

2ej
126



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**“PRODUCCION DE ENZIMAS PECTICAS
POR FERMENTACION EN CULTIVO SOLIDO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Químico Farmacéutico Biólogo**

P R E S E N T A :

MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ

México, D.F.

1986



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 está 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.



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

Jurado asignado según el tema:

Presidente	Prof:	ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
V o c a l	" :	AGUSTIN LOPEZ-MUNGUIA CANALES
Secretario	" :	RAUL AGUILAR CABALLERO
1er. Suplente	" :	LOURDES ESCAMILLA HURTADO
2do. "	" :	MARCOS FRANCISCO BAEZ FERNANDEZ

Sitio donde se desarrolla el tema: Depto. de Biotecnología, Div. C.B.S., UAM, Iztapalapa, en el Depto. de Alimentos, División de Estudios de Posgrado y en el Depto. de Tecnología de Alimentos, Div. Est. Profesionales, Lab. 201. Facultad de Química, UNAM.

Asesor: DR. AGUSTIN LOPEZ-MUNGUIA CANALES

Asesor Técnico: QFB. ERIC ORIOL

Sustentante: TREJO HERNANDEZ MARIA DEL REFUGIO

Agustín López Munguía Canales

Eric Oriol

Maria del Refugio Trejo Hernández

A la Universidad

A mis padres y hermanos por ayudarme
a lograr una de mis metas.

Al Dr. Agustín López-Munguía C.
y al Q.F.B. Eric Oriol, bajo cuya
dirección realicé este trabajo,
gracias por su apoyo y confianza.

INDICE

CAPITULO I

	Página
1.- INTRODUCCION	1
OBJETIVO	4

CAPITULO II

2.- GENERALIDADES

2.1 Enzimas Pectinolíticas	
2.1.1 Naturaleza del Substrato	5
2.1.2 Clasificación de las Enzimas Péclicas	8
2.1.3 Métodos de Determinación de Actividad Enzimática	12
2.1.3.1 Pectinesterasa	12
2.1.3.2 Enzimas Despolimerizantes	13
2.1.3.3 Pectin-Liasa	14
2.1.3.4 Pectato-Liasa (PAL)	15
2.1.4 Características de las Enzimas Péclicas	16
2.1.4.1 Pectinesterasa (PE)	16
2.1.4.2 Endo-Poligalacturonasa (PG)	18
2.1.4.3 Exo-Poligalacturonasa (PG)	20
2.1.4.4 Endo-Pectato-Liasa (PAL)	21
2.1.4.5 Endo-Pectin-Liasa (PL)	23
2.1.4.6 Endo-Polimetilgalacturonasa (PMG)	23
2.1.5 Fuentes de Enzimas Péclicas	23
2.1.5.1 Distribución	23
2.1.5.2 Enzimas Pectinolíticas de Plantas	25
2.1.5.3 Pectinasas Microbianas	25
2.2 Producción de Pectinasas	27

CAPITULO III

3.- FERMENTACION EN CULTIVO SOLIDO

3.1 Definición	37
3.2 Antecedentes	37
3.3 Parámetros de la Fermentación Sólida	38
3.3.1 Humedad en el medio sólido	40
3.3.2 Aereación y Transferencia de Masa	41
3.3.3 Temperatura	42
3.3.4 El pH en el Medio Sólido	43
3.3.5 La Concentración del Inóculo	43
3.4 Sistemas de Fermentación Sólida	43
3.4.1 Fermentador de Tambor rotatorio	43
3.4.2 Fermentador de Charolas	44
3.4.3 Fermentador en Columnas	45

	Página
3.5 Comparación de la Fermentación en Cultivo Sólido y la Fermentación en Cultivo Sumergido	45
3.6 Producción de Metabolitos en la Fermentación Sólida	47
3.6.1 Producción de Proteína Microbiana.....	47
3.6.2 Producción de Enzimas en Cultivo Sólido.....	49
3.6.2.1 Producción de Amilasas.....	51
3.6.2.2 Enzimas Proteolíticas	51
3.6.2.3 Producción de Celulasas	52
3.6.2.4 Pectinasas	53
3.6.3 Producción de Ácidos Orgánicos	54
3.6.4 Producción de Micotoxinas	54

CAPITULO IV

4.-MATERIALES Y METODOS

4.1 Microorganismos	56
4.2 Preparación del Inóculo	56
4.3 Medios de Cultivo y Condiciones	57
4.3.1 Medio Sumergido	57
4.3.2 Medio Sólido	58
4.4 Método de Extracción de Enzimas Pécticas	60
4.5 Evaluación de los Parámetros de la Fermentación en Cultivo Sólido y en Cultivo Sumergido	60
4.6 Termoestabilidad de la Enzima	63

CAPITULO V

5.- RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Comparación de Cepas	66
5.2 Diseño del Medio de Cultivo Sólido	66
5.3 Pruebas en Cultivo Sólido	68
5.4 Extracción de Enzimas	69
5.5 Termoestabilidad de la Enzima	69

CAPITULO VI

6.-PRUEBA SEMIPILOTO

.....	75
-------	----

CAPITULO VII

7.-APLICACIONES DEL PRODUCTO

.....	80
-------	----

CAPITULO VIII

Página

8.-CONCLUSIONES 87

F ANEXO I 91

CAPITULO IX

9.-BIBLIOGRAFIA 96

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

En la actualidad la incipiente producción de enzimas, que se suscita en nuestro país, combinada con las crecientes aplicaciones en diversas áreas de la industria, no solo alimentaria, sino farmacéutica, química y otras; provoca que la mayoría de estas enzimas se adquieran en mercados externos, lo cual no resulta ser una garantía, ya que el desarrollo de tecnología basado en estos productos, implica riesgo de mayor dependencia económica y constante fuga de divisas.

Considerando que existe una gran cantidad de recursos naturales y sub-productos agroindustriales, los cuales deben ser aprovechados no sólo en la producción de enzimas, sino en la producción de una gran diversidad de productos farmacéuticos, químicos, etc., es necesario acoplar tecnologías adecuadas para lograr este objetivo. Una de las alternativas de empleo, la constituye la producción de enzimas, de manera que por un lado se resuelva la necesidad en materia de productos enzimáticos y por otro lado, se implementen alternativas de industrialización de residuos agrícolas.

Las enzimas han sido utilizadas desde hace varios años en el campo agroalimentario, tanto para mejorar las propiedades de ciertas materias primas, así como para transformarlas.

La tendencia actual de utilización de enzimas para la manufactura o procesamiento de diversidad de alimentos es cada vez mayor, por lo que es necesario implementar tecnologías para su producción a mayor escala y para su uso en forma continua.

Las ventajas que representa su uso son las siguientes:

- a) Son de origen natural

- b) Son específicas en su forma de acción
- c) Funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH, por lo que no requieren condiciones drásticas que pueden alterar la naturaleza, ni la calidad del alimento y no requieren equipo costoso.
- d) Actúan a bajas concentraciones y su velocidad de reacción puede ser controlada en condiciones óptimas de pH, T °C, tiempo de proceso y concentración de enzima para un proceso determinado.
- e) Son fácilmente inactivadas, después de haber alcanzado el cambio deseado.

Aunque sus principales limitaciones son el costo y su disponibilidad, actualmente se realizan esfuerzos para producirlas con tecnología propia, minimizando los costos de producción, mediante el uso de subproductos agroindustriales.

La fuente más común de enzimas comerciales utilizadas en alimentos son los microorganismos, aunque también se comercializan enzimas de origen vegetal y animal.

Las enzimas microbianas presentan más ventajas, ya que los microorganismos pueden crecer rápidamente en diferentes condiciones, de manera que es factible la producción de cantidades ilimitadas de enzimas a cualquier escala, más aún si se trata de enzimas extracelulares, porque no requieren de operaciones sofisticadas de recuperación.

Una de las áreas importantes en la Industria de Alimentos en la cual las enzimas tienen un papel relevante, debido a su efecto sobre la textura de los alimentos, es la Industria de Procesamiento de Frutas (8, 96). El sustrato de interés es la pectina y las enzimas que de alguna manera modifican esta substancia son conocidas como enzimas pécticas. Las aplicaciones más importantes de estas enzimas se ubican en la extracción de jugos de frutas (114), en la clarificación de estos mismos principalmente manzana y uva (97,4); en la manufactura de productos de la hidrólisis de la pectina (49,53), en el enria-

do de fibras textiles; en el curado de café y tabaco (93), recientemente en procesos de extracción de aceite de coco (17) y otras (111, 27, 39, 11).

Las enzimas pécticas tienen efecto, no sólo en forma exógena como se cita anteriormente, sino también en forma endógena, ya que están presentes en muchas frutas y vegetales y provocan cambios en éstos, durante su almacenamiento, jugando un papel importante en la acción de ablandamiento.

Dada la importancia de estas enzimas se han realizado múltiples investigaciones relacionadas con sus características bioquímicas, cinéticas, de producción y de aplicación.

Los sistemas de producción convencionales de enzimas pécticas son el cultivo sumergido y el cultivo sólido. En el primero se incluyen los componentes básicos para el crecimiento microbiano: carbohidratos que pueden provenir de melazas y cereales; una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, minerales traza y otras sustancias que favorezcan la producción de las enzimas. Se requiere de un inductor, que en este caso es la pectina, la cual puede ser adicionada pura o mediante algún material que la contenga, como pulpa de cítricos, bagazo de manzana, pulpa de remolacha, etc.

Para el cultivo sólido se utiliza generalmente un soporte inerte o que pueda ser fuente de nutrientes para la fermentación. Los materiales más comúnmente utilizados son materiales celulósicos o lignocelulósicos, como salvado de trigo y arroz, bagazo de caña, etc. La mezcla de nutrientes, junto con el inóculo son disueltos en agua y posteriormente absorbidos en el material sólido. La humedad factor de suma importancia en el proceso sólido, depende del material con el que se trabaje.

Las enzimas pécticas son sintetizadas por plantas superiores, hongos, levaduras y algunas bacterias. Entre los hongos se encuentran los del género Aspergillus (A. niger, A. wentii, A. oryzae, etc) entre otros. Los microorga-

nismos son capaces de sintetizar más de una enzima p \acute{e} ctica, por lo que pueden obtenerse mezclas altamente activas de pectinasas. Esto depende del microorganismo, del sistema de produccion y de las condiciones del proceso.

Hasta el momento la produccion de enzimas se ha realizado con más frecuencia en cultivo sumergido. El desarrollo de tecnología del cultivo sólido para la produccion de enzimas, es incipiente en nuestro país. En otros países como Japón esta tecnología ha sido más estudiada. Aunque existe poca investigacion al respecto, comercialmente hay enzimas extracelulares producidas por este sistema.

En general los extractos crudos de amilasas, proteasas, celulasas y pectinasas pueden obtenerse utilizando parcialmente este sistema de cultivo. Los extractos crudos pueden ser luego purificados mediante técnicas convencionales usadas para las enzimas obtenidas en cultivo sumergido.

Recientemente se han desarrollado investigaciones sobre la utilizacion de la fermentacion en cultivo sólido, como alternativa para la produccion de proteína microbiana y para la produccion de enzimas extracelulares. Siendo los hongos filamentosos los microorganismos más interesantes, dado que permiten la utilizacion de residuos agroindustriales mediante tecnología relativamente simple, así como operaciones de recuperacion sencillas.

Considerando que existe ya investigacion con respecto al uso del sistema en cultivo sólido y tomando en cuenta la importancia de las enzimas p \acute{e} cticas en la Industria Alimentaria, es factible desarrollar un proceso de fermentacion en cultivo sólido para su produccion, siendo éste, el objetivo principal del presente trabajo.

OBJETIVO

Desarrollar un proceso de produccion de enzimas p \acute{e} cticas por fermentacion en cultivo sólido.

CAPITULO II

2. GENERALIDADES

2.1 Enzimas pectinolíticas

2.1.1 Naturaleza del Substrato

Las plantas contienen varios tipos de polisacáridos. Estos incluyen almidón, celulosa, hemicelulosa, sustancias pécticas y otros polisacáridos, tales como los arabinogalactanos y glucuronomannanos. Las sustancias pécticas están concentradas en las membranas celulares intermedias de los tejidos.

Estas en el tejido intacto, son insolubles y son frecuentemente referidas como protopectina. La insolubilidad de estas sustancias puede ser función del tamaño de los polímeros presentes, así como la presencia de cationes divalentes como el calcio, o de su asociación con la celulosa (111).

Las sustancias pécticas son polisacáridos formados principalmente por unidades de ácido D-galacturónico, unidos mediante enlaces glicosídicos α (1-4). Los grupos carboxílicos de las unidades de azúcar pueden estar parcialmente esterificados por grupos metilo o parcial o totalmente neutralizados por una o más bases (23).

Este grupo de polisacáridos se clasifica de la siguiente manera: pectinas, definidas como un material polimérico soluble, en el cual aproximadamente 75% de los grupos carboxilos de las unidades de ácido galacturónico están esterificados con metanol; ácido péctico, es un polímero soluble en el cual los grupos metoxilos han sido removidos totalmente de las unidades de ácido galacturónico. El ácido péctico es formado después de la desintegración de los tejidos, vía acción de la (PE) pectinesterasa presente en éstos, (96).

Los ácidos pectínicos son polisacáridos que tienen esterificados parte del ácido D-Galacturónico con grupos metil-éster.

Dentro de la misma cáscara de la fruta existe distribución de las pectinas, fig. 1; las de mayor grado de esterificación se localizan en la parte interna, mientras que las de menor grado en la periferia (23). El contenido de pectina varía según la fuente de extracción. La tabla 1, lista los porcentajes de contenido de pectina en diferentes materiales. El porcentaje varía de 0.62% en zanahorias (base húmeda) a 5.5% en pulpa de naranja, en base seca el rango es de 15% en manzana a 40% en pulpa de naranja (111).

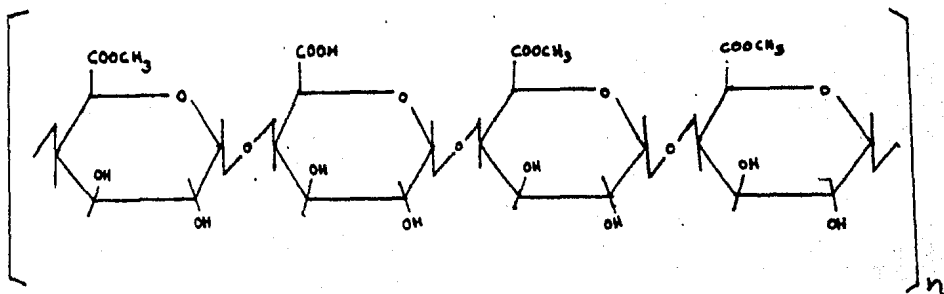


Fig. 1. Estructura típica de la pectina vegetal.

TABLA I
Porcentaje de pectina en algunos materiales

FUENTE	% PESO HUMEDO	% PESO SECO
Manzana	1.5 --- 2.5	15 --- 18
Pulpa de limón	2.5 --- 4.0	30 --- 35
Pulpa de naranja	3.5 --- 5.5	30 --- 40
Pulpa de remolacha	1.0	25 --- 30
Zanahorias	0.62	7.1

Ref. (111).

La textura de vegetales y frutas es profundamente influenciada por el tipo y la cantidad de pectina presente.

La protopectina que se encuentra en las frutas sin madurar, es transformada a un polímero soluble, la pectina, durante la maduración. Esta solubilización de la pectina de los tejidos es una transformación económicamente importante en el almacenamiento de frutas y vegetales (23).

Los polisacáridos pécticos son solubles en agua y glicerol caliente. Son insolubles en solventes orgánicos. En el caso de disolución en agua, ésta decrece con el aumento de las cadenas largas del polímero. Una solución acuosa (de 1 a 2% P/V de pectina), presenta alta viscosidad. La viscosidad de las soluciones de pectina en agua depende del peso molecular y está influenciada por el grado de esterificación, fuerza iónica, pH, temperatura, y concentración del polisacárido.

La pectina de bajo metoxilo es una pectina de bajo grado de esterificación. Es tecnológicamente importante debido a que puede formar geles sin azúcar en presencia de iones calcio, así como en presencia de azúcar y ácido.

Muchas de las propiedades físicas de las sustancias pécticas están asociadas con el grupo carboxilo de los residuos de ácido galacturónico. La completa esterificación de la pectina comercial por medios químicos modifica totalmente sus propiedades de acidez, viscosidad y formación de geles. Los cambios en pH no tienen influencia apreciable en la viscosidad de pectinas totalmente esterificadas. Sin embargo el pH tiene un efecto pronunciado sobre las pectinas de bajo metoxilo y ácido péctico, ya que ocurre una asociación de moléculas a bajo pH, con lo cual la viscosidad se incrementa y puede dar lugar a una precipitación (23).

La mayoría de las materias primas para la producción de pectina son subproductos de la manufactura de jugos de fruta, principalmente de manzana y cítricos.

La calidad y las operaciones físicas y las químicas usadas en la industria primaria, afectan la calidad de la pectina obtenida de estos subproductos.

La pectina extraída de diferentes tejidos de plantas varía considerablemente en sus propiedades y también en sus usos comerciales. En suma, la fuente y el método de extracción son muy importantes, ya que determinan las propiedades del producto final. Esto implica también una variación del grado de esterificación y gran dificultad para producir un producto uniforme y estandarizado.

Actualmente se han incrementado los procesos de obtención de pectina de gran parte de los subproductos de frutas y vegetales de la industria, lo cual implica facilidad de adquisición de este sustrato importante en la producción de enzimas pécticas.

2.1.2 Clasificación de las enzimas pécticas

Las enzimas pécticas están presentes en plantas superiores y son sintetizadas por microorganismos [Fogarty y Ward, (23)]. Las primeras son referidas como enzimas nativas, las cuales pueden producir cambios de textura en frutas y vegetales durante su almacenamiento y procesamiento.

Las enzimas pécticas son glucosidasas, liasas y estererasas, las primeras depolimerizan las cadenas de las moléculas sin afectar el grado de esterificación mientras que las últimas deesterifican la molécula sin cambiar el grado de polimerización (82).

Clasificación de Enzimas Pécticas (23).

A. Pectinesterasa (PE). Transforma la pectina en ácido péctico por la deesterificación de residuos de metoxilo. Hidroliza el éster formado por el metanol y el grupo carboxílico del ácido galacturónico.

B. Depolimerizantes: Acción sobre pectina y ácido péctico

1. Sobre pectina

a) Polimetilgalacturonasa (PMG)

Endo PMG - Rompimiento al azar de los enlaces α (1-4) de la pectina.

Exo PMG - Rompimiento en forma secuencial de los enlaces α (1-4) de la pectina.

b) Polimetilgalacturonato-liasa (PMGL)

Endo PMGL - Rompimiento al azar de los enlaces α (1-4) de la pectina, por un proceso de transeeliminación, el cual resulta en la formación de ésteres galacturónicos con enlaces insaturados entre C₄ y C₅ y sin reducción final del fragmento.

Exo PMGL - Causa un grado de separación de los enlaces de la pectina, por un proceso de transeeliminación.

2. Sobre ácido péctico

a) Poligalacturonasas (PG)

Endo PG - Causa hidrólisis al azar de los enlaces α (1-4) del ácido péctico.

Exo PG - Causa hidrólisis en forma secuencial de los enlaces α (1-4) glucosídicos del ácido péctico.

b) Poligalacturonato - liasa (PGL)

Endo PGL - Rompimiento al azar de los enlaces α (1-4), glucosídicos del ácido péctico, por el proceso de transeeliminación.

Exo PGL - Rompimiento secuencial de los enlaces α (1-4) glucosídicos del ácido péctico por el proceso de transeeliminación.

Estas enzimas son también conocidas en los siguientes grupos (81, 82, 111)

a) Poligalacturonasas (PG)

b) Pectinesterasas (PE)

c) Pectato-liasas (PAL)

d) Pectin-liasas (PL)

La tabla 2, muestra una clasificación general de las enzimas pécticas que teóricamente pueden existir; en la fig. 2 se muestra la forma de actuar de estas enzimas.

TABLA 2

CLASIFICACION DE PECTINASAS

A) Pectinestearasa EC 3.1.1.11

sustrato:
pectina

hidrolasas

endo-polimetilgalacturonasa
EC 3.2.1.41
exo-polimetilgalacturonasa

liasas

endo-polimetilgalacturonato-liasa
EC 4.2.2.3
exo-polimetilgalacturonato-liasa

B) Despolimerizantes

sustrato:
ácido péctico

hidrilasas

endo-poligalacturonasa EC 3.2.1.15
exo-poligalacturonasa EC 3.2.1.40

liasas

endo-poligalacturonato-liasa
EC 4.2.2.1
exo-poligalacturonato-liasa
EC 4.2.2.2

La exo-polimetilgalacturonasa y la exo-polimetilgalacturonato-liasa no existen (23), también existen exo-poligalacturonato-liasas que muestran mayor actividad en oligómeros que en moléculas grandes de ácido péctico (29).

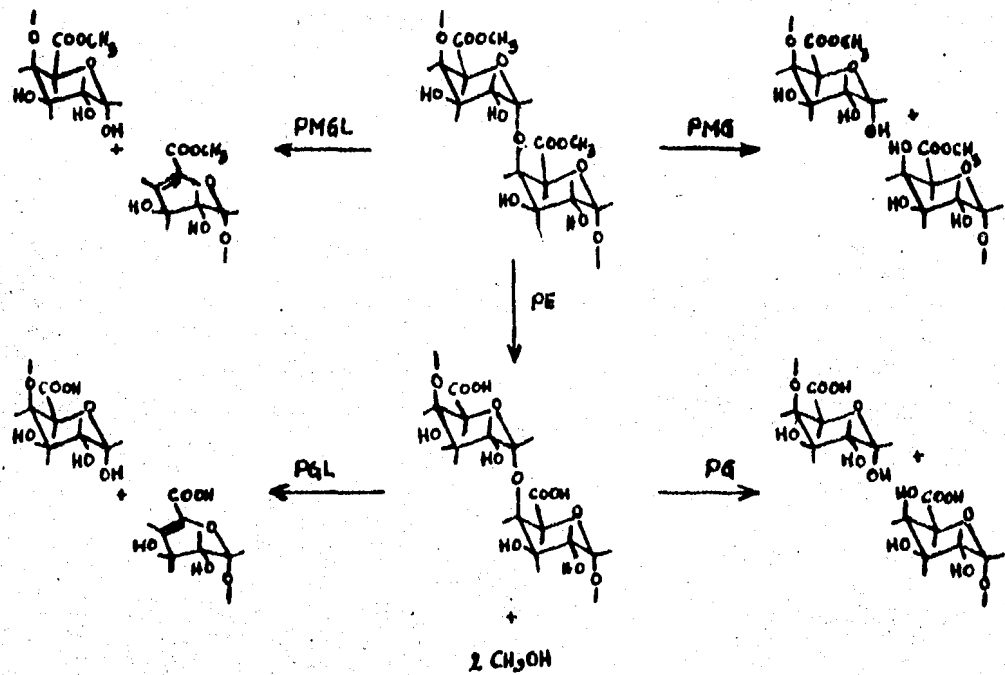


FIG. 2

VÍAS DE ACCIÓN DE LAS PECTINASAS

2.1.3 Métodos de Determinación de la Actividad Enzimática

La medición de actividad enzimática se realiza por métodos cualitativos y cuantitativos, entre los cuales se encuentra la medición de la actividad en términos de los enlaces hidrolizados por la acción de estas enzimas. Algunos en forma directa, (cuantitativamente), otros indirectamente (cualitativa mente). Debido a que las enzimas pécticas forman un complejo de enzimas que actúan de diferente manera sobre las sustancias pécticas, es conveniente conocer los métodos para la determinación de su actividad.

2.1.3 Pectinesterasa

Las pectinas son enzimáticamente de-esterificadas por la PE y es transformada a pectina de baja esterificación o ácido péctico. En ambos casos la aparición de grupos carboxilo libres (34, 35, 36, 111) y metanol libre puede ser usado para medir la actividad por titulación automática (pH, Stat.), cromatografía de gases para la determinación de metanol (32, 35, 36, 113), entre otros.

La PE tiene alta especificidad por el grupo metil éster del ácido poligalacturónico, pero puede también hidrolizar a los grupos etil, propil, alil, ésteres del ácido poligalacturónico (51), pero con menor grado de hidrólisis y velocidad que el primero.

Existen otros procedimientos reportados en la literatura (21, 35). En el estudio realizado por Kertesz (36), propone una discusión sobre los métodos más comunes sobre la determinación de actividad de la PE y los factores que influyen en estas determinaciones. Define también una unidad de actividad como la actividad expresada en miligramos de metanol liberados en 30 minutos por mililitro o gramo de enzima o miliequivalente de éster hidrolizado por minuto por gramo de enzima. Algunas modificaciones al método de Kertesz son propuestas por Lineweaver (46) y Mc Colloch y Kertesz (52).

Para las pectinesterasas la afinidad por el sustrato se incrementa con la disminución del grado de esterificación de las pectinasas de plantas. Aun-

que las PE fungales tienen mayor afinidad por substratos altamente esterificados (81, 82).

2.1.3.2 Enzimas Despolimerizantes

a) Poligalacturonasas

Para las enzimas despolimerizantes existen infinidad de métodos que de terminan los enlaces hidrolizados, midiendo para esto la aparición de los grupos reductores producidos por la acción de estas enzimas.

Uno de los métodos más utilizados para la determinación de PG, es el método del ácido 3, 4 dinitrosalicílico, para determinar la aparición de grupos reductores (61,10). Una modificación a este método es el propuesto por Wang et.al (109), en el cual se omite la presencia de las sales de Rochelle, que provocan interferencias cuando llegan a precipitarse.

También puede detectarse por la prueba de Nelson-Somogyi (56, 99), usando como estándar ácido galacturónico. Definiendo una unidad de PG, como la cantidad de enzima que libera una micromol de grupos reductores por minuto y bajo condiciones específicas.

Una modificación del método de Hipoidato de Willstätter y Schudel (112) por Jansen y Mc Donnel (33), ha sido muy usado en algunos trabajos. Este método colorimétrico de Hipoidato ha sido descrito por Mill y Tuttobello (59). Puede emplearse también el método modificado del Ácido Tiobarbitúrico para determinar el rompimiento de los enlaces (67).

La medición del decremento en la viscosidad es uno de los métodos más sensibles para la determinación de la actividad de la PG. Sin embargo no hay una relación directa entre el grado de disminución de la viscosidad y el número de enlaces glucosídicos hidrolizados a lo largo de la cadena del polímero.

La hidrólisis del enlace glucosídico cercano a la mitad de la cadena del polímero, tiene más efecto sobre la viscosidad, que la hidrólisis cerca na al final de la cadena. De aquí que sea posible determinar el carácter en do o exo de las enzimas. La reducción de la viscosidad en un 50% es acompa ñada por el rompimiento de únicamente 2 a 3% de los enlaces glucosídicos, cuando el mecanismo enzimático es de tipo endo. Cuando la reducción de viscosidad es del 50% pero el mecanismo es exo, el rompimiento de enlaces es de aproximadamente el 20% (23). Existen otros métodos más sofisticados para la determinación de la actividad PG-liasa (67) y para PG (21).

Tuttobello y Mill (105), proponen una unidad de actividad por disminu ción de viscosidad como la cantidad de enzima que reduce la viscosidad de un ml de una solución al 1% de pectato de sodio o pectina, al 50% en 20 min bajo condiciones específicas, usando pipetas graduadas de 0.1 ml como viscosímetro. Este mismo método es propuesto por Barerman (7), Capellini (15), Nagel y Vaughn (71) entre otros.

2.1.3.3 Pectin-liasa

El ácido poligalacturónico altamente esterificado puede ser despolime rizado por (Poli (metil galacturónido) liasa) E.C. 4.2.2.10. Todas las Pec tin-liases conocidas son enzimas de tipo endo, las cuales despolimerizan las pectinas de alto metoxilo al azar, causando una rápida disminución de la viscosidad. La enzima hidroliza únicamente los enlaces glucosídicos próximos al grupo metil éster, como se muestra en la fig. 3. (82).

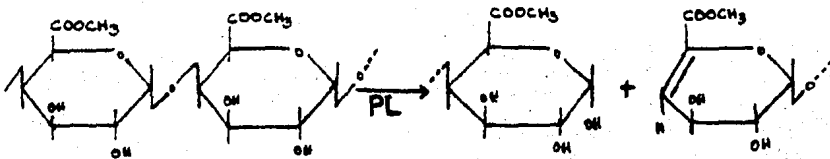


Fig. 3. Modo de acción de la Pectin-liasa.

Se ha demostrado que el mejor sustrato para la PL es una pectina altamente esterificada, ya que a diferentes grados de esterificación, la afinidad por el sustrato es más pequeña para la pectina de baja esterificación, (81, 82, 108). Para medir la actividad PL se utiliza el decremento en viscosidad en pectinas con 70% de esterificación, y para diferenciarlas de las enzimas de hidrólisis puede usarse también un método espectrofotométrico midiendo el incremento en absorbancia a 235 nm. Debido a la formación de un doble enlace (C_4-C_5), esto puede ser usado como medida del grado de despolimerización (22). Una unidad de actividad de PL libera una micromol de productos insaturados por minuto bajo condiciones específicas. La velocidad y el grado de hidrólisis se incrementa rápidamente con el incremento del grado de esterificación (83).

2.1.3.4 Pectato-liasa (PAL)

Las Pectato-liasas (Poli (1-4 D-galacturónido) liasa) E.C. 4.2.2.2, antiguamente EC 4.2.9.9.3, rompe los enlaces glucosídicos por transeliminación del hidrógeno en C_4 y C_5 . Las pectinas parcial o totalmente deesterificadas, la pectina de bajo metoxilo o el ácido poligalacturónico pueden ser despolimerizados por liasas (81,82).

Las endo pectato-liasas rompen las cadenas al azar y las exo pectato-liasas liberan dímeros insaturados de la reducción final de la cadena. El mejor sustrato para la endo pectato-liasa es la pectina de bajo metoxilo y para la exo pectato-liasa es el pectato. La actividad PAL puede ser determinada por la medición, por el incremento en absorbancia a 235 nm, debido a la formación del doble enlace. Los métodos usados para la determinación de actividad PL pueden ser aplicados para actividad PAL excepto por el sustrato que es diferente. El ácido Etilendiaminotetracético (EDTA) es generalmente un inhibidor de la actividad PAL, ya que este es un agente quelante del calcio y todas las Pectato-liasas tienen requerimientos de estos iones (111).

2.1.4 Características de las enzimas pécticas

2.1.4.1 Pectinesterasa (PE)

La Pectinesterasa es muy específica. Los ésteres de glicol y glicerina del ácido péctico no son atacados por esta enzima, solo algunos ésteres no-galacturónidos son de-esterificados pero muy lentamente, a diferencia de la pectina natural (36). La especificidad de la PE de diferentes plantas (alfalfa, naranja y tomate) y una de origen fungal fueron estudiadas por Mc Donnell et. al (51). La PE de naranja es más específica sobre pectina que sobre cualquier otro sustrato probado. El fenil-acetato y fenil-propionato son buenos sustratos para las PE de plantas y de hongos, aunque los mejores sustratos reportados fueron: el Metil-poliglacturonato y el Etil-poligalacturonato, (52).

Una PE comercial de origen fungal fue caracterizada por Calesnick et.al (13). Esta enzima es activa en un rango de pH 2.0-6.5, con óptima actividad a pH 5.0. Su óptimo de temperatura está entre 30-40 °C; arriba de 50°C es inactivada. Las condiciones para inactivación total son: 62°C por 30 minutos a pH 3.5. Esta PE fungal puede ser activada con pequeñas cantidades de NaCl y CaCl₂, siendo más sensible a los iones calcio que a los iones sodio.

Las PE de plantas también incrementan su actividad con cationes divalentes y pH 6.0, la máxima activación encontrada es a una concentración óptima de 0.03 M (50). La PE de plantas es más resistente al calor; arriba de 60°C la enzima es gradualmente inactivada. A pH 4.0 y 80°C, la enzima puede ser inactivada en pocos segundos (50). Todas las PE presentes en frutas son inhibidas por altas concentraciones de azúcares (18). Otros inhibidores son polifenoles y detergentes. La tabla 3, lista algunas propiedades importantes de las PE y sus fuentes (82).

TABLA 3

Propiedades de las pectinesterasas (82)

Fuente de enzima	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico	Actividad Específica (u/mg protein)	pH óptimo	Valor de km para pectino (mg/ml)
FRUTAS					
Plátano Ia.	30 000	8.9	457	6.0	
Ila.	30 000	9.4	529	6.0	
Naranja (<i>Citrus natsudaidai</i>)			2200	8.0	2.3
Naranja (<i>Citrus sinensis</i>) Ia	36 200	10.0	694	7.6	0.083
Ila.	36 200	11.0	762	8.0	0.0046
Ciruela (<i>Prunus salicina</i>)			25	7.5	0.1
Tomate ^a	27 500		1150	6-9	0.74
Tomate ^a	26 300	8.4			
Tomate			724	8.0	2.40
Tomate ^a	27 800				
HONGOS					
<i>Acrocyliudrium</i>				7.5	0.7
<i>Coniothyrium diplodiella</i> Ia				4.8	
Ila				4.8	
<i>Corticium rolfsii</i> ^b	37 000			3.5	
<i>Fusarium oxysporum</i>	35 000		203	7.0	
BACTERIA					
<i>Clostridium multifementans</i>	400 000		48	9.0	0,74

^a Múltiples formas moleculares^b Activa pH bajo, estable en un intervalo

Fuente: Pilnik y Rombouts (82)

2.1.4.2 Endo-Poligalacturonasa

El pH óptimo de la endo-PG se encuentra generalmente en el rango de 4.0-5.5, a excepción de algunas enzimas que tienen su óptimo a un pH bajo. Los valores óptimos de pH para la hidrólisis de pectato y tetragalacturonato por PG de levaduras son 4.4 y 3.4 respectivamente (20).

Generalmente los productos finales de la endo PG son ácidos mono y digalacturónicos, aunque algunas veces son oligalacturónidos, dependiendo del tiempo de digestión del sustrato.

La acción de la endo PG de levaduras, se efectúa en varias etapas en la digestión del sustrato: la primera es un rompimiento rápido del ácido péctico a di, tri y tetrameros, seguida de una hidrólisis lenta del tetramero a mono y trimeros y en una última etapa más lenta, el trimero es degradado a mono y dímero. Una endo PG típica no degrada el digalacturonato (20).

La endo PG de A. niger, obtenida por Mill y Tuttobello (59), retiene 30% de la actividad residual después de 30 minutos de incubación a 80°C y pH 6.0. El pH de estabilidad para la endo PG es el mismo pH de óptima actividad.

Rexová-Benková (88,89) estudiaron la endo PG producida por A. niger. Esta enzima es activa en un rango de pH de 3 a 5 y tiene un máximo de actividad a pH de 3.5-4. La temperatura óptima de la endo PG se encuentra entre 35-40°C. Para temperaturas entre 45-50°C, la actividad de la endo PG cae rápidamente y arriba de 50°C, se inactiva. La endo PG de A. niger es relativamente estable. A 20°C su actividad no cambia en 24 horas, a 30°C pier de 13% de su actividad en el mismo tiempo. A temperaturas mayores de 30°C, la actividad de la enzima cae marcadamente. A 50°C pierde el 72% en 30 minutos y en 24 horas la actividad es nula (38).

La máxima degradación del ácido péctico catalizada por la endo PG se obtiene a pH 3.6 y 30°C.

TABLA 4

Propiedades de la Endo-Poligalacturonasa

Fuente de enzima	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico	Actividad Específica (u/mg protein)	pH óptimo	Valor de Km para pectina (mg/ml)
FRUTAS					
Tomate	52 000		47	4.5	2.7
Tomate Ia.	84 000			4.5	
Ila.	44 000			5.0	
HONGO					
Aspergillus niger Ia.		3.8		4.0	
Ila.				4.5	
Illa.		4.5		5.5	1.7
Aspergillus niger Ia.	35 000		81	4.1	
Aspergillus niger Ila.	85 000		44	3.8	
Aspergillus niger	46 000		75	5.0	0.54
Aspergillus japonicus	35 500		1362	4.5	
Botrytis cinerea	69 000		2049	4.0	1.2
Fusarium oxysporum Ib.	37 000	7.0	194	5.0	
Iib.	37 000	7.0	148	5.0	0.54
Rhizoctonia fragariae Ib.	36 000	6.8	1866	5.0	0.80
Iib	36 000	7.1	1845	5.0	0.75
Rhizopus arrhizus	30 300		92	5.0	0.54
Trichoderma Konigii Ib.	32 000	6.41		5.0	0.80
Iib.	32 000	6.57		5.0	0.85
Verticillium albo-atrum	30 000		2075	6.5	1.5
LEVADURAS					
Kluyveromyces fragilis			168	4.4	
BACTERIA					
Erwinia carotovora			362	5.3	
Pseudomonas cepacia			125	4.5	

a Múltiples formas moleculares

b Isoenzimas, glucoproteínas

Fuente: Pilnik y Rombouts (12).

1101

Para la endo PG de tomate, el pH óptimo es de 4.5 y una temperatura óptima de 55°C. La inactivación por pH es arriba de 7 o abajo de 3. La inactivación por temperatura es importante a 70°C. Montáñez et. al. (64), determinaron el efecto del NaCl como activador de la endo PG. La concentración óptima encontrada fue de 0.2 M, pero a concentraciones mayores se observa una inhibición de la actividad.

La Poligalacturonasa puede ser inhibida por urea (98), glicina (77) y formaldehído (55), entre otros.

En solución, la poligalacturonasa se protege contra la inactivación térmica, por adición de alginatos, glicerol y algunas veces sacarosa, Kertesz (37). En la Tabla 4, se listan algunas propiedades de la endo PG.

2.1.4.3 Exo-Poligalacturonasa

Las exo PG son encontradas en plantas superiores y hongos. Las enzimas de plantas (zanahorias) tienen un pH óptimo entre 4.0-6.0 y producen ácidos monogalacturónicos como productos finales.

Aspergillus niger produce dos exo PG. La primera tiene un óptimo de pH en 4.4-4.6. La enzima es activada en presencia de iones mercúricos (Hg^{2+}), su temperatura óptima de 30°C. Es estable en soluciones ácidas. Se inactiva a una temperatura mayor a 50°C, (57). Separa la segunda exo PG, que tiene un pH óptimo a 5.0-5.1. La velocidad de hidrólisis es mayor para el ácido digalacturónico y trigalacturónico y menor para el ácido péctico. La enzima no actúa sobre pectina. Esta enzima retiene 48.5% de su actividad a 50°C en 10 minutos. Cuando es calentada a 50°C a pH 2.5 por una hora, retiene 4.5% de su actividad (58).

2.1.4.4 Endo Pectato-liasa (PAL)

El pH óptimo de la endo PAL generalmente está entre 7.0-10.0 (ref. tabla 5, esto es importante ya que ayuda a distinguirla de la PG. Otra dife-

rencia importante entre hidrolasas pécticas y liasas es la activación por iones calcio, entre otros cationes divalentes.

La actividad endo Pectato-liasa puede ser inhibida por el EDTA, agente secuestrante de iones calcio. El cloruro de calcio, además de ser un activado: de la enzima endo PAL, proporciona una acción protectora contra la inactivación térmica de la endo PAL de B. pumilus (19). En general las endo Pectato-liasas son resistentes a la desnaturalización por calor.

El producto final más abundante en la degradación de pectato por la endo PAL es un ácido digalacturónico insaturado. También puede encontrarse el ácido trigalacturónico. Un monogalacturonato insaturado es producido como un producto final, junto con el di y trimero por la endo PAL de Bacillus sp., caracterizada por Nagel et. al (70).

La Poligalacturonato-liasa de Erwinia carotovora (66), tiene un pH óptimo de 8.5 y su producto final de degradación es ácido digalacturónico insaturado. A concentraciones de cloruro de calcio arriba de 2.5×10^{-4} M se estimula la reacción cuando el ácido poligalacturónico es usado como sustrato. Hay una completa inhibición de la actividad endo PAL por la presencia de 3×10^{-5} M de EDTA. La adición de 0.001 M de CaCl_2 , restituye la actividad original.

En la tabla 5, se observa que el pH en general de las endo PAL encontradas, se restringe de 8 a 10.0 como rango óptimo. Además de que las fuentes principales de endo PAL son bacterias.

2.1.4.5 Endo Pectin-liasa (PL)

Las endo PL reportadas en la literatura son todas de origen fungal sólo es producida una endo PL de una bacteria Erwinia aroideae. El pH óptimo en-

TABLA 5

Propiedades de la Endo-Pectato-Liasas (82)

Fuente de enzima	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico	Actividad Específica (u/mg protein)	pH óptimo	Valor de km para pectato (mg/ml)
BACTERIA					
<i>Bacillus polymyxa</i> ^a				8.3-9.6	0.056-0.0065
<i>Bacillus subtilis</i>	33 000	9.85		8.5	
<i>Erwinia aroideae</i>	37 000			9.1	
<i>Erwinia carotovora</i>			90	8.5	
<i>Erwinia chrysanthemi</i> ^a	30 000-36 000	9.4-4.6		9.8-8.2	
<i>Erwinia Chrysanthemi</i>		9.4	320	9.0	
<i>Erwinia rubrifaciens</i>	41 000	6.25	450	9.5	5.0
<i>Pseudomonas Fluorescens</i>	42 300	10.3	956	9.4	0.10
<i>Streptomyces fradiae</i>			176	9.1	
<i>Xanthomonas campestris</i>			1050	9.5	
HONGOS					
<i>Cephalosporium</i>			364	9.9	0.018
<i>Hypomyces solani</i> ^a	32 000-42 000	10.2-10.5		8.5	

^a Múltiples formas moleculares

Fuente: Pilnik y Roubouts (82)

contrado fluctúa en un rango de 5.0 a 8.7.

El mejor sustrato de la Pectin-liase es una pectina altamente esterificada. La endo PL de A. niger degrada el sustrato a trimetil-galacturonatos. Las propiedades más importantes de la endo PL se listan en la tabla 6.

2.1.4.6 Endo Polimetilgalacturonasa (PMG)

La endo PMG aislada de A. niger es activada a 4.5 y 8.0 de pH. Su óptimo es de 6.5-7.0. Su temperatura óptima es de 35°C. Esta enzima es estable a 50°C, siendo más estable que la endo PG; su actividad cae en un 54% de la actividad original, mientras que la endo PG la pierde totalmente. A pH 6.8 y una temperatura de 30°C, alcanza su máxima actividad sobre ácido pectínico (96.8% de grado de esterificación, peso molecular 26700). Esta enzima no existe como un componente separado del complejo de enzimas pécticas por lo que siempre se le encontrará formando parte de mezclas de enzimas pécticas (88).

2.1.6 Fuentes de enzimas pécticas

2.1.6.1 Distribución

Las pectinasas se encuentran en gran variedad de plantas donde catalizan cambios en la estructura de las sustancias pécticas durante el crecimiento y desarrollo de la planta. Las pectinasas son producidas por muchos microorganismos, los cuales han sido una fuente importante de enzimas de uso industrial. Los microorganismos pectinolíticos del suelo juegan un papel esencial en la biodegradación de materiales de plantas muertas.

2.1.6.2 Enzimas pectinolíticas de plantas

Las enzimas pécticas han sido detectadas en diversidad de plantas y particularmente en sus frutos. La Pectinesterasa (PE), es la enzima más abundan

TABLA 6

Propiedades de la Endo-Pectin-Liasas

Fuente de enzima	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico	Actividad Especifica (u/mg proteína)	pH óptimo	Valor de km para pectina (mg/ml)
HONGOS					
<i>Alternaria mali</i> I	28 000		176	8.7	
II	31 000		577	8.2	
<i>Aspergillus fonsecaeus</i>			19	5.2	
<i>Aspergillus japonicus</i>	32 000	7.7	355	6.0	
<i>Aspergillus niger</i>		3.5	24	5.2	
<i>Aspergillus niger</i>		3.5		5.9	2.2
<i>Aspergillus niger</i> 1 ^a	35 400	3.65	17	6.0	5.0
2 ^a	33 100	3.75	44	6.0	0.9
<i>Aspergillus sojae</i>	32 000		77	5.5	
<i>Dothidea ribesiae</i>	31 200	8.9		8.4	3.2
BACTERIA					
<i>Erwinia aroideae</i>	30 000		400	8.1	

a. Glucoproteínas

Fuente: Pilnik y Rombouts (62).

te, aunque también se pueden encontrar Poligalacturonasas (PG). La tabla 7, lista la presencia de enzimas pécticas en algunos frutos, (23).

Los niveles de pectinasas detectables en plantas son variables y dependen de la estacionalidad y de la madurez de los frutos, ya que hay evidencias que aseguran que las enzimas pectinolíticas tienen un papel importante en ciertos procesos de las plantas, como el ablandamiento de las frutas durante la maduración, que puede ser explicado en términos de las alteraciones que sufren las substancias pécticas. En estudios realizados por Hobson (31), sobre la PG en el tomate normal y anormal de variedades (Potentate e Inmuna), explica la distribución de la PG en diferentes partes de estos mismos, durante su maduración. Desarrolla también una eficiente extracción de enzimas de tejidos vegetales por medio de sales. Mc Cready et.al (54), determinaron la presencia de dos poligalacturonasas en tomate. Sin embargo no se emplean vegetales como fuente de pectinasas, aunque se puede citar el caso de la PE de tomate y de naranja (79,51) respectivamente.

2.1.6.3 Pectinasas Microbianas

Los microorganismos sintetizan una amplia variedad de pectinasas. La enzima pectinolítica más comúnmente producida por bacterias es la PGL, aunque algunas especies producen PE y algunas pocas PG y exo PG. Erwinia carotovora produce PAL intracelular y extracelular (66). Bacillus sp produce una endo PATE (70). Las levaduras producen solamente Poligalacturonasas. La endo PG de la levadura Kluyvermyces fragilis ha sido muy estudiada. Esta es una enzima que actúa secuencialmente sobre las substancias pécticas, García y Gómez (25) proponen un medio de cultivo para la producción de PG por esta levadura.

Por otro lado los hongos sintetizan endo PG principalmente. La endo PG de A. niger (105), tiene un pH óptimo de 4.0 a 4.2. Degrada el ácido péctico, con una disminución rápida de la viscosidad. A. niger produce Pectin-liasa, endo y exo PG y es la única fuente de Polimetil-galacturonasa tipo endo.

Tabla 7

DISTRIBUCION DE LAS ENZIMAS PECTICAS

PLANTAS

FUENTE	PE	PG
Grosella negra	+	
Frambuesa	+	
Naranja	+	
Tomate	+	+
Pepino	+	
Pera	+	+
Manzana	+	
Tabaco	+	
Ajo	+	
Cebolla	+	
Frijol	+	
Durazno	+	+
Aguacate		+
Uvas	+	+
Cerezas	+	+
Toronja	+	+
Mango	+	
Plátano	+	
Limón	+	
Guisante	+	
Zanahoria	+	

Ref. Fogarty y Ward (23).

(+) Presencia

Dos diferentes exo PG (57, 58, 59) PG I y II fueron aisladas por rompimiento del micelio de Aspergillus niger. La PG I fue activada por iones mercurio y tiene un pH óptimo de 4.4-4.6. Esta hidroliza completamente el ácido péctico a ácido mono-galacturónico y la PG II tiene un pH óptimo de 5.0-5.1 y degrada en un 28% el ácido péctico. La mayoría de las PG son endoenzimas. Sin embargo A. niger, Rhizopus tritici, entre otros, producen exoenzimas (58,78). Las Pectato-liasas son sintetizadas por diferentes especies de Fusarium (Millar, 60; Papavizas, 78). Las bacterias de los géneros Bacillus, Pseudomonas, Erwinia, Clostridium y Xantomonas producen la mayoría de las enzimas liasas. En cambio las pectin-liasas son producidas por algunas especies de Aspergillus (A. niger, A. sp., etc.) y de Penicillium. Estas enzimas son sintetizadas junto con otras enzimas pécticas (118).

La pectinesterasa se encuentra en hongos, bacterias y plantas en conjunción con la PG (118). Las enzimas PE de origen fungal tienen un pH óptimo en un rango ácido. Las bacterias tienen un pH óptimo en el rango alcalino (7.5-8.0).

La mayoría de las enzimas pectinolíticas de aplicación industrial son producidas por hongos principalmente de los géneros Aspergillus, Sclerotinia, etc. En la tabla 8, se listan los microorganismos que producen las enzimas pectinolíticas (Despolimerasas), (23,118).

2.2 Producción de Pectinasas

En los procesos industriales para la producción de alimentos, la aplicación de enzimas se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Se ha estimado que la producción de enzimas para uso en alimentos en el mundo es de aproximadamente 45 millones de dólares por año (9), y un cuarto corresponde a enzimas pécticas.

La producción de pectinasas a escala industrial se realiza principalmen-

Tabla 8. PRINCIPALES FUENTES MICROBIANAS DE ENZIMAS PECTINOLITICAS

MIGROORGANISMOS	PG		PAL		PMG	PL	PE
	endo	exo	endo	exo	endo	endo	
H O N G O S							
<u>Acrocylindrum sp.</u>	+						+
<u>Aphanomyces euteiches</u>	+						
<u>Aspergillus sp.</u>						+	+
<u>A. fonsecaeus</u>						+	+
<u>A. niger</u>	+	+			+	+	+
<u>A. saito</u>	+						
<u>A. sojae</u>						+	
<u>Byssochlamys fulva</u>	+						
<u>Colletotrichum</u>							
<u>Gloeosporoides</u>	+						
<u>Coniphora cerebella</u>	+						+
<u>Coniothyrium diplodiella</u>	+	+					
<u>Corticium rolfsii</u>	+						
<u>Fusarium oxysporum</u>				+			+
<u>F. solani</u>				+		+	
<u>Geotrichum candidum</u>	+						
<u>Gloesporium kake</u>	+		+				
<u>Monilia laxa</u>	+						+
<u>P. digitatum</u>	+						
<u>P. expansum</u>	+						
<u>P. italicum</u>							+
<u>Phytophthora infestan</u>	+						
<u>Pyrenochaeta terrestris</u>	+						+
<u>Rhizoctonia solani</u>	+					+	+
<u>Sclerotinia fructigena</u>						+	+
L E V A D U R A S							
<u>S. fragilis</u>	+						
<u>Kluweromyces fragilis</u>	+						
B A C T E R I A S							
<u>Aeromonas liquefaciens</u>				+			
<u>Arthrobacter</u>				+			
<u>Bacillus sp.</u>				+			
<u>Clostridium multifermentans</u>					+		
<u>Erwinia aroideae</u>		+	+		+		
<u>Pseudomonas sp.</u>					+		+
<u>P. margininalis</u>		+			+		
<u>Xantomonas sp.</u>					+		

Ref. Kulp (40), Fogarty y Ward (23).

te por hongos de especies del género Aspergillus. Las cepas frecuentemente utilizadas incluyen: A. niger, A. oryzae, A. wentii y A. flavus (23). Las enzimas pécticas son producidas por bacterias y levaduras sin embargo, desde el punto de vista comercial, las pectinasas fúngicas, son preferidas por la industria por tres razones principales:

a) Son enzimas extracelulares, lo cual presenta ventajas para su recuperación

b) La mezcla de Actividades obtenida es capaz de reducir rápidamente la viscosidad de jugos de frutas.

c) Las características de las enzimas pécticas producidas por hongos, como pH y temperatura óptima de actividad, son muy similares a las condiciones de uso en la elaboración de jugos de fruta (23).

Los aspectos más importantes en la producción de enzimas microbianas han sido objeto de numerosos estudios, esto con la finalidad de optimizar procesos y que pueda ser costeable la utilización de estas enzimas en más procesos industriales.

Los procedimientos para la producción de enzimas varía de un estudio a otro. Sin embargo, existen únicamente dos métodos de producción: el cultivo sumergido y el cultivo sólido. En la manufactura de las enzimas pécticas comerciales de origen microbiano, la primera etapa es la selección de cepas las cuales pueden seleccionarse por su habilidad para sintetizar las enzimas deseadas con buen rendimiento.

Dicha selección puede realizarse por medio de mutaciones con la finalidad de obtener cepas altamente productoras de enzimas pécticas.

Los procesos de mutación pueden realizarse por diferentes métodos, algunos de los cuales son descritos en el anexo (IA). El agente mutagénico más comúnmente utilizado es la luz U. V., la cual tiene efectos muy positivos. Las cepas mutantes obtenidas presentan alta actividad PE y PG. Los agentes mutagénicos

nicos químicos son también muy eficientes.

Las mutantes obtenidas son conservadas bajo condiciones controladas, de manera que pueda mantenerse uniformidad en la producción de las enzimas. Por otro lado es conveniente considerar los parámetros que afectan la síntesis, así como las condiciones óptimas para los microorganismos y enzimas, si se desea optimizar los procesos para la producción de enzimas.

Un factor muy importante para la producción de enzimas con altos rendimientos, es el diseño de un medio de cultivo balanceado para la fermentación. En el cultivo sumergido, el medio líquido nutriente está elaborado en base a diversidad de componentes. Este medio está constituido por mezclas de carbohidratos, materiales nitrogenados, sales inorgánicas y minerales. Este tipo de medio puede ser ideal para enzimas constitutivas. Sin embargo las enzimas pécticas comerciales son inducibles, por lo que es necesario añadir al medio un substrato inductor, en este caso se adiciona pectina o materiales pécticos que la contengan, y que estimulan la producción de estas enzimas.

Muchos estudios se han realizado con respecto a las concentraciones óptimas de pectina o sustancias pécticas, siendo el rango de concentración de pectina más utilizado de 1 a 4%.

Últimamente se han usado materiales como pulpa de remolacha, Szanger (100), Zetelaki (117, 118), cáscara de cítricos, Fogarty (23), Rombouts y Pilnik (91), bagazo de manzana, como fuentes alternativas de sustancias pécticas. Como estos materiales son subproductos industriales, hacen disponibles un substrato limitante en la producción de enzimas pécticas, ya que la disponibilidad de la pectina es baja en el mercado. Las melazas pueden ser utilizadas como fuente de carbono.

En relación a la fuente de carbono Tuttobello et. al (105), probaron el efecto de diferentes carbohidratos en combinación con el substrato inductor.

De los azúcares probados, la sacarosa fue la más eficiente, obteniendo la más alta productividad, tabla 20, del anexo I. Posteriormente, trabajaron con diferentes relaciones de pectina/sacarosa, tabla 21, para determinar la concentración más adecuada. La relación óptima encontrada fue pectina 2% y sacarosa 2%, esto con respecto a la actividad por ml de sobrenadante al grado de hidrólisis de la pectina.

La lactosa fue también probada por García y Gómez (25), así como la maltosa.

La fuente de nitrógeno también fue estudiada. Para esto varias fuentes fueron utilizadas. Vasu (107), concluye que los derivados amoniacales son más favorables que los nitratos. Los resultados óptimos fueron con $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, en la síntesis de polig-lacturonasa. Para la producción de PG, PE, y PMG, la presencia de peptona fue más favorable, (63).

En relación a las fuentes orgánicas e inorgánicas de Nitrógeno, el nitrato de amonio presenta un óptimo rendimiento en 7 días de fermentación. Sin embargo con peptona se presenta en 6 días de fermentación. La relación promedio de C/N es de 10 (67).

Debido a que la composición del medio de cultivo es un factor determinante en la producción de enzimas en general, se han realizado trabajos con el objeto de establecer las fuentes y concentraciones óptimas de carbono y nitrógeno en el medio, así como las concentraciones de sales inorgánicas y minerales traza. Estos últimos son también importantes en la síntesis de las enzimas pécticas. Se ha reportado (115), la adición de sales como NaCl , NaNO_3 , KBr en concentraciones de (0.001-0.1 M). Estas sales incrementan la actividad endo PG, más que la exo PG. La presencia de sales de este tipo en el medio inhibe la actividad PE. Otras sales inorgánicas y minerales traza son reportados en la tabla 22, (anexo 1D) como óptimos para la producción. Algunos medios de cultivo propuestos en la literatura se enlistan en el Anexo (I E).

De los azúcares probados, la sacarosa fue la más eficiente, obteniendo la más alta productividad, tabla 20, del anexo I. Posteriormente, trabajaron con diferentes relaciones de pectina/sacarosa, tabla 21, para determinar la concentración más adecuada. La relación óptima encontrada fue pectina 2% y sacarosa 2%, esto con respecto a la actividad por ml de sobrenadante al grado de hidrólisis de la pectina.

La lactosa fue también probada por García y Gómez (25), así como la maltosa.

La fuente de nitrógeno también fue estudiada. Para esto varias fuentes fueron utilizadas. Vasu (107), concluye que los derivados amoniacales son más favorables que los nitratos. Los resultados óptimos fueron con $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, en la síntesis de polig-lacturonasa. Para la producción de PG, PE, y PMG, la presencia de peptona fue más favorable, (63).

En relación a las fuentes orgánicas e inorgánicas de Nitrógeno, el nitrato de amonio presenta un óptimo rendimiento en 7 días de fermentación. Sin embargo con peptona se presenta en 6 días de fermentación. La relación promedio de C/N es de 10 (67).

Debido a que la composición del medio de cultivo es un factor determinante en la producción de enzimas en general, se han realizado trabajos con el objeto de establecer las fuentes y concentraciones óptimas de carbono y nitrógeno en el medio, así como las concentraciones de sales inorgánicas y minerales traza. Estos últimos son también importantes en la síntesis de las enzimas pécticas. Se ha reportado (115), la adición de sales como NaCl, NaNO_3 , KBr en concentraciones de (0.001-0.1 M). Estas sales incrementan la actividad endo PG, más que la exo PG. La presencia de sales de este tipo en el medio inhibe la actividad PE. Otras sales inorgánicas y minerales traza son reportados en la tabla 22, (anexo 1D) como óptimos para la producción. Algunos medios de cultivo propuestos en la literatura se enlistan en el Anexo (I E).

Efecto del pH: Un pH inicial en un rango de 3-4, favorece la producción de enzimas pécticas (115). El efecto del pH en la biosíntesis de las enzimas que se obtuvo fue en un nivel alto cuando el pH inicial del medio fue de pH 5 y el nivel más bajo a pH de 3 (42). Tuttobello (105), propone un pH óptimo de 4.

La temperatura óptima reportada está en un rango de 30-35°C para la producción de enzimas pécticas. La concentración del inóculo también influye en el desarrollo de la actividad. En la fig. 5, el tamaño del inóculo óptimo es de 4×10^3 conidias/ml con un tiempo de crecimiento de 120 horas (109).

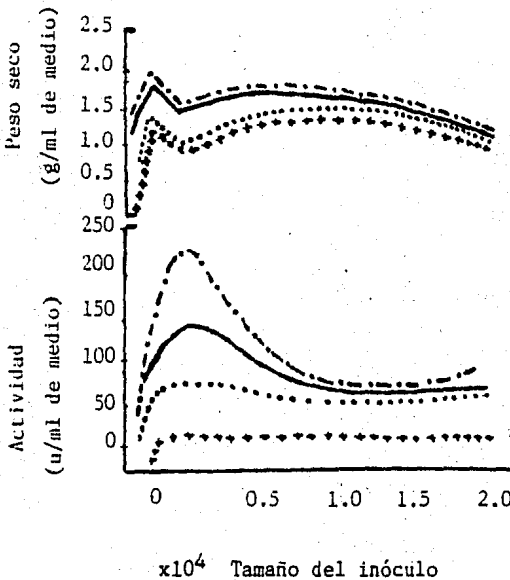


Fig. 5. Influencia de la concentración del inóculo sobre la actividad enzimática y el crecimiento de Aspergillus niger. 120 horas (---); 100 horas (—); 80 horas (....); 40 horas (++++); de crecimiento.

La síntesis de diferentes enzimas en el complejo de enzimas pécticas de la cepa de Aspergillus niger, es notablemente afectada por la disponibilidad de oxígeno.

La fig. 6, muestra las actividades pectinolíticas de Aspergillus niger como función de la disponibilidad de oxígeno en el cultivo sumergido (118).

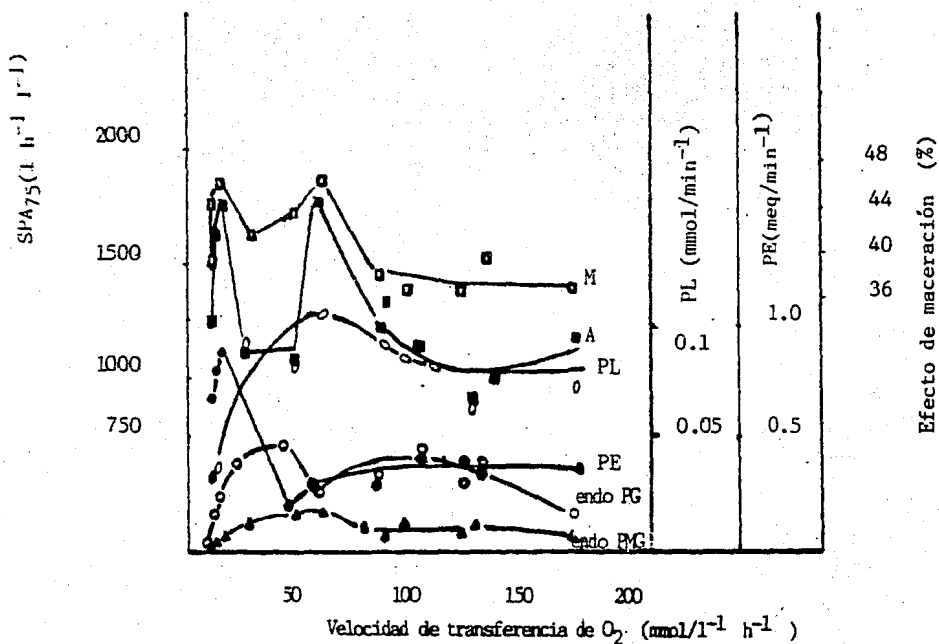


Fig. 6. Actividades de las enzimas pectinolíticas del cultivo de Aspergillus niger, como una función de la Velocidad de Transferencia de Oxígeno: A actividad clarificante en jugo de manzana; M Actividad de maceración.

Los valores óptimos de la Velocidad de Transferencia de oxígeno para la producción de enzimas pectinolíticas y para mejores efectos de clarificación de jugo de manzana y el efecto de maceración, se muestran en la tabla 9.

TABLA 9
Valores óptimos de Velocidad de Transferencia de Oxígeno (VTO)

Para la producción de	VTO (mmoles/1 hr)
PL	60
PE	12 - 14
Endo-PG	49
Endo-PMG	60
Enzimas para la clarificación de jugo de manzana	14 y 60
Enzimas para la maceración	14 - 60

Ref. Zetelaki-Horváth y Vas (11.).

Las determinaciones más importantes que indican curso de la fermentación son:

- Determinación de la actividad por disminución de la viscosidad
- Concentración relativa de sacarosa
- Determinación del pH
- Peso seco del micelio

En la fig. 7, se muestra el desarrollo de una fermentación típica en medio sumergido; la cepa utilizada fue Aspergillus niger (105).

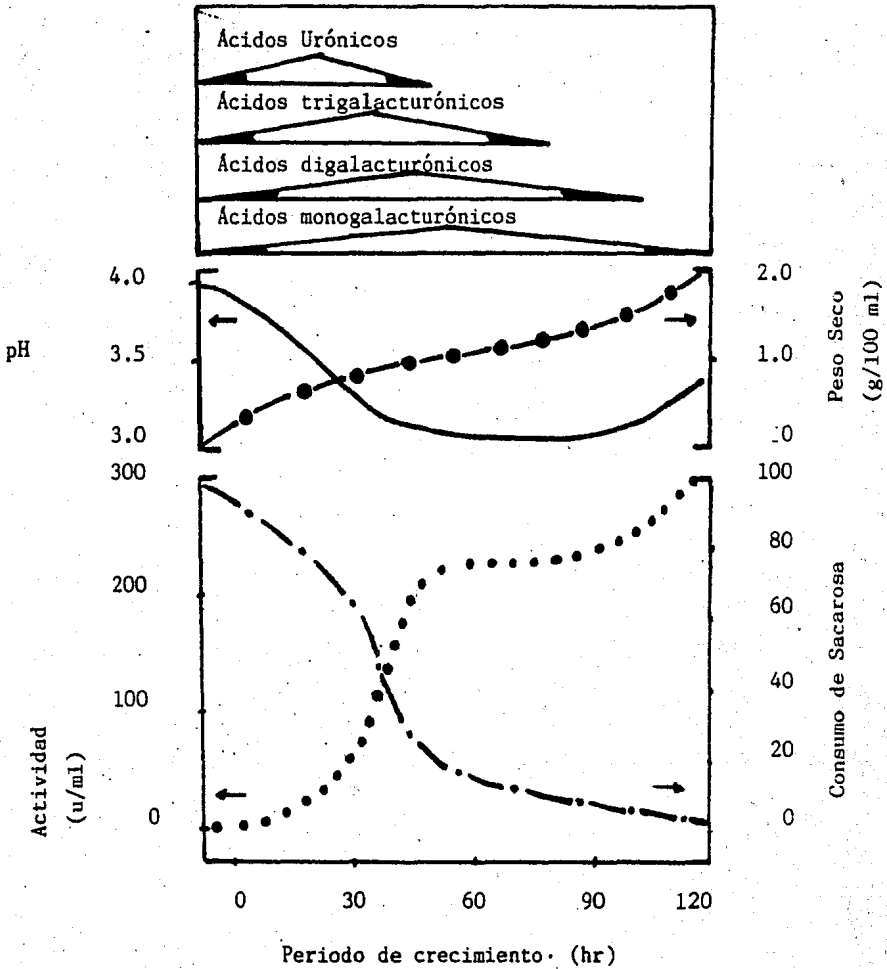


Fig. 7. Fermentación típica de *Aspergillus niger* en cultivo sumergido. Las condiciones óptimas: Tiempo de fermentación de 5 días; temperatura de 30°C; pH de 4.5; Concentración de inóculo de 3×10^3 esporas/ml; Agitación de 750 rpm y aireación de 5 litros/min.

Después de la fermentación, se lleva a cabo una de las etapas más importantes en la manufactura de enzimas; la recuperación de enzimas del caldo de fermentación, si se trata de enzimas extracelulares y si son enzimas intracelulares, de las células producidas.

Si la recuperación se lleva a cabo en las células, es conveniente trabajar con materiales celulares frescos, para mantener uniformidad en los niveles enzimáticos producidos. Sin embargo a menudo se recuperan enzimas de células almacenadas en refrigeración. Aunque la viabilidad en las propiedades celulares que se tiene por congelamiento y descongelamiento de las células puede presentar grandes problemas para obtener datos reproducibles que puedan ser útiles en el desarrollo y optimización de un proceso.

TABLA 10

Vías de recuperación de enzimas

Enzimas Extracelulares	Enzimas Intracelulares
a) Eliminación de células	a) Recolección de células
b) Evaporación	b) Ruptura celular y extracción
c) Precipitación (con sales y solventes)	c) Eliminación de Debris
d) Recuperación de sólidos	
e) Extracción	
f) Adsorción	
g) Cromatografía	
h) Concentración (ultrafiltración)	
i) Secado	

NOTA: Se incluyen las operaciones anteriores desde b a i en las enzimas intracelulares.

Ref. (26).

CAPITULO III

FERMENTACION EN CULTIVO SOLIDO

3.1 Definición

El término fermentación en estado sólido, antes conocida como fermentación "koji", (16, 30, 44, 65), se refiere al crecimiento de los microorganismos sobre materiales sólidos insolubles con la humedad absorbida dentro de la matriz, pero sin la presencia de una fase líquida libre: Cannel y Moo Young (14).

3.2 Antecedentes

La utilización de las fermentaciones en cultivo sólido no es reciente, ha sido usado extensamente desde hace varios siglos en numerosas fermentaciones tradicionales de alimentos. Entre las preparaciones de alimentos fermentados tradicionalmente establecidos en Europa, están los quesos, hongos comestibles y en los países orientales el koji, el miso, el sake, el tempeh, la salsa de soya, etc. Los hongos representan la clase más común de microorganismos utilizada en este tipo de procesos, debido a su capacidad para tolerar bajas cantidades de agua disponible. Un ejemplo de esto es su capacidad para crecer sobre materiales sólidos en la naturaleza: piezas de madera tallos de plantas, hojas, etc. Una excepción importante es en el compuesto donde el uso de bacterias termofílicas es predominante (1).

De gran importancia para la tecnología moderna es el proceso "koji", el cual ha sido usado en el Oriente por largo tiempo y es un proceso clave para el desarrollo posterior de diversidad de alimentos fermentados, producción de metabolitos como enzimas y ácidos orgánicos, entre otros procesos.

El "koji" es esencialmente una preparación de enzimas obtenidas por el crecimiento de un hongo Aspergillus oryzae sobre arroz cocido u otros cereales. Es un iniciador de la industria de la salsa de soya y en la fermentación del miso, así como de otros productos como el sake. Dadas las diversas

transformaciones enzimáticas que se llevan a cabo en estos procesos durante la fermentación en la cual se involucra principalmente la acción de proteasas y amilasas, se obtienen diferentes sustancias que caracterizan los productos finales.

La acción de las enzimas sobre las proteínas y el almidón de las leguminosas y cereales es el propósito del miso y la salsa de soya. En esta última es necesaria la hidrólisis de los péptidos, ya que se trata de una mezcla de aminoácidos y diferentes compuestos aromáticos. En el caso del sake es la hidrólisis del almidón en azúcares simples, que son posteriormente transformados a alcohol por levaduras (24).

En la tabla 11, se enlistan algunos procesos tradicionales y su relación con enzimas extracelulares (16).

La utilización del proceso de cultivo sólido se ha incrementado en los últimos años notablemente. Las aplicaciones de este sistema incluyen la producción de enzimas (12, 24), producción de ácidos orgánicos (43), producción de micotoxinas (30), y de otros metabolitos.

3.3 Parámetros de la fermentación sólida

El cultivo sólido es un sistema complejo, en virtud de que la interrelación ambiente-substrato-microorganismo tiene diversas limitaciones físicas y como consecuencia se presentan gradientes de temperatura pH, humedad, etc, que afectan de forma crítica al proceso fermentativo (72). Estas limitaciones físicas se agravan en cultivos sólidos estáticos (16).

La fermentación en cultivo sólido presenta diversidad de factores que deben considerarse para alcanzar una alta eficiencia en el proceso. En forma general las características según Hesseltine (30), son las siguientes:

Tabla 11

PROCESOS TRADICIONALES DE CULTIVO SOLIDO Y SU RELACION
CON ENZIMAS EXTRACELULARES

PRODUCTO	SUBSTRATO	MICROORGANISMOS	ENZIMA
Tempeh	soya	<u>Rhizopus oligopus</u>	Proteasas
Miso	soya	<u>Aspergillus oryzae</u> <u>Aspergillus sojae</u>	Lamilasa Proteasas
Tapé Ketella	yuca	<u>Amilomyces rouxii</u>	Amilasas
Ang-kna	arroz	<u>Monascus purpureus</u>	Amilasas
Abono Orgánico	residuos ligno- celulósicos	Varias especies celu- lolticas	Celulasas
Antjom	cacahuate	<u>Neurospora sitophila</u>	Proteasas Lipasas
Queso Roquefort	leche	<u>Penicillium roqueforti</u>	Lipasas

Ref. Carrizales (16).

- 1) Los materiales comúnmente usados como sustratos incluyen cereales, legumbres, otros productos de plantas y animales con alto contenido de carbohidratos y/o proteína.
- 2) El sustrato debe estar ubicado en el fermentador de forma tal que permita la libre circulación del aire.
- 3) El agua es requerida como un componente más del medio. Pueden ser adicionados al medio otros nutrientes como sales de nitrógeno, sales inorgánicas y minerales.
- 4) Debido a la baja humedad del medio, la posibilidad de contaminación bacteriana es reducida.
- 5) El control de la temperatura es algunas veces crítico y se debe analizar cuidadosamente, así como también la composición atmosférica del cultivo con respecto a las concentraciones del oxígeno, dióxido de carbono y algunos metabolitos volátiles, ya que el efecto que tienen sobre el desarrollo de la fermentación es fundamental.
- 6) El inóculo es adicionado en forma de esporas, para que germine uniforme y rápidamente en más de un 95%, aunque se puede inocular con un micelio.

3.3.1 Humedad en el medio sólido

El contenido de humedad debe ser el suficiente para asegurar el buen desarrollo del microorganismo, pero no demasiado alto, ya que una concentración mayor de agua puede favorecer la contaminación bacteriana.

El nivel de humedad del sustrato sólido debe ser determinado para cada especie y probablemente para cada cepa utilizada, esto puede representar

un problema, ya que el contenido de humedad depende ampliamente de la naturaleza del substrato. Esto es cuando se utilizan materiales amiláceos el contenido de humedad no puede ser alto, debido a que con altos porcentajes de humedad las partículas se aglomeran formándose una masa pastosa que dificulta la asimilación del substrato y la difusión del oxígeno en la masa, así como problemas para homogenizar y distribuir el inóculo.

Para los materiales celulósicos la humedad puede ser mayor que para los amilásicos, ya que están constituidos por fibras que tienen una estructura porosa, la cual permite trabajar a niveles de humedad mayores a los normales desde 55% a 70%, además presenta los espacios que facilitan la difusión del oxígeno y el calor generado por el metabolismo del microorganismo. Dadas las características de estos materiales es posible introducirlos en pequeñas cantidades en medios sólidos donde el substrato es amilásico para aumentar la capacidad de absorción de agua y la porosidad del medio, lo que permitiría tener mayor eficiencia durante el proceso, como en el caso del bagazo de caña en la fermentación de la yuca (76).

Por otro lado el contenido de humedad del medio se incrementa lentamente durante la fermentación debido a la baja de materia seca y a la producción de agua metabólica por la oxidación de carbohidratos (84).

El contenido de agua en el medio sólido como se ha descrito anteriormente juega un papel importante en el desarrollo de la fermentación, ya que influye en forma directa en la germinación del inóculo y en el crecimiento del micelio (92), así como en la síntesis de enzimas.

Los niveles de humedad para obtener un óptimo crecimiento de células y un máximo rendimiento de enzimas son muy variadas, siendo función del microorganismo empleado. Esto sugiere la posibilidad de incrementar rendimientos de células o enzimas mediante el control del sistema, regulando el contenido de agua en la fase de crecimiento y en la fase estacionaria para dar

los niveles adecuados de crecimiento de células y producción de enzimas respectivamente (73).

Por otro lado cambios durante la fermentación en la humedad pueden ser atribuidos a la evaporación, Sato et. al, proponen suministrar más humedad introduciendo partículas de pulpa de madera mezcladas con arroz y salvado de trigo para el crecimiento de Aspergillus oryzae, (94).

3.3.2 Aereación y transferencia de masa

La capacidad de aereación del cultivo está gobernada por la naturaleza del microorganismo usado, el grado de requerimiento de oxígeno para la síntesis del producto (5), la cantidad de calor metabólico para ser disipado de la masa, el espesor de la capa del substrato, el grado con el que el CO₂ y otros metabolitos volátiles son eliminados y el grado de espacios disponibles en el substrato.

Una alta concentración de CO₂ en el fermentador, así como en los gases afluentes es encontrada cuando la aereación es baja. En la síntesis de la amilasa (5), presiones altas de dióxido de carbono pueden inhibir su producción. Por otro lado una alta concentración de oxígeno estimula la productividad de la amilasa.

La transferencia de oxígeno puede ser afectada por la formación de aglomerados de masa compacta debidos al crecimiento fungal, al efecto masa de los sólidos (41), a la presencia de un exceso de agua (84,92) y al uso de partículas muy finas de substrato. Este tipo de problemas pueden ser eliminados con el uso de substratos porosos granulados o fibrosos (76), con capas delgadas de substrato, con agitación del substrato y rotación de los fermentadores (48). André et.al (3), describen un método para la determinación del coeficiente transferencia de masa para aplicación en la fermentación en substrato sólido (102).

3.3.3 Temperatura

Gran cantidad de calor es generado durante la fermentación sólida, en contrándose directamente relacionado con las actividades metabólicas del microorganismo. La remoción del calor metabólico generado se dificulta cuando el sustrato está muy húmedo (1), lo que ocasiona un incremento de temperatura que puede tener efectos sobre la germinación de esporas, el crecimiento del hongo, la síntesis del producto y en la esporulación (1,84,92).

El rango de temperatura comúnmente usado es de 25-32°C en fermentación sólida (30).

3.3.4 El pH en el medio sólido

El pH es uno de los factores importantes en el desarrollo de la fermentación sólida. Normalmente se trabaja en un rango ácido por ser el óptimo para el crecimiento de los hongos y para evitar contaminación bacteriana. Por otro lado durante la fermentación el crecimiento micelial promueve una rápida acidificación del medio, la cual es detenida más adelante cuando las sales de amonio y la urea son utilizadas como fuente de nitrógeno (84). La capacidad amortiguadora de estas sales ayudan a eliminar la necesidad del control del pH (48).

3.3.5 La concentración del inóculo

La concentración del inóculo también es un factor de importancia, ya que una concentración alta de esporas da un crecimiento inicial rápido y no todas las esporas germinan. Para cada proceso deberá determinarse el nivel óptimo de inoculación, e.g, la concentración óptima encontrada es de 2×10^7 esporas/g sustrato, para Aspergillus niger en harina de yuca, Raimbault (84).

3.4 Sistemas de fermentación sólida

En el proceso "koji" tradicional el sustrato sólido se distribuye en canastas de bambú apiladas una sobre otra y arregladas de manera que existe circulación de aire. Debido a la laboriosidad del proceso, se han desarrollado otros equipos de fermentación.

a) Fermentador de tambor rotatorio

Este sistema está basado en el uso de un envase o recipiente en forma de tambor montado sobre un sistema de rodillos los cuales actúan como soporte y como aparatos de rotación. Alternativamente el mecanismo de un reloj puede ser usado para la rotación del tambor, a la vez que la velocidad de rotación puede ser de 1 rpm.

Los tambores y recipientes usados en diferentes trabajos incluyen envases de vidrio Pyrex o pailas de hierro con capacidad de 5 galones a 55 galones y los tambores neumáticos con capacidad de 100 g, 1 kg, 5 kg hasta 70 kg o un tamaño de escala industrial.

Los fermentadores de tambor rotatorio están usualmente equipados con una entrada y una salida de aire. El tubo de entrada de aire puede casi alcanzar el fondo del tambor. La aereación se completa por medio de un ventilador localizado sobre el lado opuesto a la entrada de aire o por aire estéril de un compresor.

La preparación del medio sólido se efectúa mediante cocimiento con vapor inoculación, incubación y finalmente secado, operaciones que son realizadas "in situ". El fermentador puede ser desmantelado para la limpieza y esterilización y permite hacer numerosas variaciones en las operaciones del fermentador en un tiempo mínimo.

El crecimiento microbiano en fermentadores de este tipo es rápido y uniforme. Las dificultades encontradas al incrementar el tamaño del tambor son principalmente en el crecimiento y en el control de temperatura, en la contaminación microbiana, en la agregación de las partículas y en el retraso del crecimiento debido al agotamiento de las partículas del sustrato (48).

b) Fermentador de charolas

Las charolas tienen aproximadamente de 1 a 2 pulgadas de espesor de la capa de sustrato y son colocadas en estantes adecuados dentro de un gabinete

o en cuartos donde los parámetros óptimos de crecimiento son controlados para obtener una alta eficiencia.

El medio es humidificado mediante humidificadores o por aire húmedo. El fermentador está provisto de aparatos que controlan la ventilación, la humedad y la temperatura.

Las charolas son fabricadas de madera y están provistas de un fondo falso o de una malla metálica. También pueden ser charolas perforadas en el fondo. La perforación o el fondo falso permiten una aereación adecuada del substrato en el fondo de las charolas.

Los fermentadores de charolas son utilizadas en todos los niveles, desde el nivel laboratorio hasta un nivel de escala comercial (28). Estos fermentadores proporcionan un producto final más uniforme y con alta actividad enzimática. Sin embargo la necesidad de una área extensa de trabajo es una desventaja para este tipo de fermentación. El tiempo de fermentación para la mayor parte de los procesos es de 36 horas normalmente, dependiendo del producto.

c) Fermentadores de columnas

Este tipo de fermentadores consisten en una columna de vidrio o plástico provista de dos entradas una inferior y otra superior; una permite la entrada y la otra la salida de los gases afluentes de la fermentación, mientras que la temperatura es controlada en cuarto de incubación o por el paso de agua fría a través de una chaqueta o serpentín.

La humedad de la columna puede ser controlada mediante el uso de aire húmedo que proviene de un humidificador integrado a la columna, que depende de la cantidad de substrato el cual entra a razón de 4/6 litros/h por 10 gramos secos. Una unidad de fermentación consiste en 24 fermentadores de columnas para nivel laboratorio, Raimbault y Alazard (84). Otros tipos de fermentadores son descritos por Lonsane et.al (48). La fig. 8, muestra un fermentador de columna usado a nivel laboratorio.

3.5 Comparación de la fermentación en cultivo sólido y la fermentación en cultivo sumergido.

La tecnología de cultivo sólido es incipiente en nuestro país, teniendo a nivel industrial un desarrollo limitado. Aunado a esta situación la escasa información existente dificulta su avance, sin embargo grandes esfuerzos se están realizando al respecto. Por otra parte, abundante información se publica a nivel internacional en relación al cultivo sumergido, dado que las condiciones ambientales son de fácil control. Por lo general se hace hincapié en conocer el efecto del pH, temperatura, nivel de aereación, velocidad de agitación, concentración de substratos, etc., sobre la producción de metabolitos principalmente enzimas de importancia industrial. La disponibilidad de equipo versátil de fermentación que permite el control de todos estos parámetros automáticamente.

La fermentación sólida no ha tenido el mismo grado de avance. No obstante en los últimos años las investigaciones en relación a la utilización de la fermentación en estado sólido para la producción de diversos metabolitos, enriquecimiento proteico de materiales de desecho, entre otros usos, son cada vez más importantes, lo que implica un considerable avance en el desarrollo de esta tecnología.

A pesar de este desbalance en las fermentaciones industriales, el cultivo sólido presenta algunas ventajas (30), destacando las siguientes:

- 1.-El medio de cultivo es relativamente simple, consta del material sólido seleccionado con el contenido de humedad adecuado y algún otro componente si es necesario.
2. El espacio requerido para la fermentación en cultivo sólido es relativamente pequeño, dada la limitada cantidad de agua y el grado de concentración del substrato.
- 3.-Las condiciones bajo las cuales los hongos crecen son similares a las condiciones de su hábitat natural.

4.-La aereación es fácilmente suministrada, ya que el substrato presenta espacios vacíos entre partículas.

Otras ventajas que ofrece el cultivo sólido desde el punto de vista de ingeniería con respecto al proceso en cultivo sumergido se resumen en la tabla 12. No obstante, el criterio más importante es sin duda el económico, el cual depende de la capacidad de producción de metabolitos por cada sistema de cultivo.

Las limitaciones que el cultivo sólido presenta son las siguientes, según Hesseltine (30):

- a) Existe limitación con respecto al tipo de microorganismos, ya que sólo los que son capaces de crecer a bajos niveles de contenido de humedad son utilizados, en su mayoría hongos.
- b) El calor metabólico producido puede ser un problema, cuando no se trabaja en condiciones adecuadas para su remoción.

3.6 Producción de metabolitos en la fermentación sólida

A partir del proceso koji se han desarrollado numerosas investigaciones, con respecto al crecimiento fungal y la producción de diversos metabolitos como enzimas (amilasas, proteasas, celulasas, pectinasas, etc.), ácidos orgánicos y micotoxinas, sobre substratos sólidos.

3.6.1 Producción de proteína microbiana

El enriquecimiento proteico de materiales amilásicos o celulósicos por fermentación en cultivo sólido ha ampliado las aplicaciones de este sistema de fermentación. Materiales lignocelulósicos previamente tratados han proporcionado excelentes resultados en el incremento de proteína por el crecimiento microbiano y muestra un proceso alternativo de uso (12, 45).

Tabla 12

**CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LOS CULTIVOS
SOLIDOS Y SUMERGIDOS**

C R I T E R I O	CULTIVO SOLIDO	CULTIVO SUMERGIDO
Espacio Físico	poco	mucho
Mano de Obra	mucha	poca
Energía para aereación	poca	mucho
Energía para mezclado	muy poca	mucho
Problema de contaminación	poco	mucho
Agua requerida	poca	mucho
Operaciones de recuperación de enzimas	mucho	mucho
Tipo de proceso	sencillo	complejo
Generación de aguas residuales contaminantes	poca	mucho

Fuente: Adaptada de Underkofler, L. A. (1960).

Ref. Carrizales (16).

Raimbault et. al (84,85), describen un proceso de fermentación en cultivo sólido para el enriquecimiento proteico en fermentadores de columnas empacadas y aereadas. El sustrato utilizado fue harina de yuca y como inóculo Aspergillus niger. El contenido de proteína encontrada en los productos obtenidos oscila entre 10 a 16.5% (85).

Ramos-Valdivia et.al (86), realizan una comparación de la producción de proteína microbiana por Rhizopus oligosporus sobre yuca en cultivo sólido en columnas empacadas (método de Raimbault, 84) y en cultivo líquido. El incremento de proteína obtenido en el producto final es 26.8% para cultivo sumergido y para el cultivo sólido 22.8%, pero la actividad volumétrica de proteína (g/l/h) es más alta para el cultivo sólido con 1.20 y para el cultivo sumergido de 0.18.

Peñaloza et.al, (30), evalúan la posibilidad de usar como sustrato en la fermentación en cultivo sólido otros materiales residuales como pulpa de café, un material sólido relativamente rico en azúcares solubles. El residuo de plátano ha sido propuesto igualmente como sustrato para el crecimiento de Aspergillus niger en cultivo sólido (6). El incremento del contenido de proteína en el producto final va desde un 6% inicial a un 18% final. La cáscara de cítricos es utilizada como sustrato en la fermentación sólida (90).

3.6.2 Producción de enzimas en cultivo sólido

El cultivo sólido en cereales, una de las ventajas que presenta es la posibilidad de producir enzimas. El proceso más estudiado es el proceso koji. Este método de cultivo contiene no únicamente enzimas de maceración, amilolíticas y proteolíticas en grandes cantidades en una relación bien balanceada sino también las enzimas proteolíticas compuestas de un sistema de proteinasas y peptidasas (24), por lo cual es un sistema efectivo en la producción de enzimas, tabla 13.

Takamine (103), desarrolla un sistema de producción de amilasas (Taka-diastasa) con Aspergillus oryzae, primer sistema de producción industrial de

Tabla 13

PRODUCCION DE ENZIMAS POR CULTIVO SOLIDO

ENZIMAS	MICROORGANISMOS	SUBSTRATOS
Amiloglucosidasa	<u>Rhizopus sp.</u>	Salvado de trigo
Amlasas	<u>Aspergillus oryzae</u> <u>Aspergillus niger</u>	Salvado de trigo Arroz
Celulasas	<u>Trichoderma viride</u>	Salvado de trigo
Proteasas	<u>Aspergillus niger</u> <u>Aspergillus oryzae</u>	Salvado de trigo
Pectinasas	<u>Aspergillus soyae</u> <u>Aspergillus niger</u> <u>A. carbanerius</u>	Salvado de trigo Salvado de trigo Salvado de trigo

Fuente: Carrizales (16).

enzimas sobre el sustrato sólido de salvado de trigo y almidón. Este sistema introduce amplias posibilidades técnicas en la producción de enzimas, para la industria, tomando como base el proceso tradicional koji.

3.6.2.1 Producción de amilasas en cultivo sólido

Las enzimas amilolíticas pueden ser producidas por el método koji junto con proteasas con Aspergillus oryzae sobre salvado de arroz, Narahara et. al (72). El autor considera el efecto de la actividad del agua (a_w) sobre la producción de estas enzimas, encontrando que la velocidad de crecimiento de Aspergillus oryzae decrece con disminución de la a_w y que se detiene a una a_w de 0.90. Por otro lado un alto contenido de agua suprime la actividad proteasa y eleva la actividad de amilasa considerablemente.

Una característica interesante de la comparación del cultivo líquido y sólido es que en el primero se demuestra la presencia de dos enzimas; glucoamilasa y de amilasa sintetizadas por Aspergillus hennebergi sobre harina de yuca, mientras que en cultivo sólido se sintetizan 2 glucoamilasas (106). Las características de estas enzimas, así como el número de amilasas producidas y sus propiedades dependen en gran parte de las especies, pero es evidente que las condiciones del cultivo tienen una marcada influencia en la síntesis de éstas (101, 106).

Alazard et.al (2) realizan también un estudio comparativo de ambos métodos de cultivo en la producción de enzimas amilolíticas con Aspergillus niger sobre harina de yuca, encontrando que el comportamiento de las enzimas producidas en ambos métodos son diferentes entre sí. Las diferencias se ubican en la afinidad por el sustrato y en la termoestabilidad a 70°C, en relación con la enzima producida en medio líquido, la cual presenta gran afinidad por el sustrato pero con mala termoestabilidad a 70°C.

Mitsue et.al (62), reportan la purificación y caracterización de tres diferentes glucoamilasas obtenidas en el cultivo de Aspergillus oryzae sobre

arroz cocido y sus diferencias con el cultivo sobre salvado de trigo.

3.6.2.2 Enzimas proteolíticas en cultivo sólido

Las proteasas son producidas en el koji junto con otras enzimas, aunque su producción en medio sólido es menor que en cultivo líquido. Algunos estudios realizados sobre la producción de enzimas por cultivo sólido demuestran la presencia de actividad proteolítica (72).

Fukushima (24), se ocupa del sistema proteolítico compuesto de proteínasas y peptidasas contenidas en el koji. Las proteinasas de Aspergillus oryzae son proteasas alcalinas y ácidas.

3.6.2.3 Producción de celulasas

Toyama (104) describe un proceso automático para la producción de celulasas. La técnica consiste en cultivar Trichoderma reesei sobre un medio sólido compuesto esencialmente de una mezcla de paja de arroz y salvado de arroz o trigo en una relación de 8:2 con incubación a 25-30°C durante 4 días. La masa del producto fermentado se extrae con 3 volúmenes de agua obteniéndose una solución que contiene una fuerte actividad celulolítica.

Roussos (92) trabajando con Trichoderma harzianum, realiza un estudio extenso sobre la fisiología del crecimiento, así como la fisiología de la esporulación del hongo filamentoso celulolítico. Este autor describe el desarrollo de Trichoderma harzianum sobre diversos substratos celulósicos por fermentación en medio sólido, utilizando fermentadores de columnas a nivel laboratorio Raimbault (84), y a nivel piloto de diferentes fermentadores estáticos y dinámicos. Describe también un sistema de recuperación de enzimas por prensaje del producto fermentado, esta operación consta de dos etapas: una primera etapa donde se prensa el producto sin tratamiento y una segunda donde se le añade agua al residuo insoluble de la primera extracción.

En el primer prensado extrae 67.5% de las celulasas. La segunda extracción de la fracción insoluble rehidratada permite extraer el 80% de celulasas residuales. En la recuperación un 93.5% de las celulasas producidas en fermentación sólida sobre bagazo de caña pueden ser recuperadas.

Los substratos lignocelulósicos usados fueron paja y salvado de trigo, pulpa de remolacha y bagazo de caña de azúcar. Estos substratos llevan pretratamientos físico-químicos que facilitan el ataque de la celulosa por las enzimas y permiten definir las condiciones de preparación de estos substratos para la fermentación en medio sólido.

Rao et.al (87) describen la producción de celulasas en fermentación sólida con Pestalotia versicolor sobre varios substratos celulósicos tales como salvado de arroz, trigo, bagazo de caña, cascarilla de trigo y centeno, encontrando la más alta actividad con bagazo de caña y la más baja con salvado de trigo.

3.6.2.4 Pectinasas

La producción de enzimas pécticas por fermentación en cultivo sólido utilizando un fermentador de charolas es descrita por Ghidyal et. al (28). El material sólido usado es el salvado de trigo con adición de sales minerales. El substrato sólido es esterilizado a 121°C por 60 min. Posteriormente es inoculado con Aspergillus carbonarius. Las condiciones de la fermentación son: temperatura de 30-35°C y humedad de 90%.

La temperatura durante la fermentación tiene un efecto importante en la actividad de la enzima. Charolas con el substrato sólido preparado e inoculado se dividen en dos lotes, en el primero la temperatura se controla y en el segundo, la temperatura no se controla. El rendimiento de la enzima decrece en 12% en la fermentación sin control de temperatura, debido al incremento de la temperatura de 25-45.2°C propiciada por el calor generado durante la fermentación. La temperatura óptima de incubación es de 30°C (28).

Ghildyal (28) describe un método de extracción de enzimas, en el cual el producto de la fermentación se seca a 28-30°C. Al producto seco se le adiciona agua destilada a 25-28°C y a 4°C de temperatura. La extracción se lleva a cabo durante 60 minutos con agitación intermitente, posteriormente se filtra y se lava. La recuperación más alta de la enzima se da a 4°C, sin embargo la diferencia no es muy significativa, considerando los costos adicionales que involucra.

Wladyslaw et.al (110) proponen la extracción de enzimas pécticas, con agua de la llave a 40°C por 60 minutos. La actividad de las enzimas no es afectada durante el secado del extracto a 40°C.

Las enzimas pécticas producidas por fermentación en cultivo sólido son enzimas extracelulares de tipo endo enzimas, en su mayoría depolimerasas. En general, las enzimas despolimerizantes son de mayor interés en la industrialización de frutas y vegetales, ya que su uso facilita la maceración de frutas, proporcionando mayores rendimientos en la obtención de jugos.

3.6.3 Producción de ácidos orgánicos

En el estudio realizado por Laksmiaranaya et.al (43) sobre la producción de ácido cítrico, se reportan mejores rendimientos para el cultivo sólido que para el cultivo de superficie y el cultivo sumergido. Dos medios de cultivo líquido son utilizados, sacarosa y melazas, absorbidos sobre baga zo de caña en el cultivo sólido. Las fermentaciones se corrieron a 30°C por 6 días. Los medios se inocularon con esporas de Aspergillus niger. Después de la fermentación, el ácido cítrico fue extraído con agua destilada en el caso de la fermentación sólida. En el caso de los métodos de superficie y suemrgido el contenido de los matraces fue filtrado para separar el micelio del ácido cítrico.

3.6.4 Producción de Micotoxinas

Desde los años sesenta, la producción de aflatoxinas en medio sólido

ha sido extensamente estudiada (en vista de un control toxicológico de los productos).

Algunos de estos experimentos son reportados por Hesseltine (30). Ciertas cepas del género Aspergillus entre ellas Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus producen aflatoxinas sobre arroz, trigo, avena, maíz, etc.

La producción de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ en trigo por Aspergillus parasiticus en 8 días es muy variable. La producción más alta para aflatoxinas B₁ y B₂ es a los 5 días de incubación a 30°C siendo de 555 y 90 μ g/g de substrato respectivamente; para aflatoxinas G₁ y G₂ a 3 días de incubación se obtienen 549 y 98 μ g/g de substrato respectivamente.

CAPITULO IV

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Microorganismos

Se utilizaron cepas de Aspergillus niger, Penicillium sp y Rhizopus oryzae, las dos primeras cepas proporcionadas por el Dr. Carlos Huitrón del Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, fueron aisladas sobre pulpa de henequén por Susana Saval y el Dr. Carlos Huitrón (95). La tercera cepa de colección proporcionada por American Type Culture Collection (ATCC), 4858.

Las cepas anteriores se seleccionaron por su alta actividad pectinolítica. Son conservadas en un medio Extracto de Malta-Bacto-agar (difco. ref. 024) a 4°C durante 6 meses.

4.2 Preparación del inóculo

Las esporas se obtienen en matraces de 250 ml con 17 g de masa sólida. El medio está constituido por 20g de harina de yuca, 1g. de KH_2PO_4 , 0.5g. de urea, 0.5g de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0.5 de CaCl_2 , 7.5g agar en 500 ml de agua a pH=5.6.

Después de esterilizar el medio de cultivo en autoclave, los matraces se inoculan con esporas de una preparación en tubo inclinado del microorganismo y posteriormente incubados a 30°C por una semana.

Preparación de la suspensión de esporas.-Al matraz con esporas se adicionan 100 ml de agua destilada y una gota de Tween 80. El matraz se deja agitar por 15 minutos. La suspensión obtenida se pasa a través de una gasa para eliminar el micelio. La concentración de esporas se estima por cuenta microscópica directa, usando una cámara de Neubauer.

Quantificación de esporas y cantidad del inóculo.- De la suspensión de esporas anterior, se hace una dilución con agua destilada. Esta dilución debe ser perfectamente homogénea. La cámara de Neubauer se llena con esta solución

usando una pipeta pasteur. La cuantificación se hace tomando 10 cuadros al azar y se observa en el microscopio con el objetivo de 40x. Se obtiene un promedio de esporas por cuadro. Este promedio se multiplica por el factor de conversión 25×10^4 y por la dilución hecha inicialmente, obteniéndose una concentración x de esporas por ml de suspensión.

Usualmente un solo matraz proporciona aproximadamente 4×10^{10} esporas, que es suficiente para inocular 2 kg de substrato sólido. Raimbault (84).

La concentración de esporas necesaria para la fermentación se calcula considerando la cantidad de gramos de substrato peso seco en el medio. La concentración óptima de esporas por gramo de substrato es de 2×10^7 (84).

4.3 Medios de Cultivo y Condiciones

4.3.1 Medio Sumergido

El medio líquido utilizado se seleccionó en base a los máximos rendimientos reportados en la literatura para cada uno de los componentes del medio en la producción de enzimas pécticas (Anexo 1).

El medio se preparó con 2% de sacarosa como fuente de carbono, y 2% de pectina como substrato inductor para la síntesis de pectinasas. El medio contiene además 2% de extracto de levadura, 0.5% de NH_4NO_3 , 0.02% de NaSO_4 y minerales traza: 1.0 mg/l de FeSO_4 , 0.8 mg/l de ZnSO_4 , 4 mg/l de MgSO_4 y 1.0 mg/l de CuSO_4 , 5 H_2O . El medio se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente se ajusta el pH a 4.5. Las condiciones óptimas de la fermentación son: 30°C y en el inóculo de 2×10^7 esporas/g de substrato peso seco.

Se utilizaron 12 matraces de 250 ml conteniendo 125 ml de medio de cultivo líquido e inoculado con esporas en condiciones estériles. Los matraces se taparon con gasa y algodón. La fermentación se sigue por 5 días y tomando muestras por duplicado para cada día.

En todos los casos los matraces se incubaron a 30°C a 200 rpm en un baño con agitación y temperatura regulada.

4.3.2 Medio sólido

Se realizaron estudios preeliminares utilizando el medio de cultivo descrito para cultivo líquido. El soporte sólido que se utilizó fue bagazo de caña proporcionado por el Ingenio de Zacatepec, Mor., libre de azúcares. El bagazo fue secado, molido y tamizado para obtener la fracción 20-50.

Preparación del medio sólido.-Se prepara el medio sumergido sintético para tener el contenido de humedad requerido para la fermentación, se considera para esto los constituyentes sólidos del medio y el bagazo de caña necesario.

El bagazo de caña se humedece con el 50% del medio de cultivo preparado. Se esteriliza el medio sumergido restante y el medio sólido por separado a 121°C durante 15 minutos en autoclave.

El medio sumergido se ajustó a pH 4.5 después de la adición del inóculo. La fermentación en cultivo sólido se realiza en reactores empacados. El soporte sólido es bien mezclado junto con la solución conteniendo los nutrientes y el inóculo. La humedad final del medio sólido es de 70%.

El medio sólido preparado se reparte en los incubadores a razón de 30g por columna, encontrándose cada incubador en un baño maría con termostato a 35°C. Los incubadores son aereados con aire saturados de agua a razón de 4-6 l/hr. El sistema de incubación se muestra en la fig. 8.

El sistema de incubación consta de un humidificador que tiene una entrada de aire y una columna de vidrio con 3.6cm de diámetro y 16.5 cm de altura la cual contendrá el medio sólido. En la parte inferior y superior se coloca algodón y papel filtro para evitar contaminación y condensación durante la fermentación.

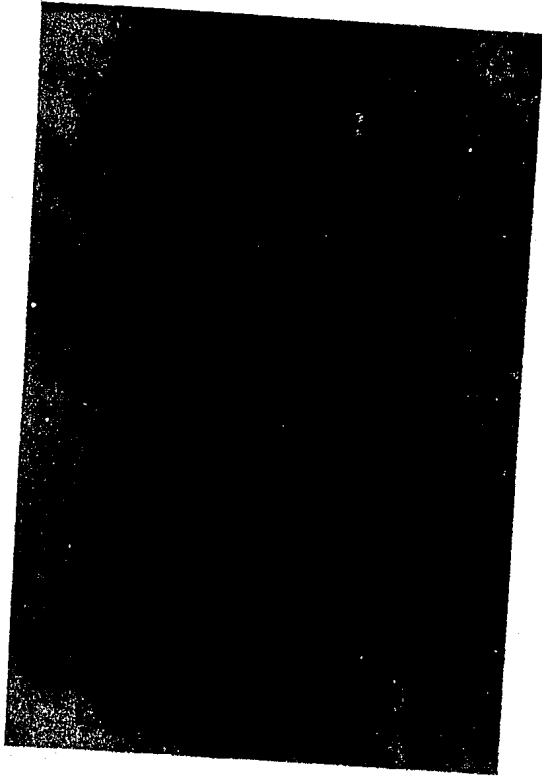


Fig. 8 . Microfermentador en columna

El tiempo de fermentación es de 72 horas. Se toman muestras por duplicado (cada columna constituye una muestra). Se toma una muestra a tiempo ce ro como control y a partir de las 15 horas se muestrea a intervalos de 5 horas.

4.4 Método de extracción de enzimas pécticas

El proceso de extracción de las enzimas y otros metabolitos solubles se efectúa con ayuda de una prensa hidráulica según diseño de Roussos (92). Este proceso consta de dos etapas: una primera etapa donde 30g de producto húmedo se prensan en una celda especialmente diseñada y adaptable a una prensa hidráulica.

Obteniéndose una primera fracción soluble. La fracción insoluble de la primera extracción se le adicionan 20 ml de agua destilada, se mezcla perfectamente y se lleva a cabo una segunda extracción, obteniéndose la segunda fracción soluble. Un esquema del proceso se muestra en la pág. 89.

4.5 Evaluación de los parámetros de la fermentación en cultivo sólido y en cultivo sumergido.

Los parámetros evaluados para seguir el curso de la fermentación en los dos tipos de cultivo son prácticamente los mismos, pero los métodos usados son diferentes.

Para el medio sumergido la determinación de la biomasa se realiza por el método de determinación de peso seco. Se toman 25 ml de muestra homogénea del caldo de fermentación, se filtran con vacío sobre papel filtro a peso constante. La biomasa obtenida se lava con agua destilada y se coloca en una caja pe tri, secándose a 100°C en una estufa, durante 6 a 8 horas.

El pH se mide en 25 ml del caldo de fermentación a 25°C en un potenciómetro (pH-meter E 516 Titriskop Metrohm Herisau).

Determinación de la Actividad Pectinolítica.-La actividad pectinolítica se determina por viscosimetría. Esta determinación se lleva a cabo con una solución de pectina al 1% en amortiguador de acetatos (pH 5.0) y a 30°C. Una unidad se define como la cantidad de enzima que reduce la viscosidad inicial en un 25% en 20 minutos. Inicialmente se analizó una enzima comercial (Irgazime, Ciba-Geigy). Para la medición de actividad se emplearon dos metodologías:

- a) Uso del viscosímetro Brookfield Modelo HBT
- b) Uso de una pipeta graduada de 0.1 ml.

Para el caso de la enzima comercial, se utilizaron concentraciones de enzima de 10, 20, 30, 40 y 50 rpm, determinándose la viscosidad en centipoises contra el tiempo de reacción (min) o el tiempo de flujo (seg), contra el tiempo de reacción (min), dependiendo de la metodología empleada. En base a los resultados obtenidos y representados en la fig. 9, se observa un comportamiento lineal en ambos métodos a las mismas concentraciones de enzima, así como en los tiempos de reacción, por lo que se llegó a la conclusión de que se podía trabajar con el método más sencillo, considerando solo el intervalo de concentración donde ambos son equivalentes y la linealidad entre la concentración de enzima y la velocidad de reacción.

En el caso del cultivo sumergido se emplea como solución de enzima el sobrenadante del caldo de fermentación, después de centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos.

Para cultivo sólido se emplean las fracciones solubles obtenidas en la operación de prensado, después de dejar que se sedimenten partículas en suspensión.

Para el caso de la fermentación sólida, el tratamiento de las muestras se realiza según el esquema de la fig. 10.

El contenido de humedad se determina gravimétricamente en 5g de producto.

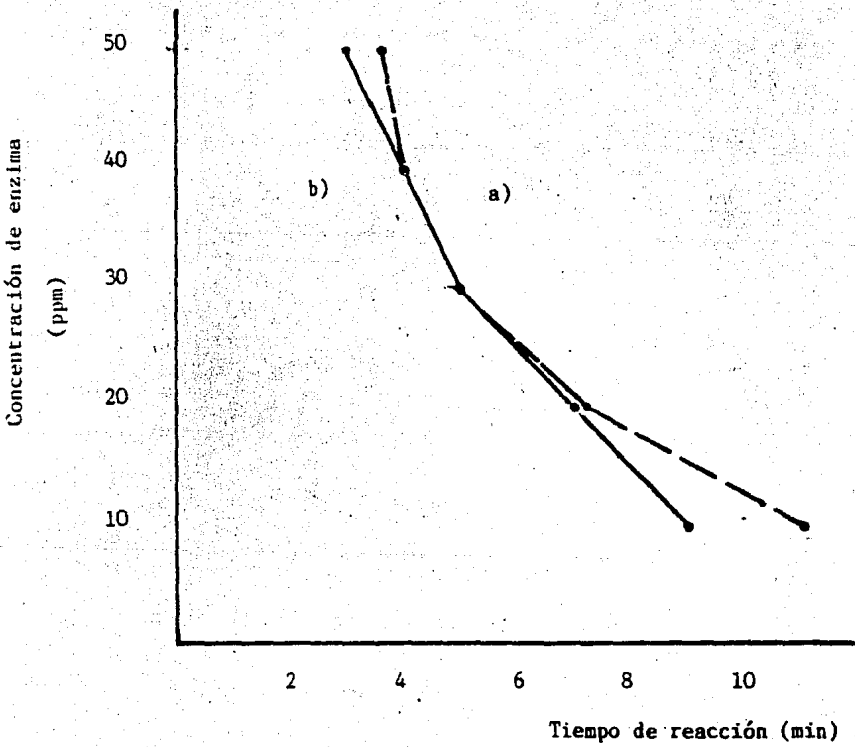


Fig. 9 . Determinación de la Actividad Pectinolítica por Viscosimetría: a) uso del viscosímetro Brookfield, (- - -); b) Uso de una pipeta graduada de 0.1 ml (—).

Para la medición de pH, carbohidratos residuales (azúcares totales y azúcares reductores), y determinación de ácidos nucleicos se requiere de preparar inicialmente una suspensión de 5g producto en 50 ml o 100 ml de agua destilada después de mezclar perfectamente.

La determinación de ácidos nucleicos.-En esta determinación se emplea el método de Ogury Rosen (75) por extracción de los ácidos nucleicos en ácido perclórico. 5 ml de la suspensión se centrifugan a 3000-5000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se elimina con una pipeta pasteur y a la parte insoluble se le adiciona 5 ml de ácido perclórico (0.5-0.7 M), mezclando perfectamente. La digestión de las muestras se lleva a cabo en un baño fisiológico con agitación y temperatura controlada, a 70°C durante 20 minutos. Después de la digestión, las muestras se centrifugan a 3000-5000 rpm durante 15 minutos. La solución debe estar cristalina para evitar interferencias. Las lecturas se realizan en un espectrofotómetro Beckman Modelo 25, a 260 nm entre 0.1-0.6 de Densidad Óptica.

Determinación de Carbohidratos Residuales.-Para determinar el consumo de sacarosa se empleó el método de determinación de Azúcares Reductores por el Ácido 3-5 Dinitrosalicílico (61), después de la hidrólisis de la sacarosa residual por la enzima Invertasa (Miles de México). Se toman 9 ml de una suspensión homogénea (4g de producto en 96 ml de agua destilada) y un ml de enzima (2 mg/ml). La reacción se efectúa a 55°C por 10 minutos, para una completa hidrólisis. Por otro lado se determinan los azúcares reductores presentes en las muestras sin tratamiento enzimático. La diferencia de estas dos determinaciones es la concentración de sacarosa en las muestras. Se expresa en mg/g producto peso seco inicial. En ambos casos se utilizó glucosa como estándar.

4.6 Termoestabilidad de la enzima

La solución de enzima con actividad de 142.9 U/ml se incubó a una tem-

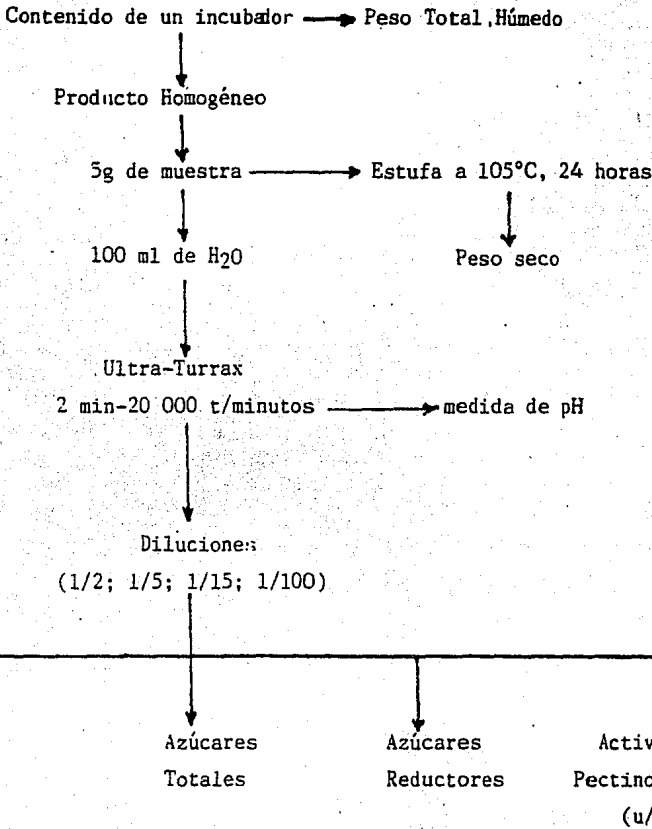


Fig. 10. Esquema de tratamiento y análisis de las muestras del producto en la fermentación sólida.

peratura de 50°C con agitación continua. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos), determinándose la actividad pectinolítica por el método antes descrito.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Comparación de Cepas

Para seleccionar la cepa adecuada se consideró la producción de enzima y cantidad de biomasa como parámetros fundamentales.

Primeramente se realizó la selección de cepas en medio sumergido, en matraces agitados utilizando el medio de cultivo sintético. Se hicieron varias pruebas con un tiempo de fermentación de 120 horas, tiempo óptimo para el proceso en cultivo sumergido. La tabla 14, muestra la actividad producida para cada cepa, medida por viscosimetría y la biomasa producida por determinación del peso seco.

De los resultados obtenidos se observa que la cepa de Aspergillus niger demuestra ser la más interesante en términos de la actividad enzimática, seguida por la de Penicillium sp. Esta última alcanza un máximo de actividad de 20 u/ml pero a largo tiempo (120h) y dada la dificultad para mantener las condiciones estériles en la fermentación sólida se optó por un proceso lo más corto posible. La cepa de Rhizopus oryzae se descartó por la dificultad de obtener esporas y el bajo nivel de producción de enzimas.

5.2 Diseño del Medio de Cultivo Sólido

El método de cultivo sólido se basa principalmente en la distribución homogénea del sustrato, esporas y sales en el material sólido usado como soporte. El contenido de humedad y el pH son esenciales para asegurar una eficiente aereación y un buen crecimiento del hongo respectivamente. Por otro lado la composición del medio de cultivo juega un papel muy importante en la síntesis de las enzimas, por esto realizaron ensayos preliminares con respecto a la composición del medio.

En primera instancia se probó la cepa de Aspergillus niger en cultivo

sólido en un medio sintético de pectina, sacarosa y sales absorbido sobre bagazo de caña molido.

Diferentes concentraciones de pectina y sacarosa se probaron para observar el efecto sinérgico de ambos substratos. Se corrieron fermentaciones utilizando diferentes relaciones de pectina-sacarosa. La tabla 15, muestra la actividad producida por Aspergillus niger para cada relación. De los resultados obtenidos sobresale la relación 3:6, a la que la actividad enzimática encontrada es mayor en un tiempo de fermentación menor, en relación con el medio sumergido lo que redunda en una mayor productividad. La relación 3:12 es también interesante pero tiene la desventaja de que altas concentraciones de sacarosa provocan mayor crecimiento del hongo, lo que promueve una esporulación temprana.

El medio de cultivo seleccionado fue el siguiente:

Soporte Sólido	Bagazo de caña	
Fuente de Carbono		
Sacarosa	6%	
Substrato Inductor		
Pectina	3%	
Fuente de Nitrógeno y Fósforo		
Urea	2.4g	} por 100g de substrato } peso seco
(NH ₄) ₂ SO ₄	9.8g	
KH ₂ PO ₄	5.0g	
Minerales Traza		mg/l
FeSO ₄	1.0	
ZnSO ₄	0.8	
MgSO ₄	4.0	
CuSO ₄	1.0	

El contenido de humedad del medio sólido es de 70%.

Puesto que el pH es un factor crítico en el desarrollo de la fermentación y en reactores estáticos su control se dificulta, debido a que el crecimiento micelial promueve una rápida acidificación del medio, Rimbault (84), propone el uso de sales de amonio y urea, que al ser utilizadas por el microorganismo como fuente de Nitrógeno evitan variaciones fuertes del pH. Por esto el medio de cultivo óptimo incluye sulfato de amonio y urea como fuentes de Nitrógeno.

5.3 Pruebas en Cultivo sólido

Con la finalidad de observar el comportamiento de la fermentación en la producción de las enzimas pécticas, se realizaron cinéticas de producción de estas enzimas.

En la fig. 11, se muestra una cinética de producción de enzimas pécticas, en la cual se puede observar una síntesis parcialmente desacoplada del crecimiento. Esto se confirma al observar el consumo de sacarosa, ya que ésta se agota y se puede suponer que se da lugar al consumo de la pectina, dado que la producción de las enzimas se incrementa notablemente. Esta etapa sucede entre las 30 y 35 horas de fermentación. La fermentación continúa hasta las 45 horas, tiempo en el que se obtiene la máxima actividad.

Con respecto a la humedad del producto, ésta se incrementa aproximadamente de un 3 a 4% durante la fermentación, debido a la respiración del hongo.

El pH, importante en la síntesis de las enzimas, baja en las primeras horas de la fermentación, durante la fase exponencial de crecimiento del hongo. Después se estabiliza y casi permanece constante hasta el final de la fermentación.

Considerando que la cepa de Penicillium sp., podría constituir otra opción

para el proceso, se realizaron cinéticas de producción de enzimas pécticas obteniéndose los resultados presentados en la fig. 12. La actividad enzimática producida por esta cepa fue menor a la producida por Aspergillus niger a las mismas condiciones de cultivo sólido, observándose además un crecimiento muy lento del hongo. Por estas razones se decidió descartar esta cepa y efectuar el trabajo posterior con Aspergillus niger.

5.4 Extracción de Enzimas

La operación de recuperación de enzimas pécticas por prensaje es muy sencilla y consta de dos etapas: una primera etapa donde se prensa el producto sin tratamiento y una segunda donde se le añade agua al residuo insoluble de la primera extracción. La actividad volumétrica lograda en la segunda fracción soluble es mayor que en la primera, se puede pensar que las enzimas están absorbidas a la pared del hongo y que se liberan más fácilmente después de una primera alteración mecánica, Raibault (2), reporta un fenómeno similar con glucoamilasas.

5.5 Termoeestabilidad de la enzima (Aspergillus niger)

La disminución de la actividad con el tiempo de incubación es evidente, a los cinco minutos pierde aproximadamente el 65% de su actividad y decrece gradualmente hasta que se inactiva totalmente a un tiempo de incubación de 60 min.

TABLA 16
Termoeestabilidad de la enzima a 50°C

Tiempo (min)	Actividad u/ml
0	142.9
5	50
10	26.5
15	25.63
30	19.4
45	7.8
60	-

Nota: A temperatura ambiente la actividad permanece constante por un mes.

Las características de termoeestabilidad del extracto enzimático obtenido es semejante a las que se reporta en estudios en la literatura. Sin embargo esta característica no infiere en su aplicación en algunos procesos en la industria agroalimentaria debido a que las condiciones de temperatura a las cuales se trabaja son menores.

De los resultados encontrados en relación a la productividad del cultivo sumergido y cultivo sólido se tiene que la actividad volumétrica para el primero fue de 0.92 u/unidad de volumen/h. Se determinó considerando la actividad máxima producida por Aspergillus niger y el tiempo en que se alcanza ésta. Para el cultivo sólido la actividad volumétrica encontrada fue de 7.95 u/unidad de volumen/h, y se determinó considerando el volumen útil del reactor, la masa en gramos empacada y las unidades por g. obtenidas de la operación de recuperación.

La actividad pectinolítica producida por unidad de volumen de reactor resulta ser de mayor magnitud en cultivo sólido que en cultivo sumergido lo que nos permite considerar como factible el escalar este proceso a un nivel semipi_loto en reactor estático.

TABLA No. 14 PRODUCCION DE PECTINASAS CON DIFERENTES
CEPAS. ENSAYOS EN MATRACES AGITADOS

CEPA	TIEMPO (h)	BIOMASA (g/l)	pH	ACT. PECT. (U/ml)
<u>Aspergillus niger</u>	48	4.84	3.8	5
<u>Penicillium sp</u>	48	0.778	4.4	0
<u>Rhizopus oryzae</u>	48	12.20	4.2	0
<u>Aspergillus niger</u>	72	7.71	3.7	5
<u>Penicillium sp</u>	72	0.87	4.4	0
<u>Rhizopus oryzae</u>	72	16.55	4.1	1
<u>Aspergillus niger</u>	120	6.95	3.5	11.1
<u>Penicillium sp</u>	120	6.46	5.5	20
<u>Rhizopus oryzae</u>	120	18.30	3.9	5

TABLA No. 15 PRODUCCION DE PECTINASAS EN MEDIO SOLIDO
 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO
 PECTINA/SACAROSA

RELACION	TIEMPO (h)	ACTIVIDAD (U/ml)	ACTIVIDAD PECT. (U/g)
3/3	24	120	83.59
	40	500	357.65
	64	125	92.10
3/6	24	250	176.10
	40	500	341.80
	64	1000	672.60
3/12	24	140	89.70
	40	333	222.00
	64	666	477.00

Cepa A. niger CH4

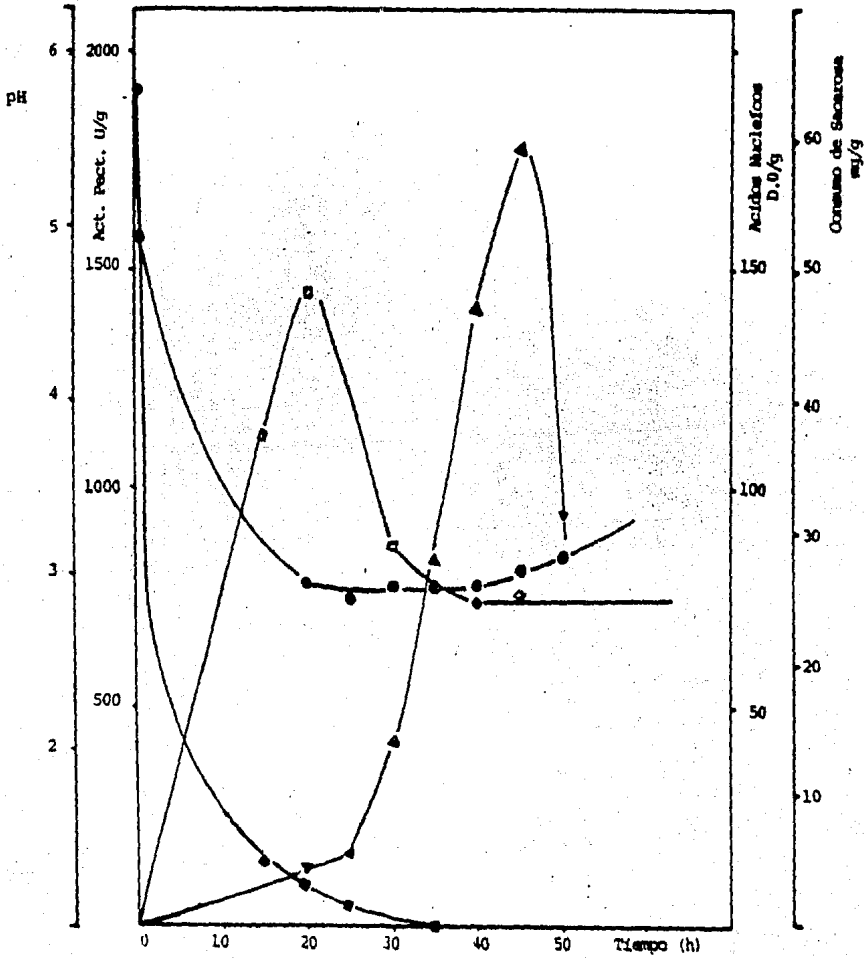


Fig. 2. Cinética de Producción de Pectinasas. Cepa *A. niger*. Actividad Pectinolítica U/g de S. Húmedo, (▲-▲); Evolución del pH, (●-●); Producción Acidos Nucleicos D.O/g S.H., (□-□); Consumo de Sacarosa mg/g - S.H., (○-○).

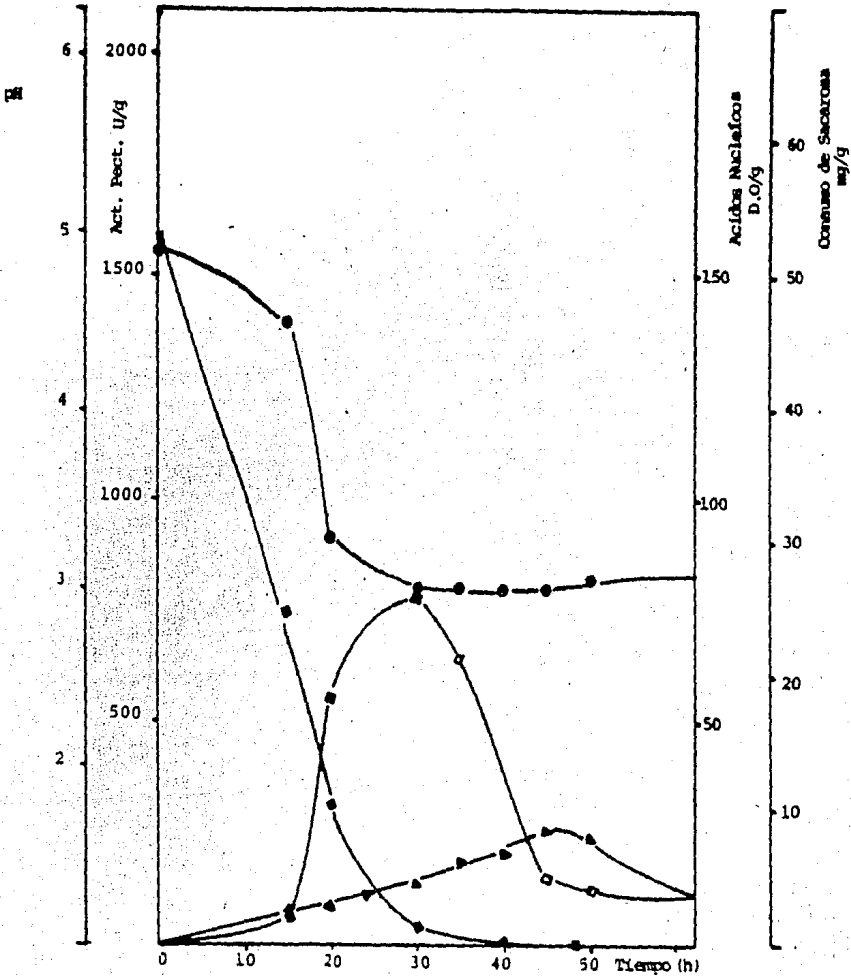


Fig. 2. Cinética de Producción de Pectinasas. Cepa *Penicillium* sp. Actividad Pectinolítica U/g de S. Húmedo, (▲-▲); Evolución del pH, (●-●); Producción Acidos Nucleicos D.O/g S.H., (■-■); Consumo de Sacarosa mg/g S.H., (□-□).

CAPITULO VI

6. PRUEBA SEMIPILOTO

De acuerdo a los resultados obtenidos a nivel laboratorio resulta factible escalar este proceso a un nivel de producción mayor, como es un nivel semipiloto en reactor estático de tipo zymotis.

El biofermentador estático Zymotis para el cultivo de hongos filamentosos en medio sólido sobre substratos amiláceos y celulósicos es descrito en la fig. 13 y 44, Roussos (92). Está constituido por una cuva paralelepípeda dividida en doce compartimientos separados por placas de refrigeración.

El llenado del Zymotis se hace colocando en cada compartimiento el medio sólido preparado y condicionado (70% de humedad). La capacidad de este fermentador es de 50 kg de medio sólido preparado.

La aireación del cultivo se hace por la base de la cuva, asegurando una buena oxigenación del medio sólido, el aire saturado de agua entra a razón de 300-600 l/hora/kg. La temperatura se controla a 35°C.

El fermentador se llenó a una capacidad de 10 kg de medio sólido impregnado con el medio sintético anteriormente descrito para la producción de pectinasas. El inóculo se adicionó en una concentración de 2×10^7 esporas/g de substrato peso seco y el pH de 4.5, fue ajustado de la misma forma que en nivel laboratorio. La fermentación se siguió durante 45 horas.

El incremento de humedad después de 48 horas de fermentación es solamente del 1% (70.75-71.5) contra 3-4% en las columnas utilizadas en nivel laboratorio. Esto se debe a dos razones, dificultad de saturar de agua el aire con flujos muy elevados y la falta de homogeneidad del producto en los compartimientos, el cual tiende a humidificarse abajo y secarse arriba. Esto también puede ser resultado del incremento de temperatura provocado por el calor metabólico producido y no disipado rápidamente, lo que ocasiona un secado del producto. En relación al proceso de recuperación de enzimas por prensado se

presentaron diversos problemas principalmente ligados al tipo de prensa utilizado, fig. 15; ya que la prensa disponible resultó ser de menor potencia que la prensa usada a nivel laboratorio.

El volumen de la primera fracción soluble fue de 3 litros con actividad de 100 u/ml y la segunda fracción fue de 4 litros con actividad de 50 u/ml. La mayor recuperación de las enzimas se tuvo en la primera extracción a diferencia de lo que se observa a nivel laboratorio, donde la mayor actividad se encuentra en la segunda fracción soluble. No existe una explicación clara que justifique estos resultados, aunque seguramente el efecto de la presión del prensado debe ser analizado con mayor detalle por ser ésta la única diferencia entre los experimentos efectuados.

Ultrafiltración

La mezcla de las fracciones solubles obtenidas del producto prensado, con actividad de 57.9 u/ml, se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos a una temperatura de 4°C, para evitar que las enzimas presentes en el extracto se desnaturalicen. El objeto de la centrifugación es eliminar partículas en suspensión.

El volumen de extracto obtenido es tratado por un método de separación: la ultrafiltración. Este método utiliza presión o fuerza centrífuga para obligar a pasar el medio acuoso y las moléculas de menor peso molecular a través de una membrana semipermeable o una fibra porosa que permite la retención de las moléculas de mayor peso molecular como las enzimas. Los pesos moleculares de corte son función de la membrana o fibra seleccionada. La operación de separación se llevó a cabo en un equipo de ultrafiltración Modelo RF-LAB-5RF con capacidad de 10 litros por hora, el tipo de membrana es de PM 10 Romicon, con peso molecular de corte de 10 000.

El volumen de trabajo fue de 6 litros, la presión de salida de 5 Psi, la presión de entrada de 26.3 Psi.

El volumen obtenido de la ultrafiltración es de 1400 ml de solución concentrada de enzimas con una actividad de 142.9 u/ml.

Se determinó la actividad en este permeado, pero no se detectó.

Las características del proceso se resumen en la tabla 17.

TABLA 17

Resultados de la ultrafiltración del extracto enzimático obtenidos de la fermentación sólida (AP=21.3 psi)

Ultrafiltración	Volumen (ml)	Actividad (u/ml)	Actividad total (u. totales)	Eficiencia (%)
Extracto de fermentación	6 000	57.9	347, 400	-
Volumen Retenido	1 400	142.9	200, 000	57.6

En la tabla 17, puede observarse que las pérdidas de actividad durante el proceso fueron considerables, esto puede ser consecuencia de un incremento de temperatura, por cavitación dada los flujos muy importante durante el proceso o bien al probarle atrapamiento de enzima dentro de las fibras. En realidad se seleccionó el tamaño de fibra más pequeña (PM corte 10 000), pero sería conveniente analizar el comportamiento del sistema con otro tipo de fibras (eg. PM=50 000).

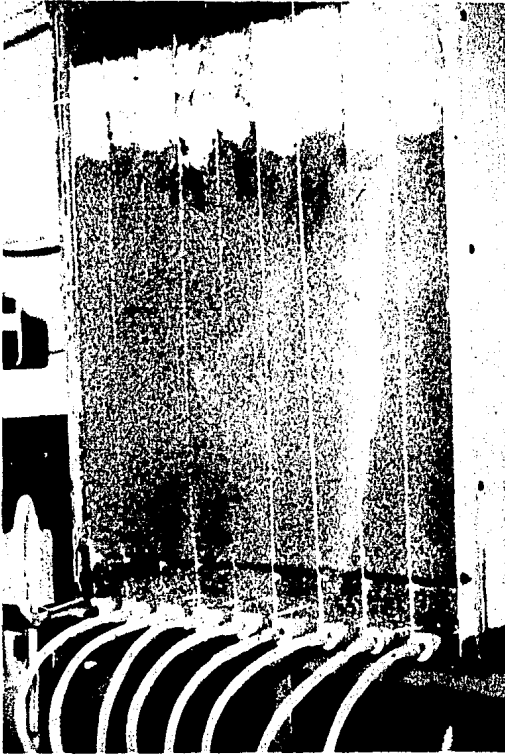


Fig. 13. Vista lateral del biofermentador Zymotis.

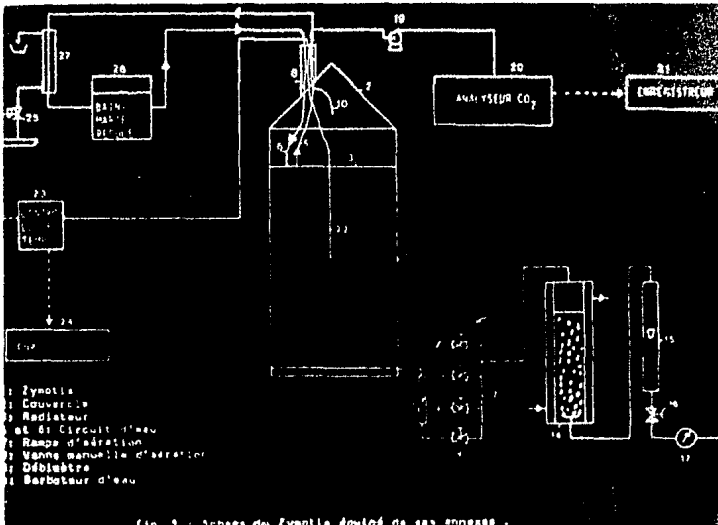


Fig. 14. Diagrama del Zymotis

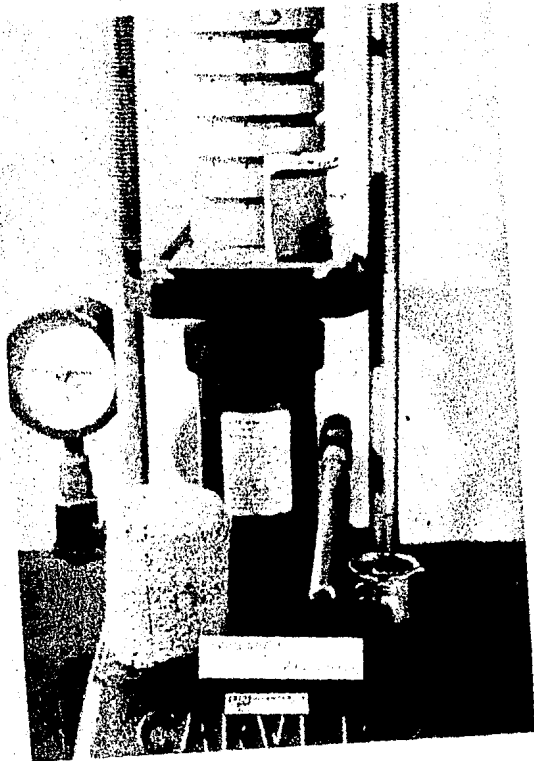


Fig. 15 . Prensa utilizada a nivel semipiloto.

CAPITULO VII

APLICACIONES DEL PRODUCTO

Dentro de las aplicaciones más importantes de las enzimas pécticas en la industria agroalimentaria se encuentra la extracción de jugos y la clarificación de estos mismos, los cuales se ubican en la industria de procesamiento de frutas. Una aplicación reciente es en el proceso de extracción de aceite de coco (17). Este proceso presenta grandes ventajas en la extracción del aceite por vía enzimática, destacando la mejor calidad del producto obtenido, la reducción de costos de infraestructura y de mano de obra.

Con la finalidad de probar el producto obtenido por fermentación en cultivo sólido se realizaron aplicaciones del producto en la clarificación de jugo de manzana y la extracción de aceite de coco por vía enzimática, al mismo tiempo que se comparó con una enzima comercial.

A. Aplicación de la enzima (Aspergillus niger) en la clarificación de jugo de manzana.

La despectinización del jugo de manzana es una determinación de la actividad pectinolítica relativa de la enzima péctica.

Procedimiento:

Obtención del jugo de manzana.-Se trituraron las manzanas finamente. Después se mezcló una parte de la pulpa obtenida por una parte de una solución de NaCl al 0.1%. La suspensión resultante se filtró a través de gasa o manta cielo para obtener el jugo.

Volúmenes iguales del jugo se colocaron en tubos de ensaye, a uno de los cuales se adicionó la solución de enzima comercial para obtener una concentración final de 30 rpm y al otro la solución de enzima de Aspergillus niger a una dilución final de 1:50. El sistema de reacción se incubó a 45°C durante una hora. Pasado este tiempo se inactivaron las enzimas a 90°C por 5 minutos. Un volumen igual de jugo de manzana se utilizó como control.

Esta misma prueba se realizó tomando diferentes volúmenes de enzima de Aspergillus niger, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 ml de la solución de enzima a las mismas condiciones y tomando un volumen igual de jugo de manzana como testigo.

Los resultados de las pruebas anteriores se muestran en las tablas (18 y 19). La observación visual de la reacción enzimática se expresó con signos para determinar las diferencias de actividad despectinizante de ambas preparaciones. Resulta evidente que la enzima de Aspergillus niger presenta alta actividad despectinizante, la cual es comparable con la que presenta la enzima comercial. Las diferencias visuales de este experimento se muestran en la fig. 11.

B. Aplicación de la enzima de Aspergillus niger en la extracción de aceite de coco.

La aplicación de enzimas en este proceso es relativamente nueva. Entre las enzimas que intervienen en el proceso están las pectinasas y otras de interés industrial. Considerando interesante la aplicación de estas enzimas en la extracción de aceite de coco se procedió a realizar un experimento en el cual se comparó la enzima producida de Aspergillus niger y una enzima comercial.

Procedimiento:

Se utilizaron 600 g de carnaza de coco maduro y fresco. La carnaza se picó en una Moulinex y se dividió en dos partes iguales. Se formó una emulsión en la licuadora con la cantidad correspondiente de agua (dilución 1:4), para 300g de coco se requieren 1 200 ml.

Las emulsiones obtenidas se pasaron a 2 matraces de 2 litros, los cuales se usaron como recipientes de reacción. Las condiciones del sistema de reacción se controlaron mediante el uso de un baño de agua con control de

temperatura a 40°C y un agitador de aspas con agitación de 200 rpm.

Con las condiciones de operación establecidas se adicionaron las enzimas al 0.1% (p/v). Las enzimas utilizadas fueron: Pectinasas Irgazyme (Ciba-Geigy) PG; Tenasa Amilasa (Complementos Alimenticios S.A.); (Proteasas microbianas de Enmex) Papaína y la solución de enzima producida de Aspergillus niger. Se diseñaron dos sistemas:

Sistema I		Sistema II	
Amilasa	0.1%	Amilasa	0.1%
Papaína	0.1%	Papaína	0.1%
Pectinasa	0.1%	Pectinasa	10 ml
Comercial		(de A. niger)	

Después de 30 minutos de reacción, la emulsión tratada se decantó para eliminar sólidos. La solución de cada matraz se pasó a 1 matraz de 2 litros respectivamente y se dejó en refrigeración para que la grasa se separara formándose una capa en la parte superior de cada matraz. El agua de la parte inferior se eliminó mediante un sifón, la grasa se obtiene con la menor cantidad de agua posible. Posteriormente se recupera en vasos de precipitados y se coloca en la estufa para fundir la grasa y centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos. El contenido de grasa del coco es de 27%.

La eficiencia obtenida de aceite de coco en la extracción con la enzima de Aspergillus niger y la enzima comercial fue de 73 y 75% respectivamente. La eficiencia reportada por Cintra et.al (17) es de 80%. Las principales pérdidas se tuvieron en la recuperación del matraz de reacción y después en los tubos de centrifuga. El producto obtenido es un sólido blanco y a temperatura ambiente y un líquido incoloro a 50°C, fig. 17.

Por los resultados obtenidos en ambas pruebas es claro que la actividad pectinolítica de la preparación de las enzimas obtenida de Aspergillus niger es comparable a la que presentan los productos comerciales.

TABLA No.18 ACTIVIDAD PECTINOLITICA RELATIVA POR
DESPECTINIZACION DEL JUGO DE MANZANA

SISTEMA DE REACCION	OBSERVACION VISUAL **
ENZIMA COMERCIAL (30 ppm)	+ + + + + + + + + +
ENZIMA CONCENTRADA * (0.4 ml)	+ + + + + + + + + +
TESTIGO	—

* Enzima concentrada producida por fermentación sólida

** Los signos anteriores indican:

+ + + + + Completa despectinización
 + + + + Buena despectinización
 + + + Regular despectinización
 + + Baja despectinización
 + Ligera despectinización
 — Ausencia de actividad despectinizante

TABLA No.1ª ACTIVIDAD PECTINOLITICA RELATIVA A DIFERENTES VOLUMENES DE ENZIMA CONCENTRADA

SISTEMA No.	VOL. ENZIMA CONC. (ml)	OBSERVACION VISUAL
A	0.4	+ + + + +
B	0.3	+ + + +
C	0.2	+ + +
D	0.1	+ +
E	1.0 *	+ + +
TESTIGO	Blanco	-

* Enzima sin concentrar

Nota:

Volumen de Reacción 20 ml

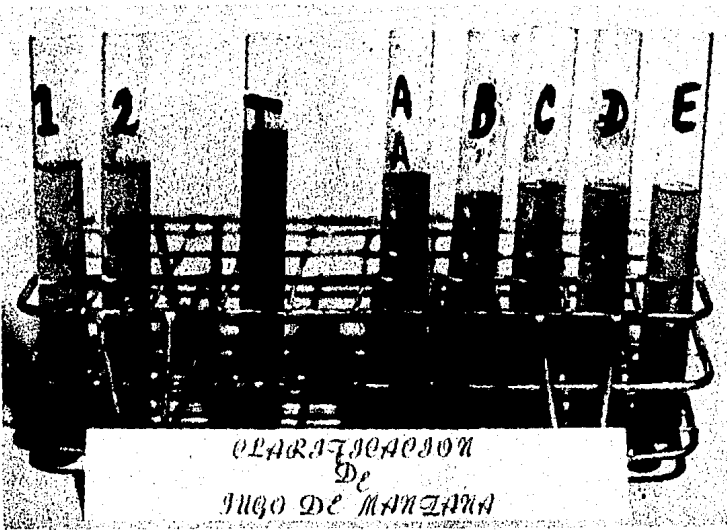


Fig. 16 Observación visual de la despectinización enzimática del jugo de manzana.

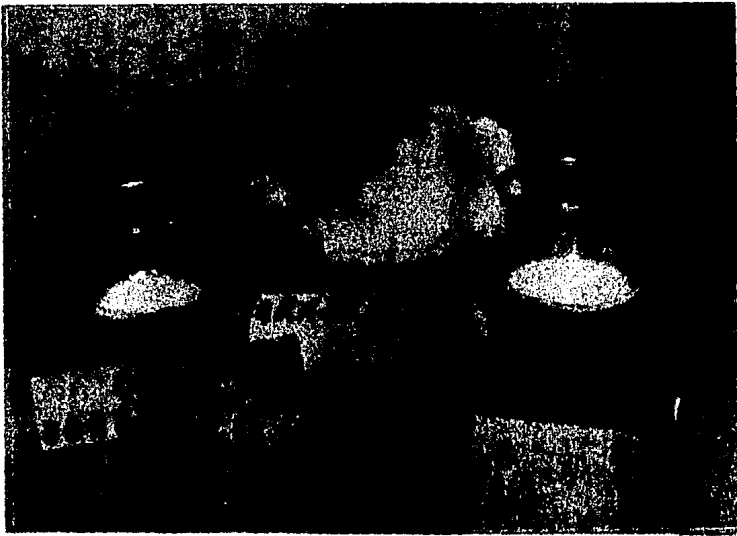


Fig. 17 . Extracción de aceite de coco.

CONCLUSIONES

La cepa de Aspergillus niger fue seleccionada por su alta actividad pectinolítica, además de presentar características adecuadas para su desarrollo en cultivo sólido. Aspergillus niger es un hongo filamentoso, capaz de crecer con un bajo contenido de humedad y sintetizar enzimas pécticas y extracelularmente, las cuales son inducidas mediante adición al medio de cultivo del substrato inductor: la pectina, además es ya una cepa aprobada por la FDA.

Las condiciones óptimas para el desarrollo de Aspergillus niger en cultivo sólido resultaron ser de: pH 4.5, temperatura 35°C, humedad inicial de 70% y una concentración de inóculo de 2×10^7 esporas/g de substrato peso seco.

El medio óptimo encontrado contiene concentraciones de pectina y sacarosa de 3% y 6% respectivamente, lo que resulta superior a lo reportado para un medio en cultivo sumergido. La pectina induce notablemente la síntesis de enzimas pécticas. Las sales de amonio y urea adicionadas tienen una función amortiguadora durante la fermentación, evitando variaciones fuertes del pH.

La producción de las enzimas pécticas durante la fermentación alcanza un máximo de actividad a las 45 horas, reduciendo dos veces el tiempo de fermentación de alta producción reportada para el cultivo sumergido. La síntesis de las enzimas pécticas de Aspergillus niger es parcialmente desacoplada del crecimiento.

El empleo de un soporte inerte (bagazo de caña) para la absorción del medio de cultivo resultó altamente satisfactorio al facilitar el proceso en sus diversas etapas: alta capacidad de absorción, desarrollo adecuado del microorganismo y fácil recuperación del producto mediante prensado del material al final del proceso.

La productividad encontrada en el cultivo sólido es superior a la determinada en cultivo sumergido para el mismo microorganismo. Esta diferencia puede ser probablemente menor si se trabaja el proceso sumergido en condiciones más estrictas (control del pH, aereación, etc.). Sin embargo la productividad seguirá siendo alta en el cultivo sólido, dado que el tiempo en el que se alcanza la máxima actividad es menor.

El sistema de extracción de enzimas por prensado resulta ser una operación eficiente de recuperación de enzimas producidas mediante esta técnica, en general es una alternativa más en el procesamiento de metabolitos producidos vía fermentación en cultivo sólido. La eficiencia de recuperación de las enzimas por este método depende en gran parte de la potencia de la prensa utilizada y es conveniente analizar su potencial para enzimas intracelulares.

El escalar este proceso a nivel piloto requiere de estudiar los parámetros más críticos como la pérdida de humedad, la evolución del pH, la aereación y el incremento de la temperatura, así como el de mejorar el sistema de extracción establecido, de tal forma que se optimice este proceso para la producción a gran escala no sólo de enzimas sino también de diversos metabolitos de interés industrial.

En general, este trabajo demuestra que es posible producir enzimas pécticas en cultivo sólido y paralelamente promover el aprovechamiento de materiales lignocelulósicos que en su mayoría son subproductos agroindustriales.

Por otro lado la aplicación de las enzimas pécticas en la industria alimentaria es cada vez más importante por lo que es conveniente considerar la disponibilidad de la pectina para implementar su producción. La idea es emplear en el proceso residuos agroindustriales, que aporten la pectina, disminuyendo el costo del medio de producción, lo que resultaría interesante y económicamente redituable. La enzima producida en el experimento piloto fue empleada con éxito en diversas aplicaciones de pectinasas en la tecnología de alimentos, habiendo clarificado jugo de manzana y extraído aceite de coco, con eficiencias iguales a las obtenidas con los productos comerciales disponibles en México, todas ellas de importación.

DIAGRAMA DEL PROCESO

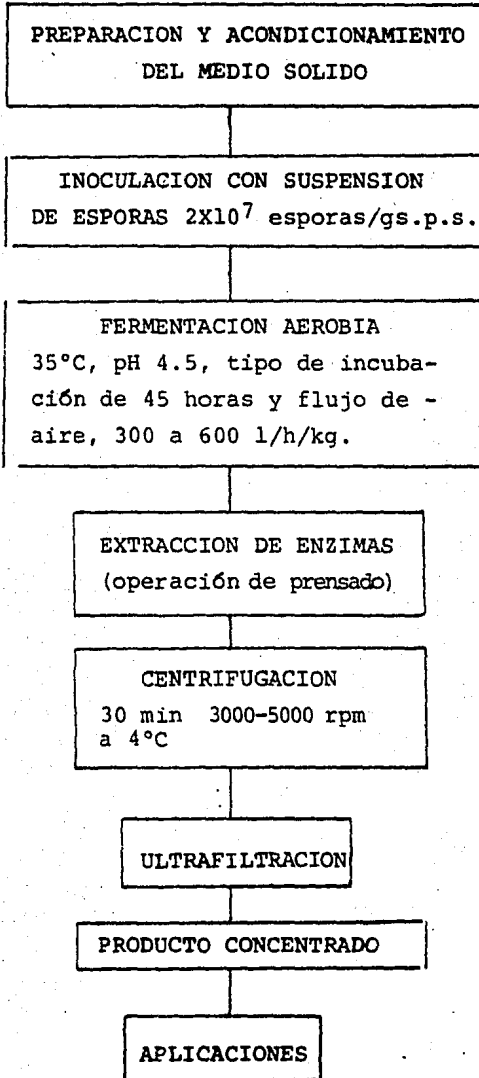
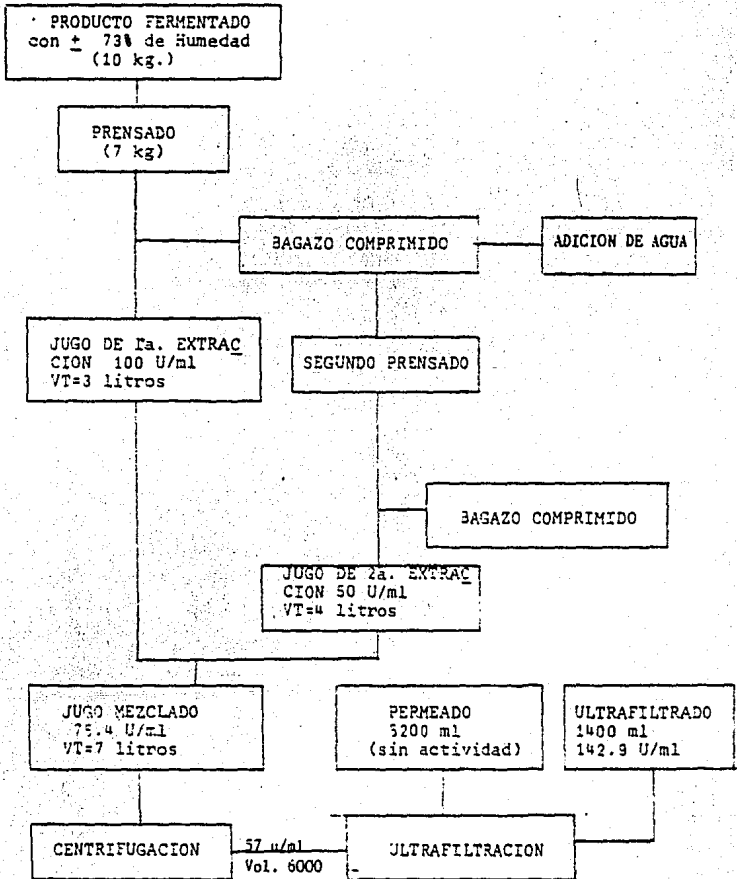


DIAGRAMA DEL PROCESO DE RECUPERACION
DE LAS PECTINASAS PRODUCIDAS POR FERMENTACION SOLIDA.



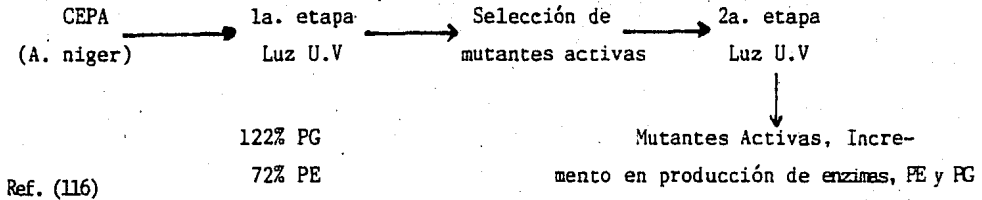
NOTA.-En el volumen de permeado se incluye agua de lavado, que no fue posible eliminar.

A N E X O I

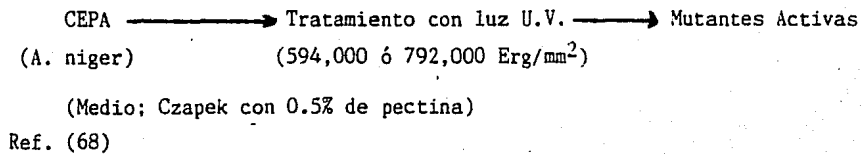
A. SELECCION DE ASPERGILLUS NIGER

Procesos de Mutación

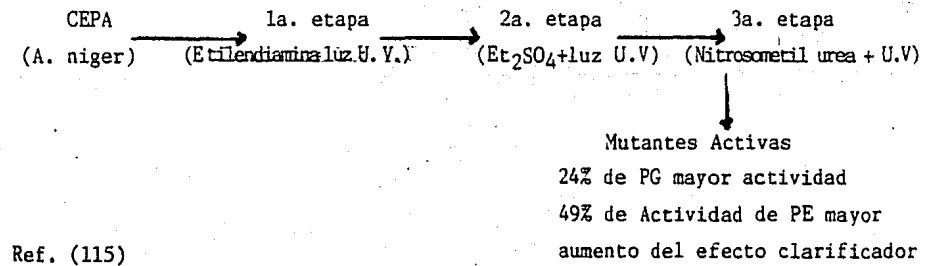
METODO I



METODO 2



METODO 3 (combinado)



METODO 4: De Mutación para A. Nigier (Producción de PE)

Orden Creciente de Producción de PE

- a) NaN₃ (0.015; 8 horas).
- b) N-metil-N'nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) (100 mg/ml; 120 min)
- c) Et-metano-sulfato (0.15 M; 60 min)
- d) Radiación gama (4 KGy)

Ref. (118).

B. FUENTE DE CARBONO

TABLA 20

Efectos de los cambios del tipo de carbohidratos en el medio ,
sobre la actividad por disminución de la viscosidad en el cultivo líquido.*

Contenido de Carbohidratos en el medio (%)		Cultivo líquido (Actividad u/ml)
Pectina	2 + Almidón 3	28
Pectina	2 + Dextrina 3	88
Pectina	2 + Fructosa 3	100
Pectina	2 + Sacarosa 3	101
Pectina	2 + Glucosa 3	101
Pectina	2 + Galactosa 3	159
Pectina	5	100

* El medio contiene carbohidratos junto con 0.02% de Na_2SO_4 y 0.5% de NH_4NO_3 en extracto de harina de cacahuete. La fermentación se corrió en matraces agitados por 5 días.

Ref. (105).

TABLA 21

Efectos de los cambios de la concentración de pectina y sacarosa

Contenido de carbohidratos del medio (%)	Actividad de cultivo líquido (u/ml)	Digestión de pectina % Hidrólisis
Pectina 4	90	100
Pectina 3 sacarosa 1	160	100
Pectina 2 sacarosa 2	210	95
Pectina 1 sacarosa 3	125	88
Sacarosa 4	80	85

Tiempo de fermentación 5 días.

Ref. (105).

Eficiencia de los carbohidratos en la reducción PG

Orden Decreciente

Lactosa, Glucosa, Sacarosa, Fructosa; Almidón, Maltosa y galactosa (107), en presencia de un substrato inductor.

C. FUENTE DE NITROGENO:

- Fuentes orgánicas Producción máxima
- Peptona Rendimiento máximo (e días)(69)
- Fuentes Inorgánicas
- NH₄NO₃ Optimo rendimiento (7 días)(107)
- (NH₄)₂HPO₄..... Producción de PG
- Nitratos..... Producción de PG
- NaNO₃ + NH₄Cl..... Incremento de Actividad
- NH₃..... Incremento de Actividad

D. SALES:

	Concentración	Actividad
NaCl.....	0.001-0.1 M	Incremento de actividad PG (endo)
NaNO ₃	0.001-0.1 M	más que PG (exo)
NaBr.....	0.001-0.1 M	Se inhibe la Actividad PE
KBr.....	0.001-0.1 M	La endo PG se inhibe después de un tiempo por incremento de pH.
Ref. (115).		

TABLA 22

Máximo Rendimiento obtenido de sales y minerales traza

Sales	Concentración (%)	Elementos traza	Concentración (mg/ml)
K ₂ HPO ₄	0.29	Fe	1.0
MgSO ₄	0.25	Zn	0.8
KCl	0.05	Mo	4.0
Na ₂ SO ₄	0.05	Cu	1.0
CaCl ₂	0.022		

Ref. (68).

E. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES

Medio no. 1

Fuente de Carbono: pectina 4%. Fuente de Nitrógeno: NH_4NO_3 (rendimiento óptimo 7 días), Peptona (Máxima producción en 6 días); la relación óptima de Carbono/Nitrógeno (C/N) igual a 10. Las condiciones de la fermentación son pH 4.5, temperatura 30°C; concentración de inóculo de 5×10^3 esporas/30 ml medio, y un tiempo de fermentación de 7 días. (107).

Medio no. 2

Un medio básico constituido por: extracto de germen de malta 5%, como complemento extracto seco de azúcar de remolacha, además de MgSO_4 0.05% y KH_2PO_4 0.5%. Elementos traza: Co^{2+} y Mn^{2+} . Las condiciones de fermentación son pH 5.0, temperatura 30°C y un tiempo de fermentación de 72 horas. (118).

Medio no. 3

Fuente de Carbono: Sacarosa 2%, Pectina 2%. Fuente de Nitrógeno: NH_4NO_3 0.02% y Na_2SO_4 0.05%. Con extracto de harina de cacahuate. Las condiciones de fermentación son pH 3 y 4, temperatura 30°C; concentración de inóculo de 4×10^4 - 5×10^4 esporas y un tiempo de fermentación de 5-6 días. (105).

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aidoo K.E., Hendry, R., Wood B. J. B. "Solid Substrate Fermentations "Advances in Applied Microbiology. 28, 201-237 (1982).
- 2.- Alazard D., Raimbault M. "Comparative Study of Amilolytic Enzymes Production by Aspergillus niger in Liquid and Solid-State Cultivation". European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12, 113-117 (1981).
- 3.- André G., Moo-Young M., Robinson C.W. "Improved Method for the Dynamic measurement of Transference coefficient for Application to Solid-Substrate Fermentation." Biotechnol. Bioeng, 13,1611-1622), (1982)1.
- 4.- Anaya M.C., López Arjona J. L. "Continuous Clarification of pectin solutions in a basket reactor with immobilized comercial Pectinases. Symposium Internacional Versailles Ed. D. Dupy Technique et Documentation Lavoisier 503-511 (1982).
- 5.- Bajracharya K., Mudgett R.E. "Effects of Controlled gas Enviroments in Solid-State of Rice." Biotechnol. Bioeng. 12, 2219-2235, (1980).
- 6.- Baldensperger J., Le mer J., Hannibal L., Quinto P. J. "Solid-State Fermentation of banana wastes." Biotechnol. 7, No. 10, 743-748, (1985).
- 7.- Bateman D.F. "Polygalacturonase Complex produced by Sclerotium rolfsii." Phyl. Plant Pathol. 2,175, (1972).
- 8.- Baumann J. W. "Application of Enzymes in fruits and Food Tecnology Enzymes and Food Processing." Ed. Biuch G. G., N. Blakebrough, Parker K.J. Applied Science Published L; A. London. Cap. 7, 129-147 (1980).
- 9.- Beck C. I., Scott D. "In Food-Related Enzymes". Advances in Chemistry Series 136 Americal Chemical Society. Ed. by Whitaker J. R., 1-30, (1974).
- 10.-Bernfeld P., Nisselbaum J. S., Fishman W. H. "Dissociation and Activation of Glucuronidase. " Methods Enzymol. 1,49-158, (1955).
- 11.-Braddock R. J., Kesterson J. W., "Use of Enzymes in Citrus Processing." Food Technol. 33(11), 78-83, (1979).

- 12.- Brook E. J., Stanton W. R., Wallbridge A., "Fermentation Methods for protein Enrichment of Cassava." *Biotechnol. Bioeng.* 11, 1271-1284 (1969).
- 13.- Calesnik E. J., Hills C. H., Willaman J. J. "Properties of a comercial fungal Pectase preparation". *J. Biol. Chem.* 168, 432-440 (1951).
- 14.- Cannel E., Moo-Young M. "Solid State Fermentation Systems". *Process. Biochemistry.* 15(5), 2-7, (1980).
- 15.- Capellini R. A. "Growth and PG production by Rhizopus stolonifer." *Phytopathol.* 56, 734, (1966).
- 16.- Carrizales V. "Producción de Enzimas Extracelulares en Cultivos Semisólidos." *Biotecnología de Enzimas.* Ed. Carlos Huitrón, UNAM. 71-85, (1982).
- 17.- Cintra Mc Glone O., López-Munguía Canales A., Carter J. V. "Coconut Oil Extraction by a new Enzymatic Process." *J. Food Science* 51(3), 695-697, (1986).
- 18.- Chang L. W. S., Morita L. L., Yamamoto H. Y. *J. Food Science*, 30, 218-222 (1965). "Papaya pectin esterase inhibition by sucrase."
- 19.- Dave B. A., Vaughn R. A. "Purification and properties of a Polygalacturonic Acid Trans-eliminase produced by Bacillus pumilus." *J. Bact.* 108, 166 (1971).
- 20.- Demain A. L., Phaff H. J. "Hydrolysis of the Oligogalacturonides and Pectic Acid by yeast Polygalacturonase." *J. Biol. Chem.* 210, 381 (1954).
- 21.- Dingle J., Reid W.W., Solomon G.L. "Enzymic degradation of pectin and other polysaccharides (II) Application of cup plate." *J. Food Agric.* 3, 149 (1953).
- 22.- Edstrom R. D., Phaff H. J. "Eliminative Cleavage of pectin and oligogalacturonide methyl esters by pectin trans-eliminase." *J. Biol. Chem.* 239, 2409-2415 (1964).
- 23.- Fogarty W. M., Ward O. P. "Pectinases and Pectic Polysaccharides." *Prog. Ind. Microbiol.* 13, 59-119 (1974).

- 24.- Fukushima D. "Koji as an important source of enzyme in the Orient and its unique composite systems of proteinases and peptidases." Use of Enzyme in Food Technology Proc. Symp. Int. M8 2 Versailles Dupuy P. Ed. Lavoisier Paris. (1982).
- 25.- García Garibay M., Gómez Ruiz L. del C. "Obtención de Biomasa Endo Poligalacturonasa de Kluyveromyces fragilis a partir de suero de queso". Tesis UNAM 116 pp. (1982).
- 26.- García Hernández F. "Aspectos sobre escalamiento de sistemas de recuperación de enzimas." Biotecnología de Enzimas, C. Huitrón, Ed. UNAM, (1982).
- 27.- Gutiérrez L. G., Gutiérrez L. E., Jiménez A. A. "I. Enzimas pécticas II. Influencia de la Polygalacturonasa en las propiedades reológicas de la pulpa de papaya." Technol. Aliment. (México) 18(1), 5-9 (1983).
- 28.- Ghildyal N. P., Ramakrishna S. V., Nirmala, Devi P., Lonsane B. K., Asthana H. N., "Large Scale Production of Pectinolytic Enzyme by Solid State." J. Food Science Technol. 18, 248-251 (1981).
- 29.- Hatanaka Ch., Ozawa J. "Pectolytic enzymes of Exo-Tipes 1.-Oligogalacturonide-Trans-eliminase of a Pseudomonas." Agr. Biol. Chem. 33 (10), 1617-1624, (1974).
- 30.- Hesseltine C. W. "Solid State Fermentations". Biotechnol. Bioeng. 14, 517-532, (1972).
- 31.- Hobson G. E. "Polygalacturonase in Normal and Abnormal Tomato Fruit." Biochem. j. 92, 324-332, (1964).
- 32.- Holden M. "Acid-producing mechanisms in minced leaves." Biochem. J. 39, 172 (1945).
- 33.- Jansen E. F., Mc Donnell L. R., "Influence of Methoxyl content at pectic substances on the action of polygalacturonase." Arch. Biochem. 8,97 (1945).
- 34.- Kertesz Z. I., "Pectic Enzymes" The enzymes: Ed. Sumner J. B. Myrbäck K, 11 (2) 745-768, (1951).

- 35.- Kertesz Z. I. "Pectic enzymes 1.- The determination of pectin methoxylase activity." *J. Biol. Chem.* 121, 589 (1937).
- 36.- Kertesz Z. I. "Preparation and Determination of Pectic Substances." In *methods in Enzymology*. Colowick S. P. and Kaplan N. O. Academic Press. New York 1, 27-30, (1955).
- 37.- Kertesz Z. I. "Pectic Enzymes " *Methods in Enzymology*. Colowick S. P. and Kaplan N. O. Academic Press. New York 1, 158-166 (1955).
- 38.- Kertesz, Z. I., Mc. Colloch R. S. "Enzymes Acting on Pectic Substances." *Adv. Carbohydr. Chem.* 5, 79 (1950).
- 39.- Kilara A. "Enzymes and their Uses in the Processed Apple Industry." A review. *Process Biochemistry* July/August 35-41, (1982).
- 40.- Kulp K. "Pectic Enzymes" *Enzymes in Processing* 2a. Ed. Reed G. Academic Press New York, 107-122 (1975).
- 41.- Knapp J. S., Howell J. A., "Solid substrate Fermentation." *Topics in Enzyme and Fermentations Technology*. Ed. Wisseman 4, 85-135, (1978).
- 42.- Krakowiak A., Malanowska S. "Role of hidrogen ion concentration in the biosintesis of pectolytic enzymes. *Pr. Inst. Lab. Badaw. Przem.* 25(2), 221-8 (1975).
- 43.- Lakshminarayana K., Chandhary, K., Ethraj, S., Tauro, P. "A solid State Fermentation Method for Citric Acid Production using sugar cane bagasse. *Biotechnol. Bioeng.* 17 (1), 291-293 (1975).
- 44.- Lambert P. W. "Industrial Enzyme production and recovery from filamentous fungi. *The Filamentous Fungi*. Smith J., Beni D. E. Eds. Vol. IV Chap. 9, 210-237. Edward Arnold Publishers, London. (1983).
- 45.- Laukevics J. J., Apsite A.F., Viesturs U. E., Tengerdy R. P. "Solid substrate fermentations of wheat straw to fungal protein." *Biotechnol. Bioeng.* 26, 1465-1474 (1984).
- 46.- Lineweaver H., Ballou G. A. "Effects of cations on activity of alfalfa Pectinesterase." *Arch. Biochem.* 6, 389 (1947).

- 47.- Lineweaver H., Jang, R., Jansen, E. F. "Specificity and purification of polygalacturonase." Arch. Biochem. 20, 137 (1949).
- 48.- Lonsane B.K., Ghildyal N. P., Budiartman S., Ramakrishna S. V., "Engineering aspects of solid-state fermentation." Enzyme Microb. Technol. 7, 258-265 (1985).
- 49.- Luhs B. S. Leonard S. J., Phaff H. J. "Hydrolysis of pectin materials and oligouronides by tomato polygalacturonase." Food Res. 21, 448 (1956).
- 50.- Mc. Donnell L. R., Jansen E. F., Lineweaver H. "Properties of orange pectinesterase". Arch. Biochem. 6, 386 (1945).
- 51.- Mc. Donnell L. R., Jang R., Jansen E. F., Lineweaver H. "The especificity of pectinesterase from several sources with same notes on purification of orange pectinesterase." Arch. Biochem. 28, 260-273, (1950).
- 52.- Mc. Colloch R. J., Kertesz Z. I. "Pectin Enzymes (VIII) Comparison of fungal Pectin-methyl-esterase with that of higher plants." Arch. Biochem 13, 217 (1947).
- 53.- Mc. Cready R.M., Seegmiller C. G. "Action of pectic enzymes on oligogalacturonic acids and some of their derivatives." Arch. Biochem. Biophys. 50, 440-451 (1954).
- 54.- Mc Cready R. M., Mc Comb E. A., Jansen E. F. Food Res. 20, 186 (1955).
- 55.- Mehlitz A. Maass H. "Enzimic Clarification of fruit juices and sweet musts (LLL) Spontaneous clarification and clarification with enzymes (IV). Influence of tannin on the pectolase actividad of filtración enzymes." Untersuch Lebems. 70, 180 (1933).
- 56.- Milner Y., Avigad G. "Cu reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses." Carbohydrate Res. 4, 359-361 (1967).
- 57.- Mill P. J. "The pectic enzymes of Aspergillus niger. A. Mercury-Activated Exo-Polygalacturonase." Biochem. J. 99, 562-565 (1966).
- 58.- Mill P. J., "The pectic enzymes of Aspergillus niger. A. Second Exo-Polygalacturonase." Biochem. j. 99, 562-565 (1966).

- 59.- Mill P. J., Tuttobello R. "The pectic enzymes of Aspergillus niger. 2. Endo-Polygalacturonase." Biochem. J. 79, 57-64 (1961).
- 60.- Millar R. L., "Role of pectolytic and cellulolytic enzymes in Botrytis leaf blight of onion". Phytopathol. 55,130 (1965).
- 61.- Miller G. L. "Utilitation the Acid 3, 5 DNS reagent for determination of reducing sugar." Analytical Chem. 31, 426-428 (1959).
- 62.- Mitsue T., Saha C. B., Ueda S. "Glucoamylase of Aspergillus oryzae, cultured on steamed rice." J. Applied Biochem. 1, 410-422 (1979).
- 63.- Moldabaeva R. K., "Effect of nitrogen and phosphorus sources on biosynthesis of Pectolytic enzymes by Aspergillus niger." Microbiologiya 37(5) 808-813, (1968). Citado en Chemical Abstracts No. 45063 j (1969).
- 64.- Montañés S. J. L., Jiménez A. A. "Cinética de las enzimas pécticas. 1. Comparación entre una enzima poligalacturónica de origen fúngal y una de origen vegetal." Rev. Technol. Aliment. (México), 17 (6), 10-18 (1982).
- 65.- Moo-Young, M.; Moreira A. R., Tengerdy R. P. "Principles of solid substrate fermentation". The filamentous fungi, fungal technology. Smith D.E. Ed. 4, 119-128. (1983). Edward Arnold Publishers; London.
- 66.- Morán F., Nasuno S., Starr M. P. "Extracellular and intracellular polygalacturonic Acid Trans-Eliminases of Erwinia Carotovora." Arch. Biochem. Biophysics. 123, 298-306 (1968).
- 67.- Mount M. S., Bateman D. F., Bas ham H. "Induction of electrolyte loss, Tissue maceration and cellular death of Potato tissue by Endo-Polygalacturonate Trans-eliminase." Phytopathol 60, 924 (1970).
- 68.- Mukherjee S. K. "Effects of minerals on the production of pectinases by Aspergillus niger." Zentralbl. Bakteriell. Parasitenkd., Infektionsks. Hyg. Abt. 2 (1974), 129 (5), 410-414. Citado Chemical Abstracts. No. 82699q (1975).
- 69.- Mukherjee, S. K., Majumdar, S. K. "Fermentative production of Pectinases by fungi screening of organisms and production of the enzymes by Aspergillus niger. Hakkō Kogaku Zasshi 49(9), 759-770, (1971). Citado Chemical Abstracts No. 150299s (1972).

- 70.- Nagel C. W., Hasegawa S. "Kinetics and site of attack of oligogalacturonic acids by an Endo-Pectic Acid Trans-eliminase." Arch. Biochem. Biophys. 118, 590-595 (1967).
- 71.- Nagel C. W., Vaughn R. H. "Comparison of growth and pectolytic enzyme production by *Bacillus polymyxa*." J. Bact. 83, 1 (1962).
- 72.- Narahara H., Koyama Y., Yoshida T., Stmalee P., Ueda R., Taguchi H. "Growth and enzyme production in a solid-state culture the Aspergillus oryzae." J. Ferment. Technol. 62(5), 453-459 (1984).
- 73.- Narahara H., Koyama Y., Yoshida T., Atthasampunna P., Taguchi H. "Control of water content in a solid-state culture of Aspergillus oryzae." J. Ferment. Technol. 62(5) 453-459 (1984).
- 74.- Nishio N., Tai K., Nagai S. "Hydrolase production by Aspergillus niger in solid-state cultivation." European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8, 263-270 (1979).
- 75.- Ogur M., Rosen G. "Nucleic acids of plant tissues (I) extraction of desoxy-pentose nucleic acid and pentose nucleic acid". Arch. Biochem. 25, 262-276 (1950).
- 76.- Oriol E. "Introducción de partículas inertes en la fermentación sólida de la yuca." en revisión. (Comunicación personal).
- 77.- Otto R., Winkler G., German Patent F 29, 667 (1942).
- 78.- Papavizas G. C. Ayers, W. A., Diem, A. P. "Polygalacturonate transeliminase and Polygalacturonase production of *Rhizoctonia Solani* Phytopathol. 56, 1269 (1966).
- 79.- Patel D. S., Phaff H. J. "Studies on the purification on Tomato Polygalacturonase." J. Food Res. 25, 35-57 (1960).
- 80.- Peñaloza W., Molina M. R., Brenes G. R., Bressani R. "Solid-state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp." Applied and Environment Microbiology Feb. 49(2), 388-393 (1985).

- 81.- Pilnik W., Rombouts F. M. "Pectic enzymes." Polysaccharides in Food Blanghard J. M. V., Fift M. A., Mitchell J. R., Aifst., Chap. 7, 109-126 Butterworth London. (1979).
- 82.- Pilnik W., Rombouts F. M. "Pectic enzymes." Enzymes and Food Processing Ed. Biuch G. G., Blake-Brough N., Parker K. J. Applied Science Published L + A London chap. 6, 105-128 (1980).
- 83.- Pilnik W. Rombouts F. M., Voragen A. G. L. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensmittel. 2, 122-128. (1973).
- 84.- Raimbault M., Alazard D. "Culture method to study fungal in solid." European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9, 199-209 (1980).
- 85.- Raimbault M., Revah S., Piña F., Villalobos P. "Protein enrichment of cassava by solid substrate fermentation using molds isolated from traditional Foods." J. Ferment. Technol. 63(4), 395-399 (1985).
- 86.- Ramos-Valdivia A., de la Torre M., Casas Campillo C. "Solid-state Fermentation of cassava with Rhizopus oligosporus NRRL 2710." Cost. Workshop 83/84 Production and Feeds of S.C.P. April 13, 15 Zurich Switzerland. (1983).
- 87.- Rao M. N. A., Mithal B. M., Thakkur R. N., Sastry K. S. M. "Solid state fermentation for cellulase production by Pestalotiopsis versicolor." Biotechnol. Bioeng. 25, 869-872 (1983).
- 88.- Rexová-Benková L. "Characterization of extracellular Polygalacturonases." Collection Czechoslov. Chem. Commun. 32, 4504-4509. (1967).
- 89.- Rexová-Beenková L., Slezárik A. "Isolation of extracellular pectolytic enzymes produced by Aspergillus niger." Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 31, 122-129 (1966).
- 90.- Rodríguez J. A., Echevarría J., Rodríguez F. J., Sierra N., Daniel A., Martínez O. "Solid state fermentation of dried citrus peel by Aspergillus niger." Biotechnol. Letters 7(8), 577-580 (1985).
- 91.- Rombouts F. M., Pilnik W. (in press); "Economic Microbiology". Vol.5 Ed.

- A. H. Rose. Academic Press, London. *Economics Microbiol* 5, 227-282. (1980).
- 92.- Roussos S. "Croissance de Trichoderma Harzianum par Fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases." *Thèse*, Université de Provence, France, 1985. 162 págs.
- 93.- Sánchez-Vázquez J. E., Guiraud, J. P., Gelzy P. "Selección de levaduras utilizables en fermentación de cacao vía trifásica. XVII, Congreso Nacional de Microb. Puebla, Pue., 156, pág. 26 (1986). Asociación Mexicana de Microb.
- 94.- Sato K., Nagatani M., Sato S. A method of supplying moisture to the medium in a solid state culture with forced aeration." *J. Ferment. Technol.* 60(6), 607-610 (1982).
- 95.- Saval S., Solorzano R., Alpizar I., Cea A., Huitrón C. "Producción de pectinasas microbianas a partir de pulpa de henequén." *Biología de Enzimas*, C. Huitrón UNAM, 204-215.
- 96.- Schmitter S. "Enzyme action and plant food texture." *Source Book of Food Enzymology* 511-531, AVI Publishing Company, Inc. (1981).
- 97.- Schmitter S. "Roles of enzyme action in wine and fruit and vegetable juice manufacture and appearance." *Source Book of Food Enzymology*, 535-551, AVI Publishing Company, Inc. (1981).
- 98.- Smyte C. V., Drake B. B., Miller J. A. US. Patent. 2, 599-531 (1952).
- 99.- Spiro R. G. *Methods Enzymology*. Vol. 8, 3-26 (1966).
- 100.- Szanger J. "Analysis of sugars found in glycoproteins". *Acta Microbiol. Polon.* 5(1), 51-56 (1976).
- 101.- Sukumar Medda, Badal, Chandra Saha, Seinosuke Ueda. "Raw starch adsorption and elution behavior of Glucoamilase I_a of Black Aspergillus niger. *J. Ferment. Technol.* 60(3), 261-264 (1982).
- 102.- Takahashi, H., Yoshida, F. "Oxygen Transference in a bubble column for fermentation with Aspergillus niger." *J. Ferment. Technol.* 57(4), 349-356 (1979).

- 103.- Takamine. "In the Manufacture of Malt Substitute products". IND. Eng. Chem. 6 824-828 (1914).
- 104.- Toyama N. "Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride viride* cellulase." Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 6 207-219 (1976).
- 105.- Tuttobello R., Mill P. J. "The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. 1. The production of active mixtures of pectic enzymes." Biochem. j. 79, 51-57 (1961).
- 106.- Ueda S. "Fungal glucoamilases on raw starch digestion." Trends Biochemical Sciences., March. 89-90 (1981).
- 107.- Vasu S. "Pectolytic enzymes from *Aspergillus niger* I. Production Polygalacturonasas in synthetics culture media." Studie Cercetari Biochem. 6, 71-86 (1963).
- 108.- Voragen A.G.J., Rombouts F. M., Pilnik W., Hoogdonk M. J. "Comparison of end-group methods for the measurement of pectin degradation." Lebensm Wiss. Technologie. 4, 126-128 (1971).
- 109.- Wang M. C., Keen N. T. "Purification and Characterization of Endo-Polygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. Arch. Biochem. Biophysics. 141.
- 110.- Wladyslaw P., Wieslaw R., Zdzislaw P., "Production of a pectinolytic enzyme preparation from the mold *Aspergillus niger*. Pr. Inst. Lab. Badaw. Przem. Spozyw. 17 (3), 103-16 (1967). Citado en Chemicals Abstracts No. 1133447 r (1968).
- 111.- Whitaker, J.R. "Pectic substances, Pectic enzymes and haze formation in fruit juices." Enzyme Microb. Technol. 6 (August), 341-349 (1984).
- 112.- Willstätter, R., Schudel G. Akad. Wiss Münchem. Ber. 51, 78-1 (1918).
- 113.- Wood P. J., Siddiqui I. R. "Gas-liquid chromat chromatography of butane borates of carbohydrates and their thrimethylsilyl ethers." 39, 418 (1971).
- 114.- Yamasaki M., Kato A., Shang-Young Ch. Arima K. "I. Pectic in the clarification." Agr. Biol. Chem. 31 (5), 552-560 (1967).

- 115.- Zdzislaw I. "Effects of medium pH and sodium and potassium salts on the synthesis of pectinases by the mutants of Aspergillus niger." Acta microbiol. Pol., Ser. B. 6 (3), 109-118 (1974). Citado Chemical Abstracts No. 13582 j (1975).
- 116.- Zdzislaw I. Acta Microbiol. Pol. Ser. B 5(2), 95-101 (1973).
- 117.- Zetelaki-Horváth K., Vas K. "Effect of NaN_3 and combined NaN_3 + U. V. Treatment on the pectolytic enzymes formation of Aspergillus niger."
- 118.- Zetelaki-Horváth K., Vas K. "Effect of oxigen transfer rate on the composition of the pectolytic enzyme complex of Aspergillus niger." Bio technol. Bioeng. 13, 2231-2241 (1981).