V_1 = 12,500$ L		$V_1 = 5,450$ L	
A.Endo-P. ₁ (U/ml) = 92.55	223.04	A.Endo-P. ₂ (U/ml) = 223.04	339.02
A.Exo-P. ₁ (ngOR/ml) = 9.57	25.54	% A.Endo-P. ₂ (%) = 87.33	83.67
Pr-Total E. ₁ (µg/ml) = 1505	4078.68	A.Exo-P. ₂ (ngOR/ml) = 25.54	51.40
A.E.Endo-P. ₁ (U/ngPr) = 61.49	54.68	% A.Exo-P. ₂ (%) = 92.96	89.63
Sól. Resid. ₁ (g/L) = 14.37	34.40	Pr-Total E. ₂ (µg/ml) = 4078.68	9066.90
		A.E.Endo-P. ₂ (U/ngPr) = 54.68	37.39
		% Recuperación de Act. Exp. Endo-P. = 88.92	60.80
		Sól. Resid. (g/L) = 34.40	67.23



Entrada :
 $V_1 = 2,050$ L
 A.Endo-P.₁ (U/ml) = 339.02
 A.Exo-P.₁ (ngOR/ml) = 51.40
 Pr-Total E.₁ (µg/ml) = 9066.9
 A.E.Endo-P.₁ (U/ngPr) = 37.39
 Sól. Resid. (g/L) = 67.23
 Sólidos Totales de Entrada = 191.62 g

Salida :
 A.Endo-P._f (U/ml) = 204.64
 A.Exo-P._f (ngOR/ml) = 45.13
 Pr-Total E._f (µg/ml) = 8998.7
 A.E.Endo-P._f (U/ngPr) = 27.45
 % Recuperación de Act. Endo-P. = 75.76
 % Recuperación de Act. Exp. Endo-P. = 73.42
 % Recuperación de Act. Exo-P. = 84.35
 $N_p = 171.13$ g (Exp.)
 % Sólidos = 94.02

Sólidos Totales de Salida = 160.90 g
 % Recuperación de Sólidos = 83.97

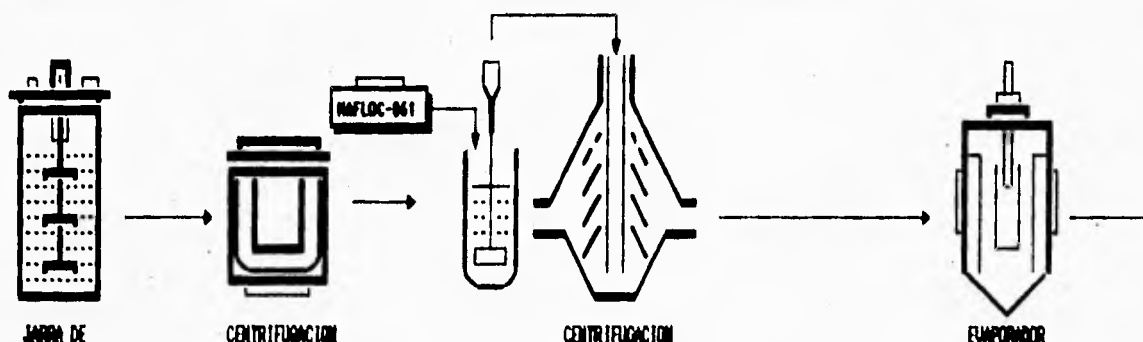
Nota : Sólidos Residuales son reportados en Base Seca

* Estas determinaciones se realizaron ajustando las muestras a un volumen equivalente de $V = 12,500$ ml.

FALLA DE ORIGEN

PROCESAMIENTO DE PECTINASAS.

(5to. Proceso-Floculante)



JARRA DE FERMENTACION

$V_t = 30,000$ L
 $V_p = 17,750$ L

A.Endo-P. (U/ml) = 75.36
A.Exo-P. (ngOR/ml) = 7.26
Pr-Total E. (µg/ml) = 929.56
A.E.Endo-P. (U/ngPr) = 81.07
Sól. Totales (g/L) = 35.09

CENTRIFUGACION CENTRIFUGA DE CAMARITA + Poliéster 130µ

$V_t = 17,700$ L
 $V_p = 13,240$ L

A.Endo-P. (U/ml) = 88.80
A.Exo-P. (ngOR/ml) = 8.63
Pr-Total E. (µg/ml) = 1076.1
A.E.Endo-P. (U/ngPr) = 76.95
Sól. Resid. (g/L) = 17.18

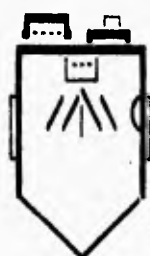
CENTRIFUGACION CENTRIFUGA DE DISCOS.

$V_t = 13,200$ L
 $V_p = 12,540$ L

A.Endo-P. (U/ml) = 121.47
A.Exo-P. (ngOR/ml) = 11.25
Pr-Total E. (µg/ml) = 2042.4
A.E.Endo-P. (U/ngPr) = 59.47
Sól. Resid. (g/L) = 10.75

EVAPORADOR

1ª Evaporada.	2ª Evaporada
$V_t = 12,400$ L	5,000 L
A.Endo-P. _t (U/ml) = 121.47	304.80
A.Exo-P. _t (ngOR/ml) = 11.25	30.37
Pr-Total E. _t (µg/ml) = 2042.4	5677.87
A.E.Endo-P. (U/ngPr) = 59.47	53.79
Sól. Resid. _t (g/L) = 10.75	27.19
$V_p = 5,093$ L	2,600 L
A.Endo-P. _f (U/ml) = 304.80	518.29
R.A.Endo-P. _f (%) = 85.98	80.33
A.Exo-P. _f (ngOR/ml) = 30.37	60.43
R.A.Exo-P. _f (%) = 90.24	86.19
Pr-Total E. _f (µg/ml) = 5677.87	12434.50
A.E.Endo-P. (U/ngPr) = 53.79	41.68
% Recuperación de Act. Endo - P. = 71.48	70.00
% Recuperación de Act. Exp. Endo-P. = 84.54	53.83
% Recuperación de Act. Exo - P. = 81.09	
$M_p = 119$ g (Exp.)	
% Sólidos = 95.35	
Sólidos Totales de Salida = 113.46 g	
% Recuperación de Sólidos = 82.66	



SEGUNDO ATORIZADOR

Entrada :

$V_t = 2,550$ L
A.Endo-P._t (U/ml) = 518.29
A.Exo-P._t (ngOR/ml) = 60.43
Pr-Total E._t (µg/ml) = 12434.5
A.E.Endo-P. (U/ngPr) = 41.68
Sól. Resid. (g/L) = 53.83
Sólidos Totales de Entrada = 137.26 g

Salida :

A.Endo-P._f (U/ml) = 412.97
A.Exo-P._f (ngOR/ml) = 52.87
Pr-Total E._f (µg/ml) = 12399.8
A.E.Endo-P. (U/ngPr) = 35.24
% Recuperación de Act. Endo - P. = 71.48
% Recuperación de Act. Exp. Endo-P. = 84.54
% Recuperación de Act. Exo - P. = 81.09

Nota :
Sólidos Residuales son reportados en Base Seca

Estas determinaciones se realizaron ajustando las muestras a un volumen equivalente de $V = 12,400$ ml.

FALLA DE ORIGEN

es capaz de remover en promedio un 20.7 % de sólidos insolubles (base seca) presentes en el medio clarificado previamente en la centrifuga de canasta. Además concentró en un 131 % el contenido de proteína, en 108 % y 107 % la actividad endo y exo-pectinolítica respectivamente, del extracto clarificado. En el proceso 5 se analizó también el efecto de la adición del floculante Maffloc-861 al clarificado obtenido de la centrifuga de canasta y alimentado posteriormente a la centrifuga de discos encontrando que las dos etapas en conjunto logran separar un 37 % de sólidos del medio, lo cual corresponde a remover un 17 % más de sólidos que el obtenido por la centrifuga de discos. También se logró concentrar la proteína y la actividad endo y exo-pectinolítica presente en un 57 %, 28 % y 23 % más que el alcanzado por la centrifuga de discos únicamente. Después de haber eliminado una parte importante de las impurezas presentes (sólidos insolubles) en el extracto crudo por centrifugación; se redujo el volumen del extracto clarificado en un evaporador rotatorio a vacío hasta un cuarto de este (procesos : 2, 4 y 5). En esta operación, el extracto clarificado se evaporo dos veces (1er. y 2da. evaporación). En la primera evaporada se logró concentrar hasta más de la mitad del volumen inicial, incrementándose la concentración de proteína total y la actividad endo y exo-pectinolítica a más del doble (2.7, 2.3 y 2.6 veces respectivamente). Se observó una mayor sensibilidad a la temperatura de evaporación en la actividad endo-pectinolítica pues el porcentaje de recuperación promedio de esta actividad enzimática fue menor (88 %) a la exo-pectinolítica (92 %). Esta pérdida promedio de actividad endo-pectinolítica fue más marcada en el caso de la segunda evaporación en donde únicamente se recupero el 83 %, mientras que un 89 % para la actividad exo-pectinolítica. El concentrado líquido obtenido después de las evaporaciones consecutivas presento un incremento de proteína y actividad endo y exo-pectinolítica de 5.7, 4 y 5.4 veces superior respectivamente a las registradas en el extracto clarificado antes de esta operación. Este líquido concentrado finalmente se alimentó a un secador (atomización) para obtener un producto más concentrado en forma sólida con actividad pectinolítica. Esta operación se incluyó en los cinco procesos, encontrando y confirmando (como en la etapa de evaporación) que las enzimas endo-pectinasas presentan una mayor sensibilidad a la temperatura de secado que las exo-pectinasas lo cual se comprobó al registrar un porcentaje promedio de recuperación de actividad menor para las primeras enzimas mencionadas (% de recuperación de actividad endo-pectinolítica : 75.62 y % de recuperación de actividad exo-pectinolítica : 84.47). Se observó que estos porcentajes de recuperación de actividad pectinolítica fueron mayores en los

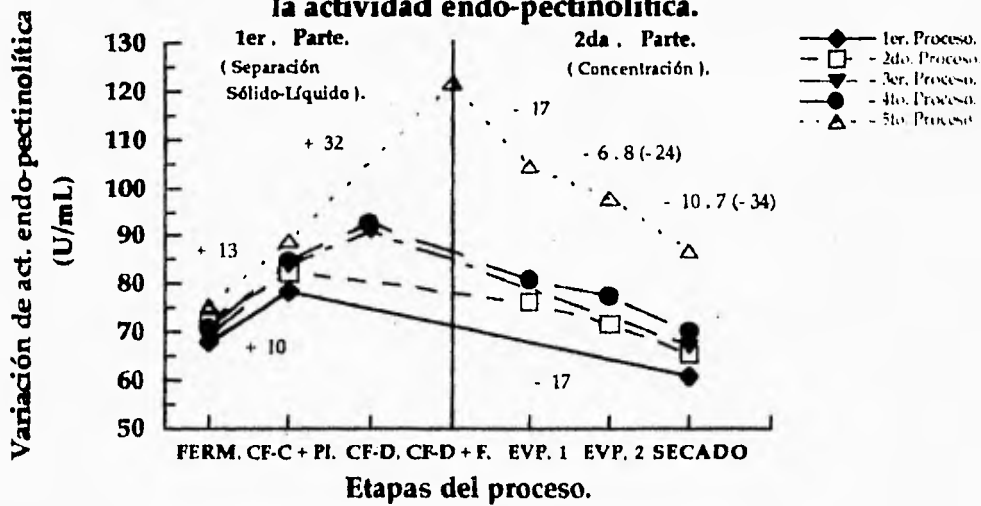
procesos en los cuales se eliminó una menor cantidad de sólidos del medio (1er. y 2do. proceso); esto puede deberse a que la "alta cantidad de sólidos" presentes en el medio protege de alguna manera contra la desnaturalización por temperatura a las enzimas pectinolíticas.

La variación de la actividad endo pectinolítica durante el procesamiento de recuperación de pectinasas fue importante (Figura 4.9). En la primera parte del procesamiento se encontró que las etapas de separación sólido-líquido (CF-C+PL, CF-D y CF-D+F.) logran concentrar de manera notable la actividad de interés, incrementándose esta de manera significativa cuando se eliminó la mayor cantidad de sólidos del medio fermentado, tal es el caso de la operación CF-D+F empleada en el 5to. proceso (el incremento de Act. Endo-P fue de 32 U/mL, Act. Endo-P. después de la etapa = 121 U/mL), la cual aumento en promedio 2.6 y 4.5 veces más la actividad endo-pectinolítica que las etapas CF-C+PL y CF-D respectivamente. En la segunda parte (concentración) por el contrario a la primera se registro una pérdida de Act. Endo-P. en todas las etapas (EVP. 1, EVP. 2 y SECADO) aplicadas en los cinco procesos estudiados. La menor pérdida de actividad fue detectada en la EVP. 1 y la mayor en el SECADO. Se encontro que la magnitud de la disminución de Act. Endo-P. aumento de manera directa al eliminar una mayor cantidad de sólidos del cultivo fermentado por las etapas de separación sólido-líquido; de esta manera se observó que en el 5to. proceso (proceso en el cual se separo la mayor cantidad de sólidos) se registraron los decrementos más altos de actividad una vez aplicadas las operaciones unitarias de concentración; lo cual puede deberse a que al tener una menor concentración de sólidos en el medio estos no pueden " proteger " de alguna manera ó lo suficientemente a las enzimas de interés contra la desnaturalización por temperatura principalmente. La etapa EVP. 1 del 5to. proceso disminuyó 2.7 veces más la Act. Endo-P. (de 121 a 104 U/mL) que la correspondiente del 2do. proceso (esta redujo la Act. Endo-P. 6 U/mL) en donde se eliminó una menor cantidad de sólidos. La EVP. 2 originó una mayor pérdida de actividad que la alcanzada por la EVP. 1, en todos los procesos; así la EVP. 2 del 2do. proceso causó una pérdida de Act. Endo-P. de 10.6 U/mL (1.7 veces más de pérdida que la EVP. 1 del mismo proceso) mientras que más del doble de este valor fue logrado por la EVP. 2 del 5to. proceso (de 121 a 97 U/mL, decremento de 23.9 U/mL). La concentración final de las pectinasas se realizó durante el SECADO, etapa de la 2da. parte del procesamiento (concentración) en la cual se observó la pérdida más alta de Act. Endo-P., posiblemente por las condiciones de la operación (principalmente por influencia de la alta temperatura

de secado : 130 °C). El SECADO del 1er. y 2do. proceso produjo una pérdida de Act. Endo-P. 17 U/mL (1.6 veces más de disminución de actividad que la EVP. 2 del mismo proceso) en tanto que el SECADO del 3er., 4to. y 5to. proceso, originaron un decremento de actividad de 1.38, 1.31 y 2.03 veces más respectivamente. La disminución marcada de actividad en el SECADO del 5to. proceso se aprecia perfectamente en la fig. 4.9 por ese cambio notable en la tendencia de la pendiente negativa (de una Act. Endo-P : 97 U/mL a 86 U/mL) no presentado por las curvas del resto de los procesos.

En los cinco procesos, de acuerdo al número de etapas involucradas se logró una mayor separación de sólidos insolubles (impurezas, etc.) y una mayor concentración de las enzimas de interés. En el 5to. proceso se eliminó la mayor cantidad de sólidos del extracto crudo y después de ser secado, produjo el menor concentrado sólido de todos los procesos (sólidos totales de salida = 113 g), el cual correspondió aproximadamente a la mitad del generado por el 1er. proceso (sólidos totales de salida = 229 g), pero el producto con las más altas actividades pectinolíticas (A.Endo-P.F = 412.9 U/mL y A.Exo-P.F = 52.8 mg GR/mL) en comparación al resto de los procesos. Este producto sólido presentó una actividad endo y exo-pectinolítica de 6.8 y 7.3 veces más respectivamente, al registrado en el polvo obtenido en el 1er. proceso (A.Endo-P.F = 60.81 U/mL y A.Exo-P.F = 7.18 mg GR/mL).

Influencia de cada una de las operaciones unitarias de recuperación y concentración de pectinasas sobre la actividad endo-pectinolítica.



Nota 1 : + 13 representa un Incremento de Act. Endo-P. de 13 U/mL.

- 10.7 representa una pérdida ó decremento de Act. Endo-P. de 10.7 U/mL.

Nota 2 : * La Act. Endo-P. mostrada en la 1er. parte del procesamiento (separación sólido-líquido) fue medida directamente del licor clarificado obtenido de las etapas mencionadas.

* La Act. Endo-P. representada en la 2da. parte del procesamiento (concentración) fue determinada a una muestra del concentrado (líquido o sólido) obtenido de la operación unitaria correspondiente previamente ajustado a un volumen determinado en cada caso para tratar de conocer la variación de dicha actividad a lo largo del proceso.

Terminología usada en las etapas del proceso :

FERM. : Fermentación.

CF-C + PL. : Centrifuga de canasta + poliéster 150 μ .

CF-D. : Centrifuga de discos.

CF-D + F. : Centrifuga de discos + floculante (Mafloc-861).

EVP.1 : 1er. Evaporación.

EVP.2 : 2da. Evaporación.

SECADO : Secado.

Fig. 4.9. Variación de la actividad endo-pectinolítica durante el procesamiento de pectinasas.

V.- CONCLUSIONES.

1) Influencia del pH inicial de fermentación sobre la producción de pectinasas por *Aspergillus sp.*

- El pH inicial en el cual se encontro la mayor producción de endo-pectinasas por *Aspergillus sp.* fue a 2.8 (80 U / mg Pr- / min); logrando incrementar en 12 veces más el rendimiento obtenido por Saval y col. (1985).

2) Procesos de recuperación y concentración de pectinasas.

a) Centrifugación.

- La centrifuga de laboratorio (marca Wifug : 5000 r.p.m., 15 min) logro eliminar el 37 % del total de sólidos insolubles presentes en el extracto crudo sin disminuir la actividad pectinolítica.
- Se caracterizó la capacidad de separación de sólidos de la centrifuga de canasta, encontrando que la eficiencia de separación de sólidos (E.S.S) se incremento conforme se aumento el volumen de alimentación del extracto crudo. La máxima E.S.S alcanzada fue de 82.49 % cuando se manejaron 30 litros del medio fermentado y logrando además concentrar la actividad pectinolítica en un 7% más.

b) Filtración a través de diversos medios filtrantes.

- De las mallas sintéticas estudiadas el poliéster 150 μ fue el medio filtrante más adecuado para nuestro propósito de recuperación de pectinasas por su alta E.S.S (93 % a un volumen de alimentación de extracto crudo = 3L), por sus buenas características de maleabilidad, moldeado, limpieza, disponibilidad en el mercado y su precio menor al del polipropileno 800 μ .
- La tela metálica No 20 resultó ser la mejor en el proceso de filtración, al presentar la mayor E.S.S (60.30 %) de las telas analizadas. Son resistentes a las condiciones presentes en el extracto crudo (pH, T, etc.), son fáciles de limpiar y manejar. Pero quizás su gran desventaja la proporciona su costo elevado (15

veces más) en comparación a las mallas sintéticas estudiadas y a que no se han desarrollado tecnologías que permitan utilizarlas en procesos continuos.

c) Centrifugación-filtración : funcionalidad de algunos medios filtrantes en una centrifuga de canasta.

- Se logró aumentar la E.S.S de la centrifuga de canasta (para un $V_{alimentación} = 20$ L y una canasta de lona como medio filtrante; E.S.S = 68.60%) en un 16.5 % y 74.7 % como máximo, integrando a esta los materiales filtrantes : malla metálica No 16 y 20, polipropileno 300 μ y poliéster 150 μ .
- De los medios filtrantes caracterizados en la centrifuga de canasta, el poliéster 150 μ separo la mayor cantidad de sólidos del extracto crudo (E.S.S = 143.3 %) y un 30.7 %, 57.7 % y 58.2 % más que el polipropileno 300 μ , malla metálica No 20 y No 16 respectivamente. Este sistema centrifuga de canasta-poliéster 150 μ se consideró el mejor respecto a las otras combinaciones analizadas, además de su alta E.S.S, por las ventajas mencionadas de este material, destacando dentro de estas su alta capacidad de ser moldeado (formación de canasta) y su menor precio.

d) Capacidad de separación de sólidos de floculantes comerciales.

- De los floculantes estudiados (aniónicos, catiónicos y no iónicos) los catiónicos separaron la mayor cantidad de sólidos del medio fermentado por precipitación y de acuerdo a su peso molecular, su capacidad de precipitación de sólidos se distinguió de manera importante. Los floculantes de alto peso molecular presentaron los valores más altos de E.S.S, en seguida los de peso molecular medio y por ultimo los de bajo peso molecular. La E.S.S de estos agentes se incremento conforme se aumento la concentración de ellos en el extracto crudo; encontrando la máxima E.S.S cuando se utilizo 100 p.p.m del floculante.
- El floculante catiónico : Mafloc-861 (alto peso molecular), separo la mayor cantidad de sólidos (E.S.S = 57 % a 100 p.p.m) mientras que Mafloc-837 (bajo peso molecular) eliminó la menor cantidad de estos (E.S.S = 19 % a 100 p.p.m).

- El floculante aniónico (L690-EZ) solo precipitó sólidos cuando se empleo en concentraciones superiores a 15 p.p.m y siendo este valor aproximadamente la mitad de lo obtenido con el agente catiónico de menor eficiencia (Mafloc-837).
- El precipitante no iónico (POL EZ 652) no separo sólidos por floculación a ninguna concentración utilizada de este.
- La actividad pectinolítica no fué afectada ó disminuida de manera importante por los agentes catiónicos y no iónico (% de recuperación de actividad pectinolítica superior al 95 %) mientras que con el floculante aniónico se observo una disminución drástica (hasta del 60 % cuando se utilizo 100 p.p.m del agente) de esta.
- El agente precipitante Mafloc-861 (catiónico, de alto peso molecular) se catalogó como el mejor floculante además de su alta E.S.S, por su inocuidad sobre la actividad pectinolítica, disponibilidad en el mercado y su precio intermedio respecto al resto de los floculantes.

3) Procesamiento de pectinasas : separación y concentración a partir de un extracto crudo.

a) 1er. parte del procesamiento (separación sólido-líquido).

- En todos los procesos como primer etapa de remoción de sólidos se utilizó la centrifugación-filtración (centrífuga de canasta + poliéster 150 μ). Este sistema separo en promedio un 51 % de los sólidos totales (base seca) presentes en el medio fermentado, concentrando en promedio el contenido de proteína y la actividad endo y exo-pectinolítica en un 123 %, 119 % y 120 % respectivamente.
- La centrífuga de discos utilizada en la segunda operación secuencial de eliminación de sólidos (procesos 3 y 4) removió en promedio un 20.7 % de sólidos insolubles (base seca) presentes en el medio clarificado previamente en la centrífuga de canasta. En promedio concentró en un 131 %, 108 % y 107 % el contenido de proteína, la actividad endo y exo-pectinolítica respectivamente.

- En el 5to. proceso el floculante Mafloc-861 en combinación con la centrifuga de discos separaron un 17 % más de sólidos del medio y concentraron la proteína y la actividad endo y exo-pectinolítica en un 57 %, 28 % y 23 % más que el alcanzado por la centrifuga de discos únicamente; siendo el proceso que eliminó la mayor cantidad de sólidos insolubles.

b) 2da. parte del procesamiento (concentración).

- El evaporador rotatorio a vacío se empleo como tercera etapa (procesos : 2, 4 y 5) en el procesamiento de pectinasas, lográndo reducir el volumen del extracto clarificado hasta un cuarto del volumen original. Este equipo concentró en promedio el contenido de proteína y la actividad endo y exo-pectinolítica del extracto clarificado en 5.7, 4 y 5.4 veces más respectivamente después de la operación. La EVP. 2 produjo una pérdida mayor de Act. Endo-P. que la EVP. 1, aumentando esta al incrementar la separación de sólidos del medio fermentado. La EVP. 2 del 5to. proceso originó la mayor disminución de Act. Endo-P. (23.9 U/mL) y la menor la del 2do. proceso (10.6 U/mL). La actividad endo-pectinolítica presentó una mayor sensibilidad a las condiciones de evaporación (T, P), pues se registro para esta un porcentaje de recuperación de actividad (83 %) menor al de la actividad exo-pectinolítica (89 %).
- La ultima operación empleada en la separación y concentración de pectinasas fue el secado del líquido concentrado (obtenido del evaporador) en un secador-atomizador. El SECADO del 5to. proceso causó el doble de pérdida de Act. Endo-P. (34.6 U/mL) que el del 1er. y 2do. proceso. Se observó una mayor sensibilidad de la actividad endo-pectinolítica a la temperatura de secado (% de recuperación de actividad = 75 %) que la actividad exo-pectinolítica (% de recuperación de actividad = 84 %). Los porcentajes de recuperación de actividad pectinolítica fueron mayores en los procesos en los que se eliminó una menor cantidad de sólidos del medio (1er. y 2do. proceso).
- En el 5to. proceso se eliminó la mayor cantidad de sólidos insolubles del extracto crudo, produciendo el menor concentrado sólido (sólidos totales de salida = 113 g) y aproximadamente la mitad de lo generado por el 1er. proceso (sólidos totales de salida = 229 g). El concentrado sólido obtenido presentó los valores más altos de actividad pectinolítica; registrando una actividad endo y

exo-pectinolítica de 6.8 y 7.3 veces más respectivamente, a los cuantificados en el polvo obtenido en el 1er. proceso.

CONCLUSIONES GENERALES.

- El pH inicial de fermentación de 2.8 fue el que nos permitió obtener la mayor producción de endo-pectinasas (80 U / mg Pr⁻ / min) y además se incrementó 12 veces más el rendimiento obtenido por Saval y col. (1985).
- El 5to. proceso que involucro como primer etapa la centrifugación-filtración (centrífuga de canasta + poliéster 150 µ), como segunda etapa el sistema floculación (mafloc-861)-centrífuga de discos, después la evaporación (evaporador rotatorio a vacío) como tercera fase y finalmente la operación de secado (atomizador). Esta implementación y combinación de operaciones unitarias de separación sólido-líquido y concentración resultó ser la alternativa metodológica más importante y recomendada para la separación y concentración de pectinasas; pues eliminó la mayor cantidad de sólidos insolubles del extracto crudo y produjo el concentrado sólido con la mayor actividad endo-pectinolítica final (87 U/mL).

VI.- SUGERENCIAS.

- Estudiar otras operaciones unitarias de separación sólido-líquido como filtro rotatorio a vacío, filtro prensa para comparar sus eficiencias de separación de sólidos con las obtenidas en los equipos estudiados para seleccionar la técnica de separación más eficiente para tal propósito.
- Además de los floculantes usados se podría aplicar ya sea de manera individual, alternada ó en conjunto " filtro ayuda " disponibles comercialmente (tierra de diatomeas, celite, etc.) para tratar de aumentar la separación de sólidos del medio fermentado. Esta alternativa podría también combinarse con otras técnicas de separación como la centrifugación, filtración en filtro rotatorio ó filtro prensa para mejorar la eliminación de sólidos.
- En la parte de concentración de pectinasas es conveniente optimizar las condiciones de operación, en el evaporador rotatorio a vacío principalmente la temperatura y presión de evaporación y en el secado (atomizador) las temperaturas de entrada y salida, con el fin de reducir la pérdida de actividad pectinolítica en esta etapa.
- El empleo de agentes protectores contra la termodesnaturalización (ciclodextrinas, gomas, polialcoholes, etc.) podrían ser una buena alternativa para disminuir las pérdidas de actividad endo-pectinolítica registradas en las etapas de concentración (evaporación y secado).
- Para un mejor manejo, aplicación y conservación del concentrado sólido con actividad pectinolítica se podría evaluar la funcionalidad de antiaglomerantes.

VII.- BIBLIOGRAFIA.

Aguilar G., Huitron C., *Enzyme. Microb. Technol.*, 8(1986), 541-545.

Aguilar G., Huitron C., *Enzyme. Microb. Technol.*, 9(1987), 690-696.

Aguilar G., Huitron C., *Biotechnol. Lett.*, 12(1990), 655-660.

Aiba, S, AE Humphrey y NF Millis, *Biochemical Engineering* (Academic Press Nueva York, 1973) 2a.edición.

Alana A, Gabilondo A, Hernando F, Moragues MD, Dominguez JB, Llama MJ, Serra JL., *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(1989), 1612-1616.

Alana A, Llama MJ, Serra JL., *FEBS LETTERS*, 280(1991), 335-340.

Albani D, Altosaar I, Arison PG, Fabijanski SF., *Plant-Mol-Biol*, 16(1991), 501-13.

Albertsson PA., "Partition of Cell Particles and Macromolecules "; (2nd. Ed. John Wiley & Sons, New York, 1971).

Allen C., Huang ., Sequeira L., *Molecular Plant Microbe Interactions* 4(1991), 147-154.

Asenjo, AJ.," Separation Processes, Concentration and Separation Operations, Purification Operations, Design of Separation Processes ", *Separation Processes in Biotechnology*, (Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1990) pp. 1-795.

Ashour, W.E., *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 37,343(1954).

Astapovich NI., Golovneva NA., Lobanok AG., *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 21(1985), 516-519.

Atkinson, T, P.M Hammond, M.D, Scawen y R.F. Sherwood, (Traducido por Walker, JM):" Recuperación y Purificación de Enzimas, Procesado a favor de corriente ", *Biología Molecular y Biotecnología*, (Ed. Acribia, S.A, España, 1988)

pp. 183-203.

Avrova, NP., *Appl. Biochem. Microbiol.*, 11(1975), 648-652.

Bailey MJ., *Enzyme Microb. Technol.*, 12(1990), 622-624.

Baird, JK, R.F Sherwood, R.J.G Carr and A. Atkinson, *FEBS Letts.*, 1976,70, 61-66.

Barbesgaar, P., *Genetics and Physiology of Aspergillus*, Ed. por J.E Smith and J.A Pateman, Academic Press, New York (1977), pp. 391-404.

Baumann, JW., *Enzymes and Food Processing.*, Ed. por CC. Birch, N. Blakebrough y KL Parker, Applied Science Publishers, Ltd.London (1981), pp. 129-147.

Beckhorn, E.J., Labbee, M.D y Underkofler, L.A., *J. Agr. Food. Chem.*, 13,30(1965).

Bell, T.A., Etchells, J.L., and Jones, I.D., *Food Technol.*, 4, 157(1950).

Bell, T.A, *Botan. Gaz.*, 113, 216(1951).

Bell, T.A., Etchells, J.L., and Jones, I.D., *Arch. Biochem. Biophys.*, 31, 431 (1951).

Bell, T.A., and Etchells, J.L., *Appl. Microbiol.*, 4, 196(1956).

Bell, DJ. and K.H Brunner: "A method for the evaluation of floc break up in centrifuges"; *Filt. Sep.* July/Aug. 1983, 274-278.

Bell, DJ, M. Hoare, and P. Dunnill: " The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery"; *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 26 (1983), 1-7.

Belter, P.A., Cussler, E.L., Hu, W.S., *Bioseparations Downstream Processing for Biotechnology*, A. Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, Inc., Cap. 1, 2, 3, 5 y 8. (1988).

Bergmeyer HU, G. Naehrer, W. Thum, and G. Weimann,:" Verfahren zur Anreicherung von Proteinen "; DP 2001 90 27, 1970.

Biermann,L. et. al., *Biochimica Et Biophysica Acta* 167(1968).

Biocon, Ltd., Product Information Sheet, B/14-10/79, 1979.

Brocklebank, MP,:" Large Scale Separation and Isolation of Proteins ", *Food Biotechnology* 1. RD King y PSJ Cheetham (Eds) (Elsevier, Londres, 1987) pp.139-192.

Brooks AD., He S., Gold S., Keen NT., Colimer A., Hutcheson SW.,*J. Bacteriol.* 172(1990), 6950-8.

Bryan, W.H and Newcomb, E.H., *Physiol. Plantarum.*,7,290(1954).

Budiatman S., Lonsane BK., *Biotechnol. Lett.*, 9(1987), 597-600.

Büntemeyer, B y K, et al., *Process Biochemistry*,December(1989).

Bussink HJD., Brouwer KB., Degraaff LH., Kester HCM., *Current Genetics* 20(1991), 301-307.

Calesnick, E.J., Hillis, C.H and Willaman, J.J., *Arch. Biochem., Biophys.* 29,432(1950).

Chopra S., Mehta P., *Folia Microbiol.*, 30(1985), 117-125.

Cole, J.S., *Ann. Botany(London).*, 20,15(1956).

Comité de la Sociedad Americana de Química, Informe 1944. *Chem. Eng. News.* 22: 105.

Cox NA., Del Corral F., Bailey Shotts EB., Papa CM., *Poult Sci.*,69(1990), 482-5.

De LTMPolizeli M., Jorge JA., Terenci HF., J. Gen. Microbiol.,137(1991), 1815-1823.

Delourdes H., Polizeli TM., Jorge JA.,Terenzi HF., Journal Of General Microbiology.,137(1991), 1815-1823.

Demain. A.L., and Phaff, H.J., J. Agr. Food Chem., 5,60(1957).

Desgranges C, Durand A., Enzyme. Microb. Technol., 12(1990), 546-551.

Deuel, H. y E. Stutz, Adv. Enzymol. 20(1958), 341-382.

Dongowski G., Anger H., Bock W., NAHRUNG, 27(1983), 817-830.

Dunnill, P and M.D, Lilly,: " Enzyne Isolation ", Fermentation Technology (M.I.T , Cambridge, Mass , 1971).

Eb P., Bacla B., Tailleux R., Plant and Soil., 88(1985), 223-230.

Edwards, J.W and Joslyn, M.A., Arch. Biochem. Biophys., 39, 51(1952).

Endo. A., Agr. Biol. Chem., 27(1963), 741-750.

Endo. A., Agr. Biol. Chem., 28(1964a), 535-542.

Endo. A., Agr. Biol. Chem. 28(1964b), 543-550.

Endo. A., Agr. Biol. Chem. 28(1964c), 551-558.

Enzimas y Productos Químicos, S.A., Hoja de Información de Producto sobre Pectinasa IEC, México 1981.

Felix R., Villetaz JC., Industrial Enzymology., 1983; 410-421.

Fellows PJ., Worgan JT., Enzyme Microb. Technol., 6(1984), 405-410. □

- Fiedurek J., Ilczuk Z., Lobarzewski J., *Acta Biotechnol.*, 9(1989), 355-361.
- Fiedurek J., Ilczuk Z., Lobarzewski J., Pleszczynska M., *Zentralblatt F. Mikrobiologie.*, 147(1992), 15-21.
- Flaschel, E, Ch. Wandrey, and M.R Kula: " Ultrafiltration for the separation of biocatalysts"; *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, 26(1983), 73-142.
- Fogarty, WM y C.T. Kelly, *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Ed. por WM Fogarty, Applied Science Publishers, London(1983), pp.131-182.
- Fogarty, WM y O.P Ward, *Progr. Ind. Microb.* 13(1974), 59-119.
- Friedrich J, Cimerman A, Steiner W., *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 33(1990), 377-381.
- Frost, GM, "Commercial Production of Enzymes", *Developments in Food Proteins-4*. BJK Hudson (Ed) (Elsevier, Londres, 1986) pp.57-134.
- Gacosa, P., Hubble, J,:" La Extracción y Purificación de las Enzimas ", *Tecnología de las Enzimas* (Ed. Acribia, S.A, España, 1990) pp. 35-49.
- Garcia Garibay M., Gomez Ruiz L., Barzana E., *Biotechnol Lett.*, 9(1987), 411-416.
- García-Garibay, M,:" Recuperación de enzimas intracelulares de interés industrial (β -galactosidasa de levadura) ", *Ciencia* 43 (1992), 23-33
- Garzon CG., Hours RA., *Bioresource Technology.*, 39(1992), 93-95.
- Gonzalez, M, et al., *Process. Biochem.* 25 (1990),157-161.
- Grampp, EG., *Proc. Biochem.* April/May (1981), 24-27.
- Grampp, EG., *Proc. Biochem.* Jan/Feb (1982), 2-6.
- Gupta, S.C., *Ann. Botany (London)*, 20, 179(1956).

Guyer, R.B, Miller, W.M., Bisset, O.W., and Veldhuis, M. K., Food Technol.,10, 10 (1956).

Gysler C., Harmsen JA., Kester HC., Visser J., Heim., Gene, 89 (1990),101-108.

Hamdi M., Ellouz R., Journal Of Chemical Technology and Biotechnology, 53(1992), 195-200.

Hammond, PM, C.P Price and M.D. Scawen, Eur. J. Biochem., 1983, 132, 651-65.

Harmsen JA., Kusters-van Someren MA., Visser J., Curr-Genet., 18(1990), 161-166.

Harriman RW., Tieman ., Handa AK., Plant Physiology., 97(1991), 80-87.

Heikinheimo R., Hemila H., Pakkanen R., Palva I., Applied Microbiology and Biotechnology, 35(1991), 51-55.

Hermersdoerfer H., Jelke E., Leuchtenberg A., Wardsack C., Ruttloff H.Z. Allg. Mikrobiol., 24(1984), 413-424.

Henriksson E., Hailara A., Monatschrift Fur Brauwissenschaft, 44(1991), 4-8.

Höng, W, and MR, Kula, : " Selectivity of Protein Precipitation with Polyethylene Glycol Fractions of various molecular weights " Anal Biochem., 72(1976), 502-512.

Hours RA., Voget CE., Ertola RJ., Biol. Wastes., 23(1988a), 221-228.

Hours RA., Voget CE., Ertola RJ., Biol. Wastes., 24(1988b), 147-157.

Huang, S., Kuan, C., Juang, L Separation and Purification of Enzyme by Continuous pH Parametric Pumping, Biotechnology and Bioengineering, 27(1985)1451-1457.

Hugouvieux Cotte Pattat N., Robert Baudouy J., J. Gen. Microbiol.,131(1985), 1205-1211.

Hugouvieux Cotte Pattat N., Robert Baudouy J., Mol Microbiol., 3(1989), 1587-1597.

Hustedt, H, K.H Kroner, and M.R Kula,: " Applications of Phase Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems "; (Academic Pres, New York, in Press).

Jackson, AT,: " Separation Processes, Concentration, Manufacture of Solid Products ", Processes Engineering in Biotechnology (Ed. Englewood Cliffs, New Jersey : Prentice Hall, 1991) pp. 72-120.

Kaji, A., J. Agr. Chem. Soc. Japan, 27, 699(1953).

Kaji, A., J. Agr. Chem. Soc. Japan, 28, 695(1954).

Kertesz, ZI., The Pectin Substances, Ed. Interscience Publishing, New York (1951).

Kester HCM., Visser J., Biotechnol. Appl. Biochem., 12 (1990), 150-160.

Khanh NQ., Rutkowski E., Leidinger K., Albrecht H., Gottaschalk M., Gene,106 (1991), 71-77.

Kilara, A., Proc. Biochem. , Jul/Ag (1982), 35-41.

King, TP,: " Dialysis and Ultrafiltration ", en H.Ch.Curtino y M.Poth, Clinical Biochemistry, Principles and Methods, Berlin : Watcher de Gruyter, 1974, pp. 195-208.

Koch, J., Fruchtsaft-Ind., 1,66 (1956).

Kotzekidou P., Journal Of Industrial Microbiology, 7 (1991), 53-56.

Kopperschlayer, G. and G. Johansson, Anal. Biochem., 124 (1982), 117-124.

Kravala, B, et al., Biotechnol. Lett. 7 (1985), 593-596.

Kroner, KM, H.Hustedt and M.R Kula, Biotech. Bioeng., 24 (1982), 1015-1045.

Kula,MR, In,:" Applied Biochemistry and Bioengineering ", (Eds. L.B.Wingard, E : Katchalski-katzir and L. Goldstein, Academic Press, London and New York, 1979, Vol.2)

Kula,MR,:" Continuous Extraction of Enzymes in Aqueous Phase Systems " Adv.Biochem.Eng.Biotechnol.(1984)

Kula, MR,"Extraction and Purification of Enzymes Using Aqueous Two-Phase Systemes",Applied Biochem. and Bioengineering,Vol 2. LB Wingard,E Katchalski-Katzir y L Goldstein (Eds)(Academic Press, Nueva York,1979) pp.71-95.

Kula, MFI, K. M Kroner, H. Hustedt, S. Granota, and W.Stach,:" Process for the Separation of Enzymes ";Ger. Patent 2639 129, US Patent 4144 130, 1976)

Kula, MR, K.H Kroner, and H. Hustedt,:" Purification of Enzymes by Liquid-Liquid Extraction "; Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 24(1982) , 73-118.

Kulp, K., Enzymes in Food Processing, Ed. por G. Reed, Academic Press New York (1975), pp. 53-122.

Kustersvansomeren MA., Samson RA., Visser J., Current Genetics, 19(1991), 21-26.

Le,MS, P.S. Ward and T. Atkinson, Biotech., 1984, 84, II A97-A116.

Leblond, D., Technology Helps Firm Meet Biotechnology, Challenge. European Chemistry, 4, 24(1990)

Lee K., Tan HM., J. Gen. Microbiol., 134(1988), 635-641.

Leuchtenberger A., Mayer G., Folia Microbiologica, 36(1991), 362-366.

Leuchtenberger A., Mayer G., Enzyme and Microbial Technology, 14(1992)18-22.

Liao CH., J-Bacteriol., 173 (1991), 4386-93.

- Liu, K. y B.S. Luh., J. Food Sci., 43 (1978), 721-726.
- Maldonado MC., Navarro A., Callieri DAS., Biotechnol. Lett., 8 (1986), 501-504.
- Martinez MJ., Vazquez C., Diaz I., Reyes F., Microbiologica (Bologna), 11 (1988), 255-258.
- McEvoy JL., Murata H., Chatterjee AK., J. Bacteriol., 172 (1990), 3284-9
- McColloc, R.J and Kertesz, Z.I., Arch. Bioch., 13, 217 (1947).
- Mc Allan, J.W and Cameron, M.L., Can. J. Zool., 34, 559 (1956).
- Mec Donnell, L.R, Jung, R., Jansen, E.F and Lineweaver, H., Arch. Biochem. Biophys., 31, 431 (1951).
- Meyrath, J. y G. Volavsek., Enzymes in Food Processing, Ed. por G. Reed, Academic Press, New York (1975), pp. 255-300.
- Mikhailova RV., Sapunova LI., Lobanok AG., Rassadina GV., Applied Biochemistry and Microbiology, 27 (1991), 491-494.
- Mills, G.E., Biochem. J., 44, 302 (1949).
- Murad HA., Foda MS., Bioresource Technology, 41 (1992), 247-250.
- Naganishi, H., Patente japonesa No. 1538, Marzo 23 de 1954.
- Neubeck, CE., Enzymes in Food Processing, Ed. por G. Reed, Academic Press, New York (1975), pp. 397-442.
- Nishida T., Suzuki T., Kamino., Izaki K., Biochem-Biophys-Res-Commun 168(1990), 801-808.
- Nyiri, L., Proc. Biochem. Ag (1968), 27-30.

Ob,S, et al., Can. J. Microbiol, 30 (1984), 780-785.

Omaran H., Buckenhueskes H., Zapp B., Gierschner K., Enzymes in the Forefront of Food and Feed Industries., Food Biotechnol., 3 (1989), 59-70.

Pallmann, H, Matus, J., Deuel, H and Weber, F., Rec. Trav. Chim, 65, 633 (1946).

Pardo C., Lapena MA., Gacto M., Canadian Journal Of Microbiology, 37(1991), 974-977.

Pathak, AN, et al. Process Biochemistry, April (1973).

Perlman, D., Chem. Tech. July (1977), 434-442.

Phaff, HJ., Arch. Biochem. 13 (1947), 67-81.

Phaff, HJ., Arch. Biochem. 13, 67 (1974).

Pilnik, W y FM Rombouts., Develop. Food Sci., 2 (1979), 269-277.

Pilnik, W y FM Rombouts, Enzymes and Food Processing, Ed. por GG Birch N. Blakebrough y KL Parker, Applied Science Publishing, Ltd. London (1981), pp.105-128.

Pithawala, H.R, Savor, G.R and Screenivasan, A., Arch. Biochem., 17, 235(1948).

Platt, WC and Postos, A.L U.S. Patent 3058, 887, (1962).

Präve, P, Uve Faust, Wolfgang Sitting and Dieter A. Sukatsch, "Product Recovery in Biotechnology, Isolation of Enzymes, Enzymes", Fundamentals of Biotechnology, (Ed. Weinheim : VCH, 1989), pp. 279-513.

Quirk, AV, and J. Woodrow, Biotech. Letters, 1983, 5, 277-282.

Ravelomanana R, Guiraud JP, Galzy P., Syst. Appl. Microbiol., 8 (1986) 230-233.

- Ray J., Knapp J., Grierson D., Bird C., Schuch W., Eur. J. Biochem., 174(1988), 119-124.
- Reed, G, Prescott and Dunn's Industrial Microbiology (AVI, Westport, 1982) 4a edición.
- Rexova, L, et al., Collection Czechoslov. Chem. Common. 31 (1966).
- Rexová-Benková, L y O. Markovic, Adv. Carboh. Chem. Biochem. 33(1976), 323-385.
- Robbins, RH., Proc. Biochem. May (1968), 38-40.
- Rombouts, FM y W. Pilnik, Proc. Biochem. Ag (1978), 9-13.
- Rombouts, FM y W. Pilnik, Economic Microbiol., 5 (1980), 227-282.
- Round JJ, R.A. Liptak and W.C. McGregor : " Continuous-flow ultracentrifugation in preparative biochemistry "; in " Biochemical Engineering II "; Ann. N.Y. Acad. Sci. 369, (1981), 265-274.
- Saha, BC, et al., Biochem.J. 252 (1988), 343-348.
- Saito, H., J. Gen. Appl. Microbiol., 1 (1954), 38-60.
- Sánchez, R.S.:" El Desarrollo Biotecnológico en México ",Prospectiva de la Biotecnología en México, Quintero, R. R, (Fundación Javier Barros Sierra : Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 1985), pp. 130-365.
- Saval, SB., Producción de Pectinasas de *Aspergillus sp.* por Fermentación sumergida de la pulpa de henequén, (Tesis) Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M (1985).
- Schmidt-Kaster, G and CF Golker, " Downstream Processing in Biotechnology ", Basic Biotechnology, J. Bu'Lock y B kristiansen (Eds) (Academic Press, Londres, 1987) pp. 173-195.

- Schopplein E., Districh H., Deutsche Lebensmittel-Rundschau., 87(1991) 212-219.
- Schubert, E., Melliand Textilber., 8,1 (1954).
- Scottcraig JS., Panaccione DS., Cervone F., Walton JD. , Plant Cell, 2(1990), 1191- 1200.
- Sharma A., Joseph R., Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 8(1984),137-142.
- Silley P., Lett. Appl. Microbiol., 2 (1986), 29-31.
- Smith CJ., Watson CF., Morris PC., Bird CR., Seymour GB., Gray JE., Arnold C., Tucker GA., Schuch W., Harding S., et al., Plant-Mol-Biol., 14(1990), 369-379.
- Spok A., Stubenrauch G., Schorgendorfer K., Schwab H., Journal Of General Microbiology, 137 (1991), 131-140.
- Srivastava SK., Srivastava AK., New Bot., 9 (1982), 9-11.
- Stuzenberger F., Journal Of Industial Microbiology, 7 (1991), 243-249.
- Szajer, I., Acta Microbiol. Polon., 5 (1976), 51-56.
- Szajer, I., Acta Microbiol. Polon., 27 (1978), 237-242.
- Takahashi, T. and Y. Adachi , J. Biochem. , 91 (1982), 1719-1724.
- Tucker GA., Schuch W., Harding S., et al., Plant-Mol-Biol., 14 (1990), 369-379.
- Taylor, MJ y T. Richardson., Adv. Appl. Microbiol. 25 (1979), 7-35.
- Tuttobello, R y PJ Mill., Biochem. 79 (1961), 51-57.
- Ueda., J. Appl. Biochem. 4 (1982), 524-532.
- Urlaub, R., Proc. Biochem. Ag (1978), 14-18.

Velasco, JG., *Tecnol. Alim.* 3 (1968), 24-33.

Wang, DIC, CL Cooney, AL Demain, P Dunnill, AE Humphrey y M Lilly, *Fermentation and Enzyme Technology* (John Wiley & Sons, Nueva York, 1979).

Ward, OP : " Principles, processes and products ", *Fermentation Biotechnology*, (Ed. Englewood Cliffs, New Jersey : Prentice Hall, 1989) pp. 89-110.

Ward, M., *Aspergillus* and other filamentous fungi as genetic systems. *Modern Microbial Genetics.*, Willey-Liss., (1991).

Whitaker, J.R., *Enzyme Microb. Technol.*, 6 (1984), 341-349.

Wimborne, MP and P. A. D Rickard., *Biotech. Bioeng.*, 20 (1978), 231-242.

Wing RA, amaguchi J, Larabell SK, Ursin VM, McCormick S., *Plant-Mol-Biol.*, 14(1990), 17-29.

Yamamoto, K, et al., *Agric. Biol. Chem.* 52 (1988), 3015-3021.

Yamanobe, T, et al., *Agri. Biol. Chem.* 54 (1990), 301-307.

Zamasaki, M., T.asui and K. Arima., *Agr. Biol. Chem.*, 30 (1966), 142-148

Zetelaki-Horváth, K. y E. Békássy-Molnár., *Biotech. Bioeng.*, 15 (1973), 163-179.

Zetelaki-Horváth, K. y E. Békássy-Molnár., *Acta Alim.*, 4 (1975), 167-169.

Zetelaki-Horváth, K., *Proc. Biochem.*, 11 (1976), 11-18.

Zetelaki-Horváth, K. y K. Vas., *Biotech. Bioeng.*, 23 (1981), 2231-2241.

Zetelaki-Horváth, K., *Acta Alimen.*, 12 (1983), 11-19.

Zurbriggen, ED, et al., *J. Biotechnol.* 17 (1991), 133-146.