

300627

3



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

INCORPORADA A LA U. N. A. M.

2EJ

**ESTUDIO Y REVISION DE LA NATURALEZA,
APLICACION Y FABRICACION DE LAS
ENZIMAS PECTINICAS**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
MARIA CARINA ARANDA AZAR**

DIRECTOR: Q. F. B. MARIANO LLERA FANJUL

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Dios, gracias a la libertad que nos diste al crearnos, cada persona posee habilidad para lograr algunas cosas, mientras que otras se le dificultan.

Tú sabes que lograr esto para mí fue difícil, y no me refiero al contenido de este estudio, sino al trabajo que se requiere para empezar, continuar y terminar con este.

Gracias por darme la fuerza para completar esta etapa tan importante en mi vida.

Gracias Papas por haberme dado una vida llena de amor, de educación y de alegría.

Los recuerdos de mi niñez son tan bonitos que nunca puedo evitar sonreír al pensar en ellos.

Siempre con paciencia me hicieron notar mis errores y con amor sobrellevaron mis faltas.

Ahora los admiro por lo que son , por lo que han logrado, por lo que me han dado.

Gracias

**Julián, gracias por ser mi amigo, mi amor, mi todo.
Tu alegría y tu confianza son mi mejor ejemplo.
Tu amor y tu comprensión son mi mejor apoyo**

Mary Jose, Ricardo y Andrés, ustedes son un incentivo muy importante para ser cada día mejor persona.

Gracias

Gracias Hermanos por la ayuda, la compañía, la alegría y por todas las experiencias que hemos tenido juntos. He tenido mucha suerte en contar con esta familia.

Gracias Julián y Ma. Luisa por haberme brindado siempre su ayuda y su apoyo incondicional.

CAPITULACION

Antecedentes

I.	Introducción.....	Pag. 1
1.1.	Breve historia de la utilización de las enzimas.....	Pag. 1
1.2.	Fuentes enzimáticas.....	Pág. 3
1.3.	Influencia de las condiciones del cultivo.....	Pág. 5
II.	Generalidades.....	Pág. 7
2.1.	Características generales de las sustancias pectínicas.....	Pág. 7
2.2.	Clasificación de las enzimas pectínicas.....	Pág. 15
2.3.	Características del microorganismo.....	Pág. 30
2.4.	Disponibilidad de la pectinasa en el mercado nacional.....	Pág. 31
III.	Proceso de fabricación de pectinasas.....	Pág. 33
3.1.	Regulación de la producción enzimática y su metodología de la fermentación.....	Pág. 33
1.	Inducción enzimática.....	Pág. 35
2.	Represión de alimentación.....	Pag.36
3.	Represión catabólica.....	Pág. 36
4.	Composición del medio.....	Pág. 37
5.	Esterilización del medio.....	Pág. 38
6.	Aereación y agitación.....	Pág. 39
3.2.	Fabricación de Pectinasas.....	Pág. 40
1.	Selección de la especie.....	Pág. 40
2.	Composición del medio de cultivo.....	Pág. 41
3.	Esterilización del medio.....	Pág. 42
4.	Fermentación.....	Pág. 42

3.3.	Aislamiento, purificación y presentación.....	Pág. 54
3.4.	Control de calidad.....	Pág. 58
IV.	Aplicaciones de las enzimas pécticas.....	Pág. 60
4.1.	Parámetros de Aplicación.....	Pág. 60
4.2.	Mecanismo de clarificación.....	Pág. 66
4.3.	Aplicación de enzimas pécticas en los procesos de.....	Pág. 67
a)	Industria de jugos.....	Pág. 67
b)	Industria cítrica.....	Pág. 75
c)	Preparación de formadores de nubes naturales.....	Pág. 76
d)	Industria vitivinícola.....	Pág. 77
e)	Maceración de frutas y vegetales.....	Pág. 86
f)	Otras aplicaciones.....	Pág. 87
4.4.	Inmovilización de las enzimas pécticas.....	Pág. 90
V.	Conclusiones.....	Pág. 92
	Bibliografía.....	Pág. 94

INDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1 Cronología de la introducción de algunas enzimas.....	Pág. 2
Cuadro No. 2 Tejidos vegetales.....	Pág. 3
Cuadro No. 3 Tejidos Animales.....	Pág. 4
Cuadro No. 4 Fuentes microbianas.....	Pág. 5
Cuadro No. 5 Contenido de pectina en algunos alimentos.....	Pág. 7
Cuadro No. 6 Distribución de enzimas pécticas en microorganismos.....	Pág. 16
Cuadro No. 7 Propiedades de la pectinesterasa.....	Pág. 17
Cuadro No. 8 Propiedades de las endopoligalacturonasas.....	Pág. 23
Cuadro No. 9 Importaciones de las pectinasas en los últimos años (Kg.).....	Pág. 32
Cuadro No. 10 Condiciones de ensayo para evaluar la calidad de las pectinasas.....	Pág. 59
Cuadro No. 11 Tiempos de actividad de las pectinasas a diferentes temperaturas.....	Pág. 61

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema No: 1	
Fragmento de una molécula de pectina.....	Pág. 9
Esquema No. 2	
Porcentaje de metoxilo.....	Pág. 13
Esquema No. 3	
Relación entre las sustancias pécticas.....	Pág. 14
Esquema No. 4	
Acción de la pectinesterasa sobre la pectina.....	Pág. 20
Esquema No. 5	
Acción de la poligalacturonasa sobre el ácido péctico.....	Pág. 22
Esquema No. 6	
Acción de las enzimas pectínicas.....	Pág. 29
Esquema No. 7	
Sistema batch de la fermentación para obtener pectinasas.....	Pág. 49
Esquema No. 8	
Diagrama de flujo de una línea de procesamiento de jugos.....	Pág. 73

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica No. 1.....	Pág. 46
Gráfica No. 2.....	Pág. 52
Gráfica No. 3.....	Pág. 53
Gráfica No. 4.....	Pág. 62
Gráfica No. 5.....	Pág. 62
Gráfica No. 6.....	Pág. 63
Gráfica No. 7.....	Pág. 63
Gráfica No.8.....	Pág.65
Gráfica No.9.....	Pág.65
Gráfica No.10.....	Pág.84

ANTECEDENTES

Las enzimas son el punto principal de todos los procesos biológicos, sin ellas la biotecnología como materia no existiría (52). Además las enzimas son agentes de vida, ya que son catalizadores de todos los procesos biológicos (50).

La utilización de las enzimas por el hombre comienza desde el uso del estómago del becerro, el cual debido a su contenido de renina producía queso a partir de la leche (69). Hoy en día se desarrollan técnicas complejas de ingeniería genética enzimática (52).

En la actualidad, el uso de las enzimas se ha extendido en gran medida dentro de la Industria Alimentaria debido a las ventajas que ofrecen sobre las prácticas tradicionales. Estas ventajas son: mejoras en sus productos terminados, estabilización de sus productos, disminución del costo de producción, desarrollo de nuevos productos, estandarización de sus factores de calidad, utilización de subproductos, etc..

Por estas razones, la fabricación y comercialización de las enzimas se ha desarrollado en gran medida.

En el presente trabajo se expondrá el estudio de un grupo de enzimas muy importantes, las pectinasas. Se estudiará su naturaleza química y su origen, también se explicará su proceso de fabricación, así como sus aplicaciones más importantes y su mercado.

Se presenta un estudio completo de las pectinasas de manera que éste sirva al interesado en la materia.

Las pectinasas son un grupo de enzimas muy importante ya que éstas son indispensables en la industria de jugos y vinos entre otras, utilizándose en las operaciones de extracción del jugo y de clarificación del mismo.

En México existe muy poca información con respecto a la fabricación y utilización de las pectinasas. Con esta tesis pretendo hacer una recopilación y un resumen completo de la información de las pectinasas que se tiene hasta el momento para que los interesados en la materia tengan una fuente de información actualizada y de fácil acceso.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. BREVE HISTORIA DE LA UTILIZACION DE LAS ENZIMAS.

La enzimología es una ciencia cuyo desarrollo es reciente. Los primeros descubrimientos a este respecto se efectuaron en el siglo XIX pero el desarrollo más firme y rápido lo ha tenido en los últimos 40 años (64).

A pesar de que los fenómenos de fermentación y digestión eran conocidos desde la antigüedad, el primer conocimiento objetivo de una enzima, fue realizado por Anselme Payen y Persoz en 1833, cuando encontraron un precipitado en el extracto alcohólico de la malta, el cual era estable al calor, y lo más importante, convertía el almidón en azúcar. A esta sustancia se le denominó diastasa, ahora se le conoce como amilasa. Pero no fue hasta 1894 que esta enzima fue producida industrialmente en Japón por Takamine a partir del Koji y fue utilizado como un aditivo digestivo (52). La fabricación de éste producto, la takadiastasa, fue realizada después con mayor perfección en Estados Unidos de América (E.U.A.).

A principios del siglo XIX en Alemania, Otto Rohm descubrió que el efecto de ablandamiento del excremento del perro y de la paloma, utilizado en el procesamiento del cuero, era debido a su contenido de enzimas además de que empezó su fabricación por fermentación por hongos.

En el año de 1945, la gama de enzimas fabricadas por fermentación y las aplicaciones industriales de éstas se fueron extendiendo muy lentamente. Esto se debía a que la fabricación se llevaba a cabo generalmente por variantes del

proceso de sustrato sólido y como este proceso sólo se puede utilizar para hongos filamentosos, la producción industrial de enzimas era limitada.

En los últimos años de los 40's, se desarrolló la técnica de fermentación sumergida en tanques con agitación y aereación para la fabricación de antibióticos, y éste resultó ser un excelente método para el cultivo de muchos tipos de microorganismos. Por esta razón, este método se utilizó para la fabricación de enzimas utilizando bacterias.

La fabricación de enzimas por medio de la fermentación sumergida se ha extendido en gran medida en las décadas siguientes y las ventajas comerciales en nuestros días ascienden de 1000 a 2000 toneladas de enzimas por año.(52)

CUADRO No. 1 Cronología de la Introducción de algunas enzimas.

FECHA	ENZIMA	FERMENTACION	FUENTE
antes de 1920	amilasa	sustrato sólido	A.oryzae
1920 a 1930	pectinasa	sustrato sólido	A.niger
1930 a 1940	proteínasa	sustrato sólido	A.niger
1940 a 1950	amiloglucosidasa	sustrato sólido	A.niger
1950 a 1960	amilasa	sumergido	B.subtilis
	glucosa oxidasa	sumergido	A.niger
	amiloglucosidasa	sumergido	A.niger
1960 a1970	proteínasa	sumergido	Mucor spp
	galactosidasa	sumergido	Kluyveromyces
	galactosidasa	sustrato sólido	A.spp
1970.....	glucosa isomerasa	sumergido	muchas fuentes

1.2 FUENTES ENZIMATICAS

Las enzimas utilizadas en la industria alimentaria son aisladas de tejidos animales, vegetales o de microorganismos. Una de estas fuentes debe ser favorecida por cada enzima.

El número de enzimas encontradas y aisladas en el laboratorio de cada una de estas fuentes es muy grande por lo que mencionaremos únicamente las enzimas que se fabrican industrialmente y que se utilizan comúnmente en la industria alimentaria (52).(Cuadro No. 2 y Cuadro No. 3)

CUADRO No.2 Tejidos Vegetales

ENZIMAS	FUENTE VEGETAL
Aamilasa	Cebada germinada (malta)
Aamilasa	Cebada, trigo, papa, soya y centeno
Endo-gluconasa	Cebada germ inada (malta)
Papaina	Latex de carica papaya
Bromelina	Tallos de plantas de piña
Ficina	Latex de ficus caricas
Lipoxigenasa	Frijol, papa
Ureasa	Frijol
Lipasa	Semillas de ricino
Peroxidas	Raíces de rábano
Tirosinasa y Ac. ascórbico oxidasa	Papa y calabasa
Pectinesterasa	Tomates y frutas cítricas

CUADRO No. 3 Tejidos Animales

ENZIMAS	FUENTE ANIMAL
Amilasa Esterasa Tripsina Lipasa Quimiotripsina	Glándula pancreática del bovino y del porcino
Renina Glucosa oxidasa Catalasa	Estómago del porcino cuarto estómago del becerro Hígado

(52)

ENZIMAS MICROBIANAS. Los microorganismos han llegado a ser sumamente importantes como productores de enzimas de uso industrial y, de hecho, la mayoría de las enzimas utilizadas en la industria son de origen microbiana. Actualmente existen desarrollos experimentales para reemplazar las enzimas que normalmente se han extraído de tejidos animales y vegetales para hacerlo ahora a partir de microorganismos (50).

Una explicación de este cambio es el hecho de que la producción de enzimas a partir de glándulas pancreáticas, por ejemplo, es altamente dependiente de la producción y de la demanda de carne de res. Por lo tanto, este tipo de fuentes para la producción enzimática es muy limitado. En contraste, los microorganismos son muy atractivos como fuentes enzimáticas debido a su diversidad bioquímica y por la facilidad de incrementar el rendimiento de concentración enzimática por medio de manipulaciones del ambiente y a nivel genético.

Las ventajas que ofrece la producción de enzimas por medio de microorganismos son tiempos de fermentación cortos, medios de crecimiento poco costosos, facilidad para el desarrollo de procedimientos simples de selección y la existencia de distintas proteínas originadas de diferentes especies,

las cuales catalizan la misma reacción. El último punto permite tener flexibilidad en las condiciones de fermentación, ya que éstas enzimas diferentes tendrán diferentes estabildades así como pH y temperatura óptima.

Además, los microorganismos pueden ser manejados por medio de ingeniería genética. Las especies creadas de esta manera son capaces de producir cantidades anormales de enzimas.

Los tres grupos de microorganismos capaces de producir enzimas a escala industrial son: levaduras, bacterias y hongos.

La lista de enzimas producidas por los microorganismos es muy larga por lo que sólo mencionaremos algunos (Cuadro No. 4). Los hongos *A. niger*, *A. oryzae* y la bacteria *B. subtilis* son los microorganismos más útiles ya que producen un número importante de enzimas en donde la mayoría son extracelulares, además estas fuentes están aceptadas por la Food and Drug Administration (FDA) (2).

CUADRO No. 4 Fuentes Microbianas

Enzima	Fuente Microbiana
<i>a</i> -Amilasa	<i>Aspergillus oryzae</i>
Pectinasa	<i>Aspergillus niger</i>
<i>a</i> -Amilasa	<i>Bacillus subtilis</i>
Proteinasa	<i>Aspergillus niger</i>
Amiloglucosidasa	<i>Aspergillus niger</i>
<i>a</i> -Amilasa	<i>Bacillus subtilis</i>
Glucosa oxidasa/catalasa	<i>Aspergillus niger</i>
Amyloglucosidasa	<i>Aspergillus niger</i>
Proteinasa	<i>Mucor</i> spp.
Proteinasa	<i>Bacillus</i> spp.
<i>B</i> -Galactosidasa (lactasa)	<i>Kluyveromyces</i> spp.
<i>B</i> -Galactosidasa (lactasa)	<i>Aspergillus</i> spp.
<i>a</i> -amilasa	<i>Bacillus licheniformis</i>
Glucosa isomerasa	Diversas fuentes
Pullulanasa	<i>Klebsiella aerogenes</i>

(52)

1.3. LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DEL CULTIVO.

Sin importar el modo de operación, batch o continuo, los principales factores que pueden influir en el curso de la fermentación de una enzima son:

TEMPERATURA. Los microorganismos pueden ser clasificados en tres grandes grupos: psicófilos, cuya temperatura óptima es debajo de los 20°C, los mesófilos cuya temperatura óptima es en la región de los 35°C y los termófilos, los cuales tienen una temperatura óptima por arriba de los 50°C.

pH. Como las enzimas son proteínas, contienen grupos de ionización y por lo tanto el pH del medio afecta su estructura y sus funciones. El crecimiento de las células microbianas también son influenciadas por el pH, y en muchas ocasiones, el pH óptimo para el crecimiento de las células microbianas difiere del pH óptimo para la estabilidad de las enzimas extracelulares.

TENSION DE OXIGENO. El proveer adecuadamente de oxígeno a un cultivo en crecimiento aeróbico es un requerimiento esencial para obtener un buen rendimiento y la productividad de una fermentación enzimática depende de prevenir con éxito la limitación de oxígeno (70).

CAPITULO II GENERALIDADES

2.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS SUSTANCIAS PECTINICAS.

El término pectina fue empleado para denominar a estas sustancias por Braconnot en 1825 por su capacidad de formar geles. En realidad no se trata de un nombre genérico, sino de un término que engloba a un grupo de sustancias estrechamente relacionadas llamadas sustancias pécticas (89).

Estas sustancias son derivados de carbohidratos, con pesos moleculares muy altos y composiciones complejas. Las sustancias pécticas se encuentran en vegetales y frutas cítricas como lo son las limas, limones, toronjas, naranjas, etc. (76).

Las sustancias pécticas llenan los espacios intercelulares, o lamelas centrales en los tejidos vegetales. En los tejidos jóvenes, especialmente en los frutos. Las pectinas se encuentran presentes en cantidades tan abundantes, que a menudo forman canales anchos, apartando entre sí a las células (89).

CUADRO No. 5 Contenido de Pectina en algunos Alimentos

FUENTE	% PÉCTINA
Uvas	0.2 - 1.0
Manzanas	0.5 - 1.6
Toronja	1.6 - 4.5
Limonos	3.0 - 4.0
Semillas de limón	6.0
Cáscara de limón	32.0
Pulpa de limón	25.0
Nabo	10.0
Pulpa de azúcar de remolacha	30.0
Cáscara de piña	20
Jugo de piña	16.0

Al formar canales anchos, la pectina tiene la capacidad de absorber grandes cantidades de agua. Las sustancias pécticas aparentemente juegan un papel muy importante en las primeras etapas del desarrollo de los tejidos vegetales, cuando las células se encuentran aún separadas, y a una distancia relativamente grande de los vasos conductores de agua. Absorben agua y rápidamente la transfieren a las células con mayor facilidad que la que podría lograrse por ósmosis en ellas mismas (88). Las sustancias pécticas forman solo el 1% en peso del tejido vegetal de las plantas maduras, sin embargo son responsables en buena medida de la integridad y la coherencia de los tejidos vegetales (7). Además favorecen el ablandamiento del tejido del fruto durante la maduración y la ruptura de la estabilidad coloidal en jugos de fruta, (5). En la pared celular primaria, se encuentra una red rígida de celulosa y pectina (67).

ESTRUCTURA Y COMPOSICION. Son heteropolisacáridos cuyo peso molecular varía entre 20,000 y más de 400,000 (23).

La división de Química de Alimentos y Agricultura de la Asociación Química Americana, definió en 1944 a las pectinasas de la siguiente manera:

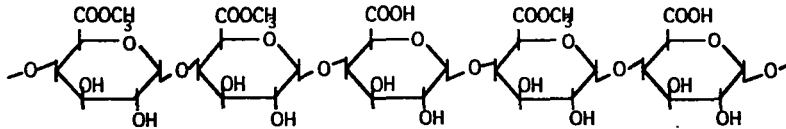
"Las sustancias pécticas son un grupo de carbohidratos complejos, que se encuentran o son sintetizados por plantas y contienen una gran cantidad de unidades de ácido anhidrogálgacturónico, las cuales forman una cadena larga no ramificada" (76).

También se sabe que los grupos carboxilo se pueden encontrar parcialmente esterificados con grupos metilo y parcialmente neutralizados por una o más bases (76). (Esquema No. 1)

Las uniones entre ácido galacturónico son 1 - 4, aunque se sabe que la estructura básica de las sustancias pécticas es un ácido

ESQUEMA # 1

Fragmento de una molécula de pectina



(23)

anhidrogalaacturónico, algunos autores mantienen que otros carbohidratos, como por ejemplo la arabinosa, galactosa, sorbosa o ramnosa, pueden estar unidos a la cadena. Además, existen evidencias de que grupos acetilo, se encuentran unidos a algunas sustancias pécticas (69).

La nomenclatura de las sustancias pécticas está gobernada por el grado de esterificación y se han clasificado en los siguientes grupos:

PROTOPECTINA. Este término, se aplica a las sustancias pécticas insolubles en el agua, las cuales se encuentran en plantas. Estas por hidrólisis se convierten en ácidos pectínicos (76). Esta sustancia es insoluble en agua, y según Brancoft, puede observarse microscópicamente en el tejido vegetal mediante el empleo de rojo de rutenio como colorante. No se conoce bien la naturaleza exacta de la asociación entre la protopectina y otros constituyentes de la pared celular. Joslyn, menciona varias posibilidades, que van desde la cohesión molecular, a la unión covalente. Henglein, postuló la asociación entre grupos carboxílicos.

Cuando se callentan vegetales ricos en pectinas en agua acidulada, tales como el bagazo de manzana o la cáscara de frutas cítricas, se libera la protopectina, probablemente adherida hasta entonces a la celulosa, transformándose en pectina hidrosoluble. Se produce la misma transformación en los tejidos vegetales durante la maduración. Aparentemente la ayuda de una enzima desconocida, a la que se ha denominado protopectinasa. Muchos químicos especializados en pectinas, cuestionan la existencia de tal enzima. La liberación de pectina y el ablandamiento de los tejidos puede deberse bien a la degradación enzimática de la celulosa y hemicelulosa, en vez de la depolimerización de la protopectina. Hasta que se alcance algún consenso

sobre este tema en base a evidencias concluyentes, puede resultar aconsejable la adopción del nombre específico de macerasa o enzima macerante en vez de protopectinasa (89).

ACIDOS PECTINICOS. Este término es utilizado para ácido poligalacturónicos coloidales, los cuales contienen más de una proporción negligible de grupos metil ester.

Los ácidos pectínicos bajo condiciones favorables son capaces de formar geles con azúcar y con ácido. Si el contenido de metoxilo es bajo, forman geles con algunos iones metálicos (76).

El término de ácidos pectínicos no aparece en la nomenclatura de 1926. Su creación fue necesaria por la definición de pectina, la cual también es capaz de formar geles con azúcar y ácido. Esto dejó sin definición a los compuestos que están formados en su mayoría por ácido poligalacturónico pero que su contenido de grupos metoxilo es alto y que no necesariamente son capaces de formar el típico gel pectina-azúcar-ácido. Fue entonces necesario introducir el término de ácidos pectínicos. El uso de este término, junto con su definición han facilitado la descripción exacta de las características químicas de varias sales y derivados y muestra la importancia del carácter ácido. Todas las preparaciones comerciales de pectina insoluble son en realidad ácidos pectínicos (58).

PECTINA. El término general pectina o pectinas designa a los ácidos pectínicos, soluble en agua, con un contenido de grupos metil ester variable y un grado de neutralización con el cual son capaces de formar geles con azúcar y ácido bajo condiciones favorables (23).

Existen dos tipos de pectinas, las de bajo y las de alto contenido en metoxilo. La línea de división entre estas dos sustancias pécticas no está bien definida. Se conoce que las de alto grado de metoxilo no forman geles con el

grado de acidez usual cuando hay presencia de iones calcio, si no tienen un contenido de por lo menos 50% de azúcar. En cambio las de bajo metoxilo, forman geles en la presencia de iones calcio con concentraciones de azúcar bajas (58).

Si el contenido de metoxilo es mayor al 7%, la pectina es de alto metoxilo, y si se encuentra entre el 3 y el 7% es de bajo metoxilo, esto se representa en el esquema No. 2.

ACIDO PECTICO. Este término se aplica a las sustancias pécticas, compuestas en su mayoría por el ácido poligalacturónico y esencialmente libres de grupos metil ester (23).

La compleja relación entre las sustancias pécticas se muestra en el siguiente Esquema No. 3.

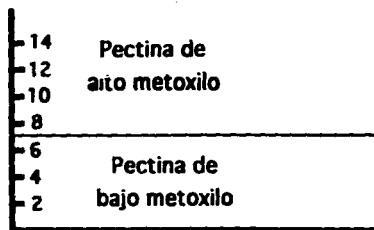
Las pectinas comerciales se extraen en general del limón, especialmente de su cáscara, la cual contiene un 32% de pectina. Para extraer la pectina se acidifica la cáscara pura con ácido sulfúrico a un pH de 2.15 y se efectúa la separación. Por último, la pectina se filtra, se precipita y se seca (32).

Las pectinas comerciales se utilizan como espesantes en los alimentos así como para formar geles, emulsificantes, etc.. Es muy importante su uso para suspender sólidos (1). La pectina es el único agente emulsificante que tiene uso permitido en los Estados Unidos.

ESQUEMA #2

Porcentaje de metoxilo
(material insaturado en base seca)

Acido pectínico

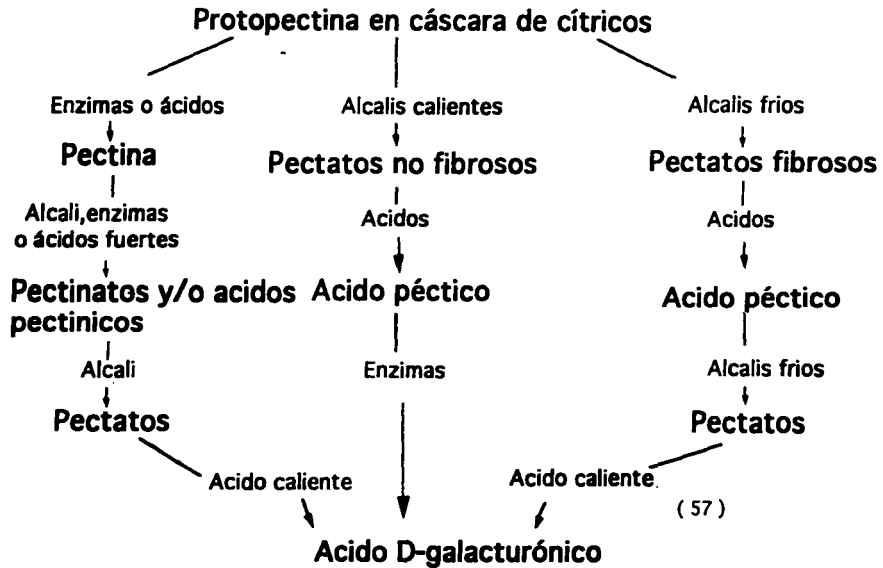


Acido Pécico o
Pectatos

(75)

ESQUEMA #3

Relación entre las sustancias pécticas



2.2. CLASIFICACION DE LAS ENZIMAS PECTINICAS

Llamamos enzimas pectínicas a aquéllos complejos enzimáticos cuya acción consiste en hidrolizar sustancias pecticas para promover la formación de urónidos y de ácido galacturónico (38). Esta hidrólisis juega un papel muy importante en la degradación biológica de los alimentos y en el procesamiento de éstos. Están clasificadas en dos grupos principalmente: las esterasas y las depolimerasas, las cuales pueden ser hidrolasas o liasas.

ESTERASAS. Pectinesterasa, E.C. 3.1.1.11., desterifica la pectina a ácido pectínico removiendo residuos de metoxilo.

DEPOLIMERASAS. Estas se dividen sobre la base del sustrato que prefieren (pectina o ácido pectico) y en sí son enzimas de tipo endo o exo.

HIDROLASAS. Endopoligalacturonasa, E.C. 3.2.1.15., hidroliza el ácido pectico de manera aleatoria.

Exopoligalacturonasa, E.C. 3.2.1.67., hidroliza el ácido pectico liberando D-galacturonato.

LIASAS O TRANS-ELIMINASAS. Endopectin liasa, E.C. 4.2.2.10., causa ruptura aleatoria en la pectina por un proceso de transeliminación.

Endopectato liasa, E.C. 4.2.2.2., causa ruptura aleatoria en el ácido pectico por un proceso de transeliminación.

Exopectato liasa, E.C. 4.2.2.9., causa ruptura secuencial en el ácido pectico por un proceso de transeliminación.

Estas enzimas son producidas por plantas superiores y microrganismos y no son sintetizadas por células animales. A continuación se muestra en el cuadro 6 la distribución de enzimas pecticas en algunos microorganismos (7).

CUADRO No. 6 Distribución de Enzimas Péclicas en Microorganismos

MICROORGANISMO	PE	EPG	EXPG	EPL	ENPL	EXPL
<i>Erwina aroidae</i>		+	+		+	+
<i>Pseudomonas sp.</i>					+	+
<i>Xantomax sp.</i>	+			+		
<i>Bacillus sp.</i>		+	+		+	
<i>Clostridium felsineum</i>	+		+		+	
<i>Cephalosporium sp.</i>	+			+		+
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus sojae</i>	+	+		+	+	
<i>Fusarium solani</i>		+	+			+
<i>Penicillium italicum</i>	+			+		+
<i>Rizopus arhizus</i>		+		+	+	

PE PECTIN ESTERASA
 EPG ENDOPOLIGALACTURONASA
 EXPG EXOPOLIGALACTURONASA
 EPL ENDOPECTINLIASA
 ENPL ENDOPECTATOLIASA
 EXPL EXOPECTATOLIASA

PECTINESTERASA. La pectinesterasa, E.C. 3.1.1.11., se encuentra en la bibliografía con diferentes denominaciones, tales como: pectasa, pectín metoxiliasa, pectinesterasa, pectín demetoxiliasa, pectolipasa, pectín pectilhidrolasa, polimetil galacturonato esterasa. Sin embargo, la más común de todas es la Pectin Metil Esterasa (57).

Esta enzima se encuentra en raíces, hojas y frutos de plantas superiores, y es producida por microorganismos. Algunas de las plantas superiores que poseen esta enzima son la alfalfa, tabáco, tomates y frutas cítricas principalmente.

La pectinesterasa de origen microbiano fue descubierta mucho después que en las plantas superiores. Algunas bacterias que producen estas enzimas, pertenecen a los siguientes géneros: Bacillus, Clostridium, Pseudomonas, Xantomax y Erwinia, entre otras. En cuanto a la pectinesterasa de origen fúngico se obtienen muy buenos resultados del Aspergillus niger.

En el Cuadro No. 7 se pueden observar algunas propiedades de esta enzima, dependiendo de la fuente de que provengan.

CUADRO No. 7 Propiedades de la Pectinesterasa

FUENTE	PESO MOLECULAR	PUNTO ISOLECTRICO	pH	Km
Frutas	26300-36200	8.4 - 10	6-8	2.3-0.083
Hongos	35000	-----	3.5	0.7
Bacterias	400000	-----	9.0	0.74

(33)

En cuanto a las propiedades químicas de la pectinesterasa podemos decir lo siguiente:

- Es activada por cationes mono y divalentes en altas concentraciones (20).
- En soluciones libres de sales y con pH 4 su actividad es casi 0 y se incrementa rápidamente al aumentar este factor a 8.0. Por lo general, el efecto de las sales consiste en bajar el potencial de hidrógeno hasta obtener la actividad máxima además de extender el rango de actividad. Sin embargo, cuando el rango de pH se encuentra entre 7.0 - 8.0 las sales tienen poco efecto en la actividad de esta enzima (57).
- La pectinesterasa de hongos es diferente en muchos aspectos a la encontrada en plantas superiores. La enzima de origen fúngico es activada en medios libres de sales a pH de 4.0, desarrollando su máxima actividad entre un rango de 4.5 a 5. La adición de sales incrementa la actividad de la enzima, especialmente a pH cercanos al óptimo, pero no causa alteraciones cuando el valor del potencial de hidrógeno es el óptimo.

- La pectinesterasa de plantas superiores es comparativamente más resistente al calor. Soluciones de la enzima obtenida de tomates o de hojas de tabaco con pH de 4.0 - 6.0, no muestran pérdida de actividad cuando son calentadas a 55° C por 1 hora. Por arriba de 60°C la enzima es gradualmente inactivada. Por esta razón en procesos de manufactura de tomate, el proceso se lleva a cabo a temperaturas superiores a los 80°C.
- La pectinesterasa de origen fungal resulta ser más sensible al calor que la que proviene de plantas superiores. La inactivación por calor de la pectinesterasa fungal es notable a los 30°C.

La acción de la pectinesterasa consiste en remover los grupos metoxilo de la pectina. Esta enzima esta clasificada como hidrolasa, ya que su acción específica es esterificar el ácido carboxílico.

La reacción catalizada por esta enzima se muestra en el esquema No. 4.

La actividad de la pectinesterasa se realiza en un pH de 4.0 a 7.5 debido a la ionización del grupo carboxilo del producto para donar un protón.

El pKa del grupo carboxilo se encuentra alrededor de pH de 4.5. La actividad es mayor sobre pectina que se encuentre metilada entre el 65% y el 75% ya que la enzima puede actuar sobre los grupos metoxilo adyacentes a los grupos carboxilo libres (57).

Lineweaver y Ballou sugieren que los cationes liberan a la enzima de la acción inhibitora de los grupos carboxilo debido a la formación de un complejo catión carboxilo.

Debe tomarse en cuenta que durante la reacción también hay formación de grupos carboxilo. Anteriormente se pensaba que la influencia de los cationes sobre la pectinesterasa consistía en la peptonización de la enzima.

Se ha encontrado que la pectinesterasa hidroliza la pectina por lo menos 1000 veces más rápido que otros esteroides no galacturónidos. Parece ser entonces que la pectinesterasa es una enzima con considerable especificidad cuantitativa por los grupos metil ester.

En cuanto a su activación, la pectinesterasa de plantas superiores sufre una activación en presencia de cationes, variando la actividad según la valencia del catión. Con cationes divalentes a pH de 6.0 se produce máxima activación a concentraciones de 0.1M. Si la concentración se mantiene por debajo de 1 M., la actividad no disminuye. La máxima actividad se obtiene cuando el pH se mantiene bajo y la concentración de cationes divalentes también (23).

La pectinesterasa de plantas superiores es resistente a: formaldehído, iodo, ácido indoacético, cianuro de hidrógeno, cloruro mercurico, cobre, sulfatos, etc., en cambio la piridina y quinolina tienden a inactivar a la enzima (58).

También se ha encontrado que soluciones jabonosas inactivan a la pectinesterasa a bajas concentraciones.

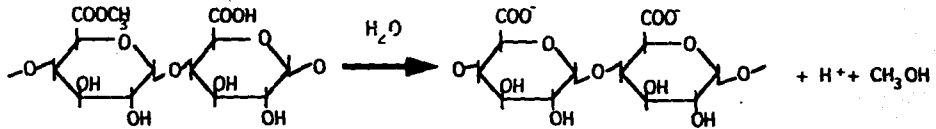
Por otro lado, la enzima de origen microbiano resulta comportarse de manera diferente a la enzima de plantas superiores (69). La de origen fungal es activada en un medio libre de sales y el efecto de adicionar éstas, incrementa la actividad en el pH óptimo 4.5 - 5.0.

La actividad que se ejerce en presencia de una solución 0-1 M de cloruro de sodio decae rápidamente así como el pH se incrementa por encima del óptimo, y a pH de 7.0 no se observa ningún incremento en la actividad.

La pectinesterasa de origen fungal es mucho más resistente a la inhibición química. Las concentraciones de detergentes sintéticos que afectan a la enzima de origen vegetal no afecta o inhibe parcialmente la enzima de hongos (71).

ESQUEMA #4

Acción de la pectinesterasa sobre la pectina



(54)

ENDOPOLIGALACTURONASA. Estas enzimas son responsables de hidrolizar los enlaces 1-4 entre las unidades de ácido N-galacturónico como se muestra en el esquema No. 5. Estas enzimas fueron descubiertas por primera vez en los tomates, en donde se encuentran en un alto porcentaje (23).

La endopoligalacturonasa es la enzima que hidroliza los enlaces internos de las cadenas de ácido poligalacturónico. Estas son producidas por numerosos hongos, levaduras, bacterias y algunas plantas superiores (41). Entre las plantas superiores que sintetizan esta enzima encontramos frutas suaves tales como los duraznos, aguacates y dátiles.

En los últimos años, un gran número de endopoligalacturonasas, generalmente de hongos han sido extraídas y purificadas. La mayoría de estos organismos producen varias formas moleculares e isoenzimas (41). En contraste con la pectinesterasa, no se presenta en el estado inmaduro de la fruta, aparece cuando la fruta está a punto de madurar y se incrementa durante el ablandamiento de ésta. Por lo que se sugiere que esta enzima cumple una función importante de éste proceso (6).

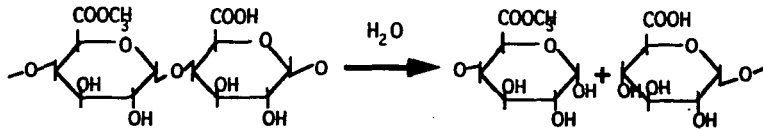
De las propiedades fisicoquímicas se puede decir lo siguiente:

- El peso molecular varía entre 30,000 y 40,000 (8).
- El pH óptimo de las endopoligalacturonasas varía generalmente entre 4.5. y 5.0. El pH óptimo se relaciona con el tamaño de la cadena del sustrato.(77)
- El punto isoeléctrico se encuentra entre 6 y 7 para la enzima de origen fúngico.

A continuación se presenta en el cuadro No. 8 las propiedades de algunas endopoligalacturonasas de origen fúngico.

ESQUEMA #5

Acción de la poligalacturonasa sobre el ácido péctico



(54)

CUADRO No. 8 Propiedades de las Endopoligalacturonasas

ORGANISMO	pH OPTIMO	PESO MOLECULAR	PUNTO ISOELECTRICO
<i>A. niger</i>	4.1	35,000 daltones	---
<i>A. japonicus</i>	4.5	35,000 daltones	---
<i>F. oxisporum</i>	5.0	37,000 daltones	7.0
<i>N. sitophilia</i>	5.5	13,000 daltones	---
<i>R. fragariae</i>	5.0	36,000 daltones	6.8

Las endopoligalacturonasas son específicas para los ácidos pécticos (19). Su actividad es inversamente proporcional al grado de polimerización. Se dice que si la velocidad inicial de la hidrólisis sobre las sustancias pécticas es de 100, las velocidades serán 7, 1.6 y 1 respectivamente (41).

El digalacturonato casi nunca puede ser hidrolizado, y en algunas ocasiones, el primero tampoco.

Los pectatos que tienen el grupo hidróxilo secundario, C 3 ó C 2 parcialmente acetilado, también son degradados con la misma velocidad. Los valores aparentes de la constante K_m de Michaelis-Menten son incrementados y los límites de degradación son disminuídos (23). La velocidad inicial de la hidrólisis de la enzima producida por *Erwina carotovora*, resulta ser función del tamaño del sustrato. El ácido poligalacturónico, hexa, penta, tetra y tri es hidrolizado a las velocidades relativas de 100, 52, 15.8, 12.8, 2.2 y 1.7 respectivamente.

Se ha encontrado que existen dos mecanismos de acción de las endopoligalacturonasa. En el primero se hidroliza aleatoriamente un enlace en un sólo encuentro, enzima-sustrato seguido de una disociación completa, tanto de la enzima como de los productos. Estos son acumulados después de la hidrólisis de los oligalacturonatos, los cuales resultan ser los productos iniciales.

El segundo mecanismo consiste en un ataque múltiple a una sola cadena, en donde una hidrólisis al azar es seguida de ataques no aleatorios en uno de los productos, resultando así una liberación rápida de los productos.

Como un ejemplo del primer mecanismo, podemos mencionar que la enzima de Kluyveromyces fragilis, hidroliza el pectato a través de una serie de oligalacturonatos superiores, los cuales son hidrolizados subsecuentemente hasta que el mono y digalacturonato son acumulados. En el caso del segundo mecanismo la enzima de Colletotrichum lindemuthianum, actúa produciendo predominantemente tanto al inicio como al final di y trigalacturonatos (53).

Las endopoligalacturonasas actúan de manera diferente a los oligalacturonatos. Estas diferencias son determinadas por la naturaleza del sitio activo de las enzimas, pero más específicamente por el tamaño del enlace con el sustrato y la posición del grupo catalítico. Por ejemplo, Rexová y Benková en 1973, sugieren que el sitio activo de la enzima producida por Aspergillus niger se compone de 4 subsitios y que los grupos catalíticos se encuentran entre los subsitios 1 y 2 (23).

Los grupos catalíticos de la endopoligalacturonasa del Aspergillus niger, resultan ser un grupo histidina y un grupo carboxilo. Se cree que en la molécula del sustrato intervienen tanto grupos carboxilo, como alcoholes secundarios.

Se requiere de la presencia del cloruro de sodio para llegar a una máxima actividad, así como las pectinesterasas requieren de un catión divalente. Se piensa que esta sal es necesaria para prevenir la inhibición por parte de los productos.

La hidrólisis del ácido péctico por la endopoligalacturonasa se produce una rápida caída en la viscosidad del sustrato. Cuando se hidroliza tan sólo una pequeña parte de los enlaces, se presenta una caída en la viscosidad del 50%.

Dicha caída, es cuantificada para medir la actividad de la endopoligalacturonasa. La actividad también se puede medir cuantificando el incremento en la velocidad de formación de grupos reductores.

Existen dos pruebas colorimétricas, la prueba de Nelson Somogui y la prueba de Milneer y Avigad (6). Sin embargo, estas pruebas tienen algunas desventajas ya que se sabe que no existe una relación directamente proporcional a la velocidad del decremento de viscosidad entre varias poligalacturonasas y el número de enlaces glicosídicos rotos (hidrolizados), ya que el efecto de la viscosidad depende de la localización de dichos enlaces hidrolizados dentro de la cadena del polímero.

La hidrólisis de un enlace que encuentre cerca de la mitad de la cadena polimérica tiene mayor efecto en la viscosidad que la hidrólisis que ocurre en los extremos de las cadenas (68).

De un grupo de sustancias que se consideran inhibidoras de enzimas sólo el ácido nítrico inhibe a la poligalacturonasa de la levadura. Se ha sugerido que los grupos amino primarios pueden ser involucrados en la formación del complejo enzima-sustrato. La actividad de la endopoligalacturonasa purificada del Aspergillus niger fue afectada por la acetilación del 70% de los grupos de alcoholes secundarios en el ácido péctico (6).

EXOPOLIGALACTURONASA. Esta enzima puede ser encontrada en algunas plantas superiores y el tracto intestinal de algunos insectos. También es producida por bacterias y por hongos.

Existen reportes en donde aparecen varias exopoligalacturonasas en plantas superiores como por ejemplo, la zanahoria, durazno, pepino, frutas cítricas (84), peras y manzanas y semillas de avena (19).

Estas enzimas prefieren atacar pectatos con pesos moleculares altos o moderadamente altos en los cuales atacan el extremo no reductor, liberando monogalacturonato (84). En ocasiones, también degradan el oligagalacturonato y el digalacturonato.

Las propiedades de estas enzimas producidas por plantas superiores son las siguientes:

- Tienen un pH óptimo de 5.0 aproximadamente, son estimulados por iones Ca^{+2} .
- La hidrólisis de los pectatos no se produce por completo aparentemente por las irregularidades estructurales de los sustratos (88).

Con respecto a la exopoligalacturonasa que producen los insectos, se ha estudiado su actividad, la cual resulta proporcional al tamaño de la cadena del sustrato. Cuando estas se hidrolizan, se liberan unidades de monogalacturonato. Estas enzimas atacan en el extremo reductor (25).

Para hablar de las exopoligalacturonasas bacterianas, se toma como ejemplo a la enzima de la bacteria Erwinia aroidae, la cual tiene un pH óptimo de 7.2 y produce ácido digalacturónico (58).

Esta enzima al igual que la de C. diploidello parece que ataca primero el extremo reductor de la cadena, bloqueándose la acción con el doble enlace 4-5. Esta enzima produce ácido mono y digalacturónico del trigalacturonato.

Estas enzimas tienen preferencia por sustratos con pesos moleculares altos (55).

Con respecto a las exopoligalacturonasas de hongos se puede decir que tienen pH óptimo entre 4 y 6, y producen el ácido monogalacturónico.

La exopoligalacturonasa de Aspergillus niger no tienen preferencia con respecto al tamaño de la cadena del sustrato (43).

ENDOPECTATO LIASA. Las endopectato liasas son producidas por varios grupos de bacterias y por algunos hongos, como son: Bacillus polymyxa, Erwinia aroideae, Erwinia carotovora y el Cephalosporium Hypomyces.

Aunque estas enzimas no son producidas por el A. niger, se expondrán sus propiedades ya que las pectinasas comerciales contienen a menudo una porción de éstas, por lo tanto, es importante mencionarlas brevemente.

El pH óptimo de éstas enzimas es alto, varía entre 8.2 y 9.9 dependiendo de su fuente microbiana. Su actividad enzimática requiere de la presencia de iones calcio.

El ataque de estas enzimas sobre sus sustratos es del tipo de B-eliminación, por lo que sus productos resultan con un doble enlace entre el C-4 y el C-5. La conjugación de ese doble enlace con el grupo carboxil produce una absorción a 235nm. Por esta razón, las endopectato liasas son analizadas con un espectrofotómetro de luz ultravioleta.

El ataque de las endopectato liasas produce un decrecimiento de la viscosidad del sustrato directamente proporcional al número de enlaces glicosídicos rotos. La actividad de estas enzimas decrece con la reducción de la longitud de la cadena del oligalacturonato (55).

EXOPECTATO LIASA. Estas enzimas tampoco son producidas por A. niger pero se mencionan algunas de sus propiedades por las causas anteriormente expuestas.

Son producidas por Clastridium multifementans, Erwinia dissolvens y Fusarium culmorum, entre otros.

Esta enzima ataca preferentemente a ácidos pécticos y no así a las pectinas. Rompe a los digalacturonatos insaturados y, algunas veces, a los trigalacturonatos del extremo reductor.

Se han reportado pH óptimos altos (8.0 - 9.5) también requieren necesariamente de los iones calcio para su actividad. En pocos casos se requieren de iones de sodio. El ácido etilen diamino tetraacético es un inhibidor de estas enzimas debido a la quelación del calcio (23).

ENDOPECTIN LIASA. Las endopectin liasas son producidas casi exclusivamente por hongos, y a diferencia de las otras dos liasas, éstas sí son producidas por el Aspergillus niger.

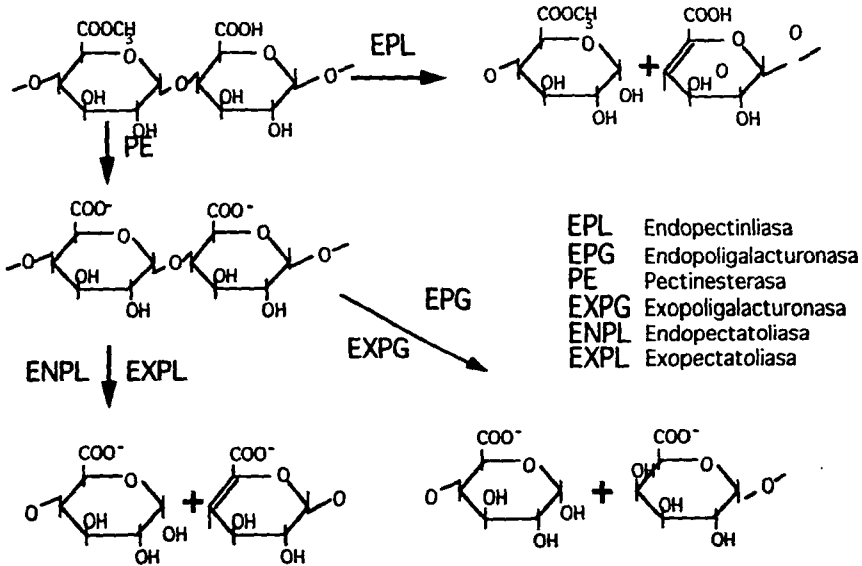
Los mejores sustratos para estas enzimas son pectinas altamente esterificadas.

La mayoría son activadas por los iones calcio y otros iones, su estimulación dependerá de los valores de pH y del grado de esterificación del sustrato.

Su acción produce una disminución de la viscosidad del sustrato debido a la ruptura de los enlaces glicosídicos. Por esta razón, su actividad decrece a medida que la longitud del oligalacturonato disminuye (55). (Esquema No. 6.)

ESQUEMA #6

Acción de las enzimas pectínicas sobre las sustancias pécicas



(23)

2.3. CARACTERISTICAS DEL MICROORGANISMO.

Los principales microorganismos productores de pectinasas a escala comercial son los hongos, y muy particularmente de especies como *Aspergilli*. Existen organismos incluidos en esta especie tales como *Aspergillus niger*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, etc.. Las características de las enzimas provenientes de estas fuentes las hace ideales para la industria de jugos, en donde encuentran muchas aplicaciones. Las enzimas de origen fúngico utilizadas en procesos comerciales resultan ser una mezcla de enzimas pectolíticas.

Las pectinasas no son producidas comercialmente a partir de bacterias, a pesar de que existan especies altamente productivas de endopectin liasas y otras enzimas.

En el Código de los Estados Unidos para las Regulaciones Federales (CFR), al igual que los acuerdos del FDA para sustancias reconocidas como seguras para su uso en alimentos (GRAS), se especifica que las únicas fuentes permitidas para la producción de pectinasas son el *Aspergillus niger* por el GRAS y *Rhizopus oryzae* por el CFR.

Los productores de pectinasas en la mayoría de los casos utilizan al *Aspergillus niger*. Este microorganismo se describirá y es el que se utilizará para la producción de la pectinasa en esta tesis (73).

La palabra *Aspergillus* o *Aspegillum*, significa un tipo especial de cepillo para salpicar agua bendita utilizada en una ceremonia llamada "Asperges". La similitud del *Aspergillus niger* común a este especie de cepillo es impresionante (81).

La designación de Aspergillus niger se utiliza comúnmente para denominar una gran variedad de Aspergilli, los cuales difieren en detalles de morfología, pero tienen en común la producción de cabezas con conidios.

Las características más sobresalientes del grupo de Aspergillus niger, son las siguientes:

- 1) Cabezas con conidios de color negro carbón, negro café o café morado, y en sus mutantes colores más claros pero nunca blancos.
- 2) Las cabezas típicas son largas y globosas, sin embargo, algunas cepas producen cabezas pequeñas.
- 3) Conidios suaves, incoloros o teñidos con colores amarillo café, en el tercio superior se dividen longitudinalmente en tiras.
- 4) Vesículas globosas en cabezas largas: fértil sobre toda la superficie; en cabezas pequeñas, regularmente reducida a ápices de pequeños conidióforos "fumigatiforme".
- 5) Conidios ásperos, generalmente mostrando barras o bandas de materia de color café negruzco.
- 6) Poseen una esclerotia característica, la cual puede ser de color gris a casi negro (80).

El Aspergillus niger es un productor efectivo de pectinesterasa, poligalacturonas y pectin liasa.

Más adelante se explicará de manera detallada el procedimiento de biosíntesis de la pectinasa utilizando el Aspergillus niger (73).

2.4. DISPONIBILIDAD DE LA PECTINASA EN EL MERCADO NACIONAL.

Las pectinasas no son fabricadas hasta 1992 en México, por lo que los industriales que requieren de esta mezcla enzimática se ven en la necesidad de importarla o de comprarla a distribuidores que han hecho la labor de importación.

Para conocer las empresas nacionales que consumen pectinasa regularmente se requeriría realizar un estudio de mercado completo, realizando cuestionarios a las industrias que posiblemente utilizan pectinasas. Por este motivo, se consultó el Sistema de Estadísticas de Comercio Exterior en donde se informan de las importaciones realizadas en cada año de las pectinasas. Aunque en estos datos no se incluyan todas las importaciones, nos da una idea de las cantidades que se importan al año.

En el siguiente cuadro (No. 9), se muestran las cantidades importadas de pectinasa de 1988 a 1993. También se indican los países de procedencia en donde podemos notar que el principal fabricante y exportador son los Estados Unidos.

CUADRO No. 9 Importaciones de las Pectinasas (Kg.)

PAÍS	1988	1989	1990	1991	1992	1993
Alemania	1600	-	1100	1400	1725	1216
Japón	165	-	200	325	325	298
Francia	1165	300	765	932	825	1200
E.U.A.	14128	28729	23844	25625	23125	32134
TOTAL	17058	29029	25909	28282	35858	34848

(16)

Este cuadro nos indica que en los últimos años ha aumentado considerablemente la importación de pectinasas a México.

Aunque estos datos no son exactos, ya que hay muchas empresas que no notifican con precisión sus importaciones, es importante resaltar que en México se usa cada vez más esta mezcla enzimática.

CAPITULO III.

PROCESO DE FABRICACION DE PECTINASAS

Desde hace mucho tiempo se han reconocido los grandes beneficios que ofrece la utilización de enzimas para modificar las propiedades funcionales de los alimentos. Desde la Segunda Guerra Mundial, se ha otorgado un especial interés al desarrollo de nuevas enzimas y de nuevas fuentes enzimáticas. Se estima que en 1990 la venta mundial de enzimas fue de 350 millones de dólares. Sin embargo, sólo pocas enzimas han sido utilizadas ampliamente. El primer gran obstáculo en la utilización de las enzimas es el costo. Para poder reducir el costo en el desarrollo de esta área se han establecido tres grandes áreas: mejoramiento de una especie microbiana, Inmovilización enzimática y mejoramiento de la estabilidad.

Actualmente las pectinasas son fabricadas en muchos países y utilizadas en casi todo el mundo. Sin embargo, los fabricantes guardan celosamente sus métodos de producción y la literatura acerca de este tema es muy limitada. Sin embargo, se explica el método general de la producción de pectinasa, así como los detalles más importantes de cada operación.

3.1. REGULACION DE LA PRODUCCION ENZIMATICA Y SU METODOLOGIA DE LA FERMENTACION

La razón mas importante de la utilización de los microorganismos como fuentes potenciales de enzimas, es la facilidad que tienen estos de incrementar los niveles enzimáticos por medio de controles genéticos y del medio ambiente.

Mientras mayor especificidad en su actividad tenga una enzima, más fácil será el aislamiento enzimático. Además, existen otras razones por las cuales se prefiere utilizar a las células microbianas como fuentes enzimáticas, estas son:

- a) Las fermentaciones enzimáticas a nivel industrial son económicas debido a que los ciclos de fermentación son cortos. La razón más importante de la utilización de los microorganismos como fuentes potenciales de enzimas, es la facilidad que tienen estos de incrementar los niveles enzimáticos por medio de controles genéticos y del medio ambiente y los medios de cultivo no son costosos.
- b) Los procedimientos de selección de la mejor especie para producir una enzima específica son fáciles y se elaboran en muy poco tiempo.
- c) Existen especies diferentes que producen diferentes enzimas que catalizan la misma reacción, permitiendo así tener flexibilidad en las condiciones operativas (51).

En el caso específico de las pectinasas, la síntesis microbiana de éstas presenta grandes ventajas sobre el método de extracción de fuentes naturales como son algunas frutas o verduras ya que éste método es mucho más costoso y el rendimiento es muy bajo (23).

Los procedimientos básicos en una fermentación enzimática son los siguientes:

A) Selección de la especie. Cuando se realiza una fermentación enzimática es muy importante que ésta se realice con la especie más activa.

En el caso de las pectinasas, la especie utilizada por la mayor parte de los fabricantes es A. niger. Esta especie sintetiza gran parte de las enzimas pectínicas,

además de que las excreta por lo que facilita en gran medida su aislamiento y purificación. Se han llegado a utilizar otras especies del género *Aspergillus* como es *A. oryzae* (24).

B) Optimización de la fermentación. Para poder optimizar la producción, los parámetros que afectan la síntesis enzimática y su elaboración deben ser investigados. Los controles más importantes a verificar son el pH, la temperatura y la transferencia de oxígeno. Estos datos son secretos de cada productor, pero se podría decir que la temperatura óptima para la síntesis de enzimas pécticas por el *A. niger* es de 37°C y el pH varía entre 2.5 y 4 (23).

Otros parámetros no menos importantes son la nutrición del microorganismo, de la que se hablará más adelante, y la utilización de otras sustancias en el medio de cultivo como son los solventes y los surfactantes.

C) Reconocimiento del ciclo de crecimiento. Para poder lograr un buen crecimiento del microorganismo, y por lo tanto, una mayor producción de enzimas, es muy importante conocer lo mejor posible la curva de crecimiento del microorganismo en cuestión (2).

1. INDUCCION ENZIMATICA.

Los genes estructurales para la producción de muchas enzimas están normalmente inactivos en la ausencia del sustrato enzimático. A éste fenómeno se le llama producción reprimida. Sin embargo, cuando el sustrato indicado es adicionado, los genes estructurales empiezan a funcionar y la enzima es entonces producida. A este proceso se le conoce como "inducción" y a la enzima como "inducida".

En muchas ocasiones, los mejores inductores son análogos del sustrato, en otras, los productos intermedios son los inductores, como es el caso del ácido

galacturónico, inductor de la pectinesterasa y producto intermedio del sustrato; ácido poligalacturónico.

Para eliminar la dependencia enzimática de un inductor se puede realizar una mutación denominada "mutación regulatoria" ya que el gen es regulador y no estructural. Los mutantes que producen una enzima inducible normal sin un inductor son llamadas "mutantes constitutivas" (37).

2. REPRESION DE RETROALIMENTACION

Algunas enzimas se sintetizan en forma regular durante el crecimiento del microorganismo, sin embargo, llega un momento en el que esta síntesis es reprimida cuando hay una alta concentración de productos finales.

Los productos finales poseen pesos moleculares muy bajos y se les llama "corepresores", estos se combinan con una proteína intracelular codificada por el gen regulador y es denominada "apopresor", es entonces cuando se forma el "represor" (14).

El represor daña el gen que codifica la producción enzimática. Las enzimas que siguen este patrón de actividad se les llama "enzimas represibles". Para solucionar este problema se debe evitar la acumulación de productos finales en el medio.

Otra alternativa es obtener mutantes reguladoras, las cuales no sean reprimidas por los productos finales (67).

3. REPRESION CATABOLICA

Las enzimas del tipo inducibles catabólicas, son reprimidas cuando las células crecen rápidamente en un medio que contenga una fuente de carbono fácilmente utilizable. Esto causa una disminución en la concentración intracelular del AMPcíclico impidiendo así que los genes estructurales dejen de funcionar.

Existen numerosas enzimas de uso industrial que están sujetas a este tipo de represión. La poligalacturonasa sufre una represión catabólica, por lo que en este caso también se pueden crear mutantes modificadas en su catabolismo de glucosa.

Con suerte, en el futuro se podrán realizar manipulaciones genéticas, las cuales producirán muchos beneficios para los microorganismos productores de enzimas de importancia industrial (53).

4. COMPOSICION DEL MEDIO.

La selección de un buen medio tiene la misma importancia que la selección del microorganismo para lograr el éxito de la fermentación. El medio provee los nutrientes para el crecimiento, la energía, la construcción de las células y la biosíntesis de los productos de fermentación. Tienen particular importancia las fuentes de carbono y los componentes nitrogenados ya que las células de los microorganismos se componen en gran parte de estos elementos. Además un medio debe contener sales inorgánicas, agua, vitaminas y otros factores de crecimiento, precursores de los productos de fermentación, oxígeno disuelto, otros gases, buffers y antiespumantes (18).

Si la preparación del medio no se realiza adecuadamente, el crecimiento microbiano no será el adecuado y por lo tanto el rendimiento del o de los productos deseado será muy bajo.

También un medio pobre puede provocar productos de diferentes tipos a los deseados, por lo que los tipos y cantidades de los componentes de un medio nutritivo son críticos.

La composición particular de un medio de fermentación puede ser simple o complejo, estos a su vez se dividen en otras dos categorías; sintético o crudo.

Un medio sintético es en el cual todos los constituyentes son definidos y conocidos específicamente. Cada constituyente es un compuesto relativamente puro y son conocidas las cantidades exactas de cada uno de ellos. Un ejemplo de este tipo de medio podría ser alguno que contenga sales minerales, agua, azúcar purificada, amoníaco o aminoácidos.

El medio sintético ofrece muchas ventajas, sin embargo, es muy costoso ya que los materiales puros son caros y los rendimientos obtenidos son bajos (18). No obstante este tipo de medios se utilizan con fines experimentales.

El medio crudo permite obtener rendimientos mucho más altos, además de ser más económico. Un ejemplo de un medio crudo es uno que contenga soya, melazas, licor de maíz, sulfato de amonio, carbonato de calcio y fosfato ácido de potasio.

Como un medio crudo contiene fuentes crudas de nutrientes, estos proveen un exceso de factores de nutrición.

Además es necesario adicionar a un medio sintético o crudo, otros productos como agentes antiespumantes, agentes controladores de REDOX, agentes de inhibición de microorganismos contaminantes y otros (18).

El principal componente en todo medio, es el agua. Como los microorganismos viven en medios acuosos, sus nutrientes deben estar disueltos en ella. Normalmente, un medio posee de un 70 a un 90% de agua, la cual provee a los microorganismos de trazas minerales, metales como el cobre, molibdeno, zinc o boro y otras sustancias que son requeridas en cantidades mínimas y que en caso de no encontrarse presentes se podrían inhibir actividades esenciales del microorganismo (67).

5. ESTERILIZACION DEL MEDIO.

La apropiada esterilización del medio nutritivo juega un papel muy importante en la fermentación llevada a cabo por el A. niger para la producción de las pectinasas.

La esterilización del medio puede ser llevada a cabo por la remoción de los microorganismos contaminantes o bien por la destrucción de éstos. Sin embargo, la práctica más utilizada es la destrucción de los microorganismos ya que los métodos de remoción no siempre garantizan una esterilización del medio y no se puede correr el riesgo.

Los métodos destructivos pueden ser químicos, térmicos, congelamiento, ondas sonoras o irradiación. En la actualidad, el método más utilizado es el térmico ya que es el más simple, económico y confiable.

Para lograr una esterilización térmica óptima, se deben tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- Entre más componentes crudos contenga el medio, mayor será el tiempo del tratamiento térmico, ya que el medio es más viscoso y por que se podrían presentar esporas termófilas.
- El medio no debe ser sobrecalentado ya que se pueden caramelizar los azúcares, además que se pueden presentar reacciones entre los azúcares y los fosfatos.
- Muchos componentes pueden degradarse durante el tratamiento térmico a valores de pH altos o bajos, por lo que es recomendable neutralizar el medio antes del tratamiento térmico y después ajustar el pH al valor adecuado.

- Otros componentes pueden volatilizarse por lo que es necesario que éstos se esterilicen aparte por medio de un filtro bacteriológico (50).

6. AERACION Y AGITACION.

Es muy reconocida la importancia que tiene la aereación y la agitación de los procesos aeróbicos de fermentación.

El objetivo principal es el de proveer el oxígeno necesario a los microorganismos para así poder llevar a cabo apropiadamente las actividades metabólicas. El A. niger es un microorganismo aeróbico y es vital cuidar el suministro de oxígeno para un buen rendimiento de pectinasas.

Una función secundaria de la aereación y agitación es la de mantener a los microorganismos suspendidos. Sin embargo, sólo una pequeña porción de la agitación es requerida para esto.

En el laboratorio la aereación y agitación son llevadas a cabo por medio del aparato de agitación y en la escala piloto e industrial, el oxígeno es suministrado por aire comprimido y la agitación es llevada a cabo por aditamentos mecánicos.

Podemos considerar al oxígeno disuelto como un nutriente análogo a los otros nutrientes, tales como la glucosa o los aminoácidos. Sin embargo, existe una gran diferencia; la solubilidad del oxígeno es extremadamente limitada en comparación con los otros nutrientes; por ejemplo, en condiciones normales de fermentación la glucosa puede presentarse disuelta aproximadamente por 10000 mg/l, mientras que el oxígeno se encontraría por 10 mg/l. Además, en la mayoría de los casos se incorpora el oxígeno molecular más que el oxígeno proveniente de las reacciones de reducción de un oxidante químico. Por esta

razón, es necesario que continuamente se provea al medio de oxígeno para así satisfacer las demandas metabólicas de los organismos (5).

3.2. FABRICACION DE PECTINASAS

1. SELECCION DE LA ESPECIE.

Se ha mencionado varias veces en esta tesis que la mejor especie resulta ser Aspergillus niger A 138, la cual es una especie mutante escogida de varias especies (27).

Esta especie mutante se obtuvo por medio de rayos ultravioleta sobre la primera especie. Para lograr esto, la especie se mantuvo en agar de mosto de cerveza en plano inclinado. Las esporas de 2 tubos de ensayo se suspendieron en 40 ml. de agua estéril (aproximadamente 10 esporas/ml.), y fueron utilizadas para 9 Lt. de medio (27).

Aunque los fabricantes de pectinasas mantienen sus procedimientos de fabricación confidenciales, se sabe que la especie más utilizada es A. niger. Sin embargo, existen patentes utilizando otras como A. wentii, A. flavus, A. oryzae, A. fumigatus, Penicillium glaucum y Rhizopus tritici (24).

2. COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO.

La composición del medio de cultivo dependerá directamente del microorganismo utilizado. El A. niger A138 producirá con alto rendimiento pectinasas utilizando el siguiente medio: 2% de pectina de manzana, 0.5% de sacarosa, 1% de suero seco, 0.2% de nitrato de amonio y 0.05% de sulfato de amonio en agua corriente (27). El pH del medio se ajusta a 4.5 con hidróxido de

potasio. Este medio de cultivo es muy sencillo y se obtienen altos rendimientos de pectinasas.

La pectina de manzana es un producto inductor de las enzimas pectínicas. Se han realizado varios experimentos para comprobar esto. Por ejemplo, Paskova realizó la siguiente fermentación; el medio se compone de 5% de sacarosa, 15% de pectina de manzana, 1% de fosfato ácido de amonio, .05% de sulfato de magnesio y el resto de sustancias aportadoras de nitrógeno tales como peptonas o mezclas de levaduras. La fermentación se llevó a cabo con aereación y a una temperatura de 27-31°C.

El rendimiento obtenido fue una mezcla de pectinasas con una actividad enzimática de 73-98 unidades/ml. Cuando se remplazo la pectina de manzana por un extracto acuoso de remolacha de azúcar o pure de manzana, la mezcla enzimática obtenida tuvo una actividad de 41-52 unidades/ml respectivamente (63).

La sacarosa y el suero son carbohidratos, los cuales proveen de energía al microorganismo y las sales de amonio funcionan como materiales nitrogenados para un adecuado aporte de nitrógeno.

El agua provee al microorganismo de trazas minerales como Cu., Zn., Bo. y otros. Además, el agua disuelve a los nutrientes para que puedan ser aprovechados por el microorganismo.

Otros autores recomiendan además el uso de otras sales como fosfato diácido de potasio, sulfato de hierro, sulfato de magnesio, carbonato de calcio o cloruro de sodio para proveer de todos los minerales necesarios para el crecimiento de A. niger (86),(79).

El fosfato diácido de potasio funciona como buffer y se puede utilizar en lugar del hidróxido de potasio. Se ha demostrado que la fabricación de

pectinasas poligalacturonasa y pectinesterasa puede ser incrementada aumentando la capacidad buffer del medio de crecimiento. Se recomienda utilizar de 280 a 800 g. de fosfato diácido de potasio por litro de medio, obteniéndose así un rendimiento del doble del normal (86).

3. ESTERILIZACION DEL MEDIO.

El medio se esteriliza en un fermentador a 121°C por 30 minutos con agitación de 200 rpm (87).

4. FERMENTACION.

La producción de pectinasas es llevada a cabo por medio de una fermentación. Existen esencialmente tres diferentes métodos para la producción de enzimas microbianas en la industria. Estos son: el método de sustrato sólido, el de sustrato sumergido y el de sustrato sumergido en dos etapas.(1)

Actualmente se utiliza con mayor frecuencia la fermentación sumergida ya que esta es mas fácil de estudiar y de controlar .

Aunque las pectinasas son fabricadas en muchos países, los europeos son los que poseen mas experiencia en este campo. Los fabricantes publican patentes de la fermentación de Aspergillus niger para la producción de pectinasa en cultivo sumergido, sin embargo los datos de las condiciones de la fermentación son contradictorios. Estas contradicciones se deben a la especificidad de cada especie fúngica. Además los resultados también resultan contraponerse, esto se debe a los diferentes métodos de determinación de actividad enzimática.(27)

La fermentación en cultivo sumergido se puede efectuar en un sistema batch o en un sistema continuo. El sistema continuo ofrece una mayor productividad. Además de lograr la habilidad de desaparecer los mecanismos de

represión bajo las limitaciones del suministro de nutrientes específicos. Sin embargo su uso industrial se ha visto limitado.

Las cuatro principales razones de esta limitación industrial son las siguientes:

- a) Una posible falla provocada por la asepsia debido al largo período de duración del proceso continuo, provocando así, un producto contaminado.
- b) Si ocurre una producción enzimática baja debido a una reversión del crecimiento acelerado se produce una degeneración de la especie productora de la enzima.
- c) El hecho de que el rendimiento de muchas enzimas extracelulares es menor que en un sistema batch.
- d) La dificultad de que con un medio complejo, utilizado comúnmente para enzimas industriales, ya que puede ocurrir una determinación equivocada del nutriente limitante y el control de su nivel.

Por estas razones, la producción de pectinasas se realiza en una fermentación sumergida en un proceso batch.

En toda fermentación, siempre se deben controlar tres factores de suma importancia que influyen en el curso de una síntesis enzimática. Estas son; temperatura, pH y la tensión de oxígeno disuelto el cual es función de la velocidad de aereación y de agitación.

1. TEMPERATURA

Mencionamos en la introducción que los microorganismos pueden ser clasificados en tres grupos basados en sus temperaturas óptimas de crecimiento; psicrófilos cuya temperatura óptima se encuentra debajo de 20°C, mesófilos cuya región óptima es cerca de 35°C y, termófilos creciendo mejor a temperaturas mayores a 50°C.

En cada clase de microorganismo, cuando la temperatura se acerca al punto óptimo, la velocidad de crecimiento específico del cultivo seguirá la ecuación de Arrhenius:

$$\mu = Ae^{-E/RT}$$

en donde A es una constante, E es la energía de activación, R es la constante de los gases y T es la temperatura.

Por lo tanto, la velocidad de crecimiento microbiano y en este caso del Aspergillus niger como función de la temperatura seguirá este comportamiento (Gráfica 1).

Para minimizar los tiempos de crecimiento en un proceso batch, la temperatura del cultivo deberá controlarse lo mas cerca posible a esta temperatura óptima.

La formación de enzimas también esta gobernada por la temperatura. Generalmente la temperatura óptima de la síntesis enzimática difiere de la del crecimiento microbiano.

Por esta razón, la temperatura a utilizarse se selecciona experimentalmente.(1)

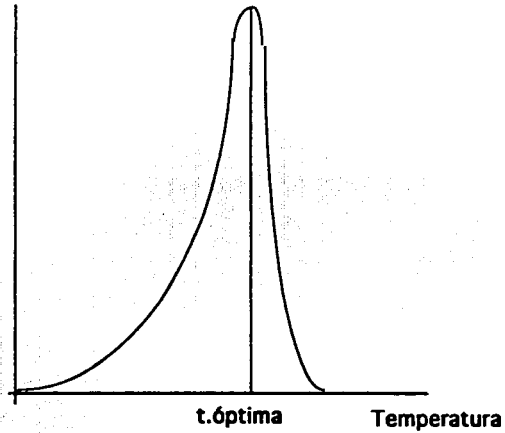
Para la síntesis de pectinasa llevada a cabo por Aspergillus niger la temperatura se mantiene a 37°C. Para lograr esto se utiliza un termostato, el cual comanda una válvula electromagnética regulante de la emisión de agua (fria o caliente); la temperatura se registra en un termómetro SIS tipo RE 3b, el cual mide también el tiempo en la que esta fue registrada .

L. Tutobello realizó una amplia investigación acerca del efecto de la temperatura en la producción de enzimas pécticas por medio del Aspergillus niger. El llegó a la conclusión que en cultivos sumergidos, la endoactividad de la mezcla enzimática resultante, es directamente proporcional a la temperatura, no así la exoactividad.(60)

GRAFICA #1

Velocidad de el crecimiento microbiano
con respecto a la temperatura

Crecimiento
microbiano
 μ



2.pH

Las enzimas, al ser proteínas, contienen grupos ionizables, consecuentemente, el pH del medio de cultivo afecta su estructura y su funcionamiento. El crecimiento de células microbianas también resulta afectado por el pH, y al igual que la temperatura, el pH óptimo de la máxima velocidad de crecimiento específico de un organismo difiere del pH óptimo de una enzima extracelular.

En algunos casos se deben utilizar diferentes condiciones de pH dependiendo de la etapa de la fermentación . Otras ocasiones se utiliza solamente uno, el cual favorezca a los dos aspectos.(1)

Durante la fermentación del Aspergillus niger el pH es controlado en 3.5. Aunque se ha comprobado que el pH óptimo para la etapa de crecimiento microbiano es de 4.5, y en la etapa de síntesis enzimática es de 2.8.(40)

3. TENSION DEL OXIGENO DISUELTO.

El provisionamiento de un suministro adecuado de oxígeno a un cultivo aeróbico en crecimiento es un requerimiento esencial, además de que influye en el rendimiento y/o productividad de una fermentación enzimática. Por este motivo es necesario proveer al fermentador de una aereación y una agitación adecuadas.(1)

Otra razón por la que se necesita agitar un fermentador es para que la transferencia de masa y de calor sea mas uniforme y fácil de controlar.

En el caso específico de las pectinasas, Jozica Friedrich y Alezka Cimerman (1989), realizaron un estudio muy completo de como manejar las condiciones de aereación y agitación para obtener mejores resultados y llegaron a las siguientes conclusiones:

-La morfología específica del Aspergillus niger produce una masa viscosa y densa al crecer por lo que influye en la transferencia de masa y de calor.(27)

-Como el resultado de la fermentación es un complejo de enzimas péclicas producidas por el Aspergillus niger, la máxima producción de cada enzima ocurre a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno.

-Experimentalmente se concluyó que se requiere utilizar una aereación de 0.5 vvm (5 l/min) y una agitación de 300 rpm al principio de la fermentación, y al llegar al punto de máximo crecimiento microbiano, la aereación deberá ser aumentada a 1.2 vvm (10 l/min) y la agitación a 500 rpm .

Estas condiciones logran que la actividad despectinlizante sea del doble de la que se logra cuando no se usa aereación y agitación. Y que el tiempo de fermentación sea reducido de 96 a 90 horas.(27)

EQUIPO

La fermentación debe ser llevada a cabo en el equipo adecuado para poder lograr controlar estos tres factores.

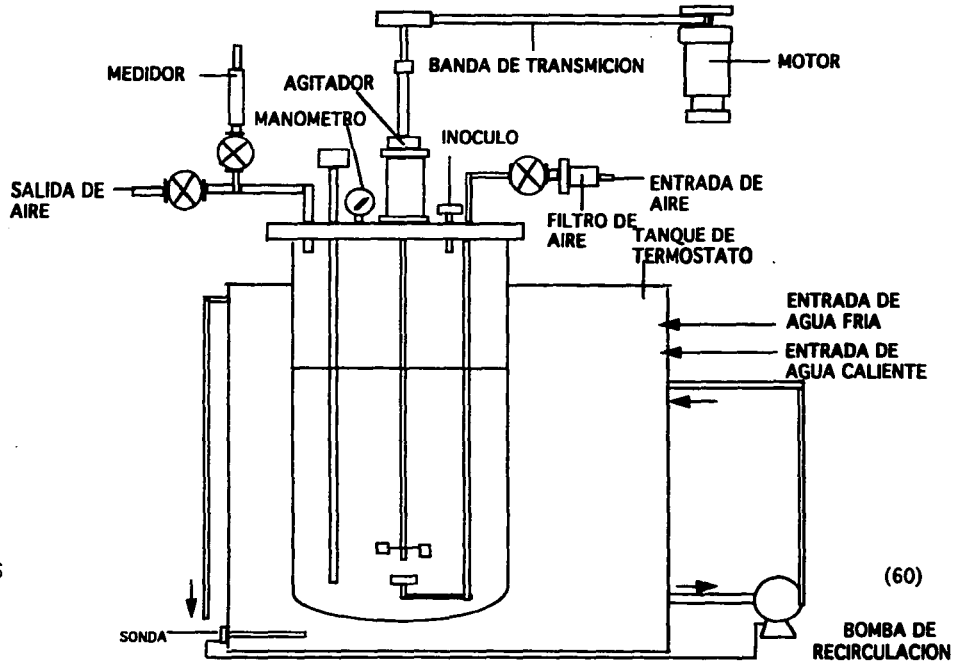
Los fermentadores utilizados son de acero inoxidable, cilíndricos y con una tapa hermética de hule la cual se sujeta con tornillos, atravesado de una asta metálica terminada en una hélice con tres paletas unidas en lo alto a un sistema con motor eléctrico por medio de una banda de transmisión.

El fermentador debe ser enchaquetado para regular la temperatura. Su capacidad debe ser de 10 lt. y deben contener 4.5 lt. de medio de cultivo.(60)

También debe tener un manómetro en la tapa. La presión a la que se deberá llevar la fermentación es de 1 atm. En el esquema No.7 se muestra un fermentador en un proceso batch para llevar a cabo la fermentación de las pectinasas.

ESQUEMA # 7

Fermentación tipo batch para la producción de pectinasas



CINETICA DE LA FERMENTACION Y DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Los microorganismos crecen en un amplio espectro de ambientes químicos y físicos, su crecimiento y otras actividades fisiológicas son de hecho una respuesta de su ambiente físico-químico. La cinética de la fermentación nos describe el crecimiento y la formación del producto por los microorganismos.

La cinética de la fermentación de un microorganismo es un tema muy amplio, que requiere de un estudio detenido del método de medición de las variables de una fermentación, tales como; concentración celular, velocidad de crecimiento específico concentración de los nutrientes, formación del producto y viscosidad entre otras cosas.

La reacción estequiométrica del crecimiento microbiano y de la formación de un producto puede ser descrita de la siguiente manera:



De esta ecuación podemos concluir que el rendimiento de la masa celular, y del producto dependen de la eficiente utilización de las fuentes de carbono y de nitrógeno. Además, de este balance es posible calcular el oxígeno necesario para producir la combustión de los nutrientes para obtener dióxido de carbono, agua y energía para el crecimiento.

Durante la producción sumergida de pectinasas por el *Aspergillus niger*, en las condiciones mencionadas en el inciso anterior, se midieron el pH, el potencial Redox, biomasa, materia seca soluble, nitrógeno de amonía, proteína soluble y actividad enzimática por medio del "The Apple Juice Depectinizing Assay"(ADJA).

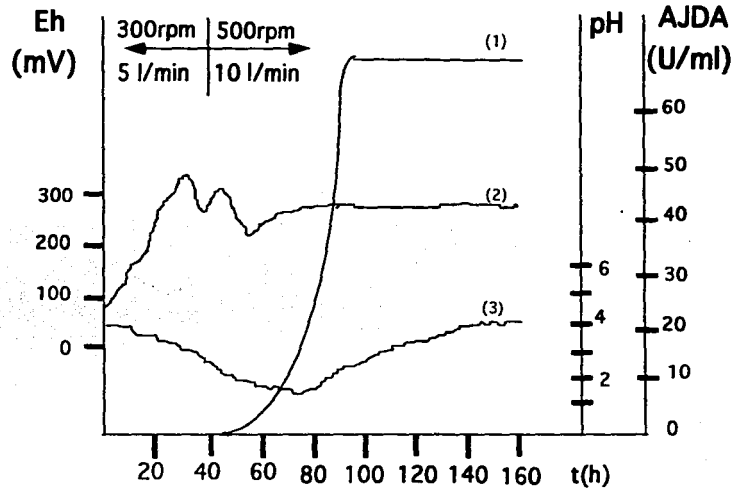
A las 50 horas de fermentación el cultivo se hizo muy grueso. Sin embargo no se observaron limitaciones serias de transferencia de masa y de calor.

Como se muestra en las gráficas 2 y 3, el curso de la fermentación tuvo un mejoramiento después de aumentar la aereación y la agitación. La curva del potencial Redox mostró dos picos en el momento en que aumentó la aereación y la agitación. La curva de pH mostró dos picos en el momento en que aumentó la aereación y después empezó a decrecer. Siguiendo el primer pico, la actividad enzimática apareció. La curva de pH mostró una disminución substancial durante el período de máximo crecimiento. Después de mantenerse en un valor mínimo de pH 2.2 por un período de 15 a 20 horas, empezó entonces a elevarse. A pesar del bajo valor de pH, el cual se encontraba en rangos de inactivación de la poligalacturonasa, la actividad enzimática continuó incrementándose. La máxima actividad enzimática se alcanzó después de un día de que el pH empezó a elevarse. Los valores de pH y potencial Redox sirvieron como indicadores valiosos de la iniciación y el fin de la síntesis enzimática. Este comportamiento se muestra en la gráfica 2.

El nitrógeno de amoníaco mostró, (gráfica 3) un pico en el comienzo de la fermentación, probablemente debido a la reducción del nitrógeno a amoníaco por asimilación. Después de 25 horas fué consumido intensamente alcanzando un valor mínimo, coincidiendo con el máximo de biomasa. Tan pronto como empezó a decrecer la concentración de biomasa, el nitrógeno del amoníaco empezó a elevarse. Esto pudo ser el supuesto resultado de la autólisis pero esta afirmación no puede ser confirmada ya que la actividad proteolítica fué muy baja.

GRAFICA #2

Curva del potencial redox, pH y actividad enzimática con respecto al tiempo y con variaciones en las velocidades de aereación y agitación



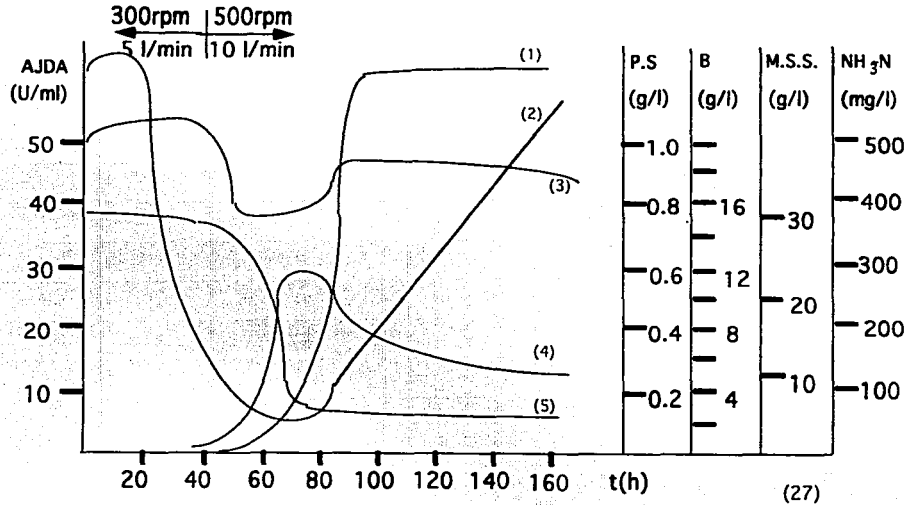
(1) ACTIVIDAD ENZIMATICA (AJDA)

(2) POTENCIAL REDOX (Eh)

(3) pH

(27)

GRAFICA 3
 Curva de materia seca, biomasa, actividad enzimática,
 materia seca soluble y nitrógeno de amonia
 con respecto al tiempo.



- (1) AJDA ; Actividad enzimática
- (2) NH₃-N : Nitrógeno de amonia
- (3) P.S. : Proteína soluble
- (4) B : Biomasa
- (5) M.S.S. : Materia seca soluble

El consumo de sustancias solubles comenzó después de 25-30 horas de incubación, y la biomasa se empezó a elevar lentamente. El Aspergillus niger comenzó a crecer rápidamente a partir de las 40 horas, que fué cuando la aereación y la agitación se elevaron. A las 50 horas apareció la actividad enzimática, y en el momento de máximo crecimiento microbiano, esta se empezó a incrementar continuamente. Después de el momento de máxima concentración de biomasa, se seguían produciendo enzimas por otras 20 horas.(27)

3.3. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y PRESENTACION.

La extracción de enzimas, así como de microorganismos ha sido utilizada desde hace muchos años. La primera enzima que se logró aislar fue la ureasa en 1926 por Summer, reconociendo así su naturaleza protéica. Para 1968 ya se habían reconocido alrededor de 1300 enzimas, la mayoría habían sido aisladas pocas veces y en pequeña cantidad (55).

Sin embargo, un estudio realizado en 1970 mostró que sólo 120 enzimas se anuncian en la literatura comercial. De éstas, 50 se encuentran disponibles en paquetes de 1 g. o menos, mientras que 35 se manejan en envases de 1 Kg. o más.

El aislamiento enzimático a nivel industrial se realiza casi en su mayoría para enzimas extracelulares, como es el caso de las pectinasas, ya que su aislamiento es mucho más sencillo que la operación de extracción de enzimas intracelulares. Esto se debe a que muchas veces las enzimas intracelulares presentan las mismas propiedades que otras enzimas y que otros

contaminantes. Además muchos microorganismos poseen paredes celulares fuertes y ésto dificulta más su extracción (57).

La extracción se refiere a la liberación de las enzimas de las células o de los constituyentes celulares. La extracción puede requerir procesos mecánicos, físicos o químicos.

Las técnicas existentes de aislamiento enzimático son muy variadas y complicadas por lo que nos limitaremos a mostrar la clasificación de éstos métodos y se explicará sólo en manera detallada aquéllos utilizados en el aislamiento de las pectinasas (15).

METODOS DE PURIFICACION ENZIMATICA

I. Precipitación

- Formando sales (con amoníaco o con sulfato de sodio).
- Con cambios bruscos de temperatura.
- Con cambios bruscos de pH.
- Con solventes orgánicos.
- Con polímeros de alto PM.
- Iones metálicos.
- Agentes específicos.
- Acarreadores.

II. Coagulación y Floculación.

- Hidrocoloides minerales.
- Hidrocoloides vegetales.
- Electrolito aniónico fuerte.
- Electrolito aniónico débil.
- Polielectrolito catiónico.

- Polímero no iónico.
 - Base fuerte.
- III. Centrifugación.
- Centrífuga tubular.
 - Centrífuga multicámaras.
 - Centrífuga tubular con discos.
 - Solid bowl scroll centrífuga.
 - Perforate bowl basket centrífuga.
 - Zonal centrífuga.
- IV. Filtración.
- Filtración Bater.
 - Tambor rotatorio.
 - Al vacío.
- V. Ultrafiltración.
- VI. Cromatografía.
- Por adsorción.
 - Interacción bioquímica.
 - Intercambio iónico.
 - Filtración en gel.
- VII. Electroforesis (6).

Hablando específicamente de las pectinasas, podemos decir que el método de extracción y purificación dependerá del método de fermentación utilizado (23).

Cuando las enzimas pectinolíticas son producidas en un cultivo sumergido, se requiere separar únicamente la masa celular por medio de filtración o centrifugación, seguido por la adición de conservadores. Cuando el

caso es un medio semi-sólido, las enzimas pueden ser extraídas, utilizando un sistema de extracción en contracorriente, utilizando agua y algunos conservadores. Este método produce una solución relativamente clara. Alternativamente, la masa semisólida puede ser secada a una temperatura baja. Este material seco puede ser utilizado como una preparación comercial cruda, o puede ser almacenada y extraer después las pectinasas (6).

Para llevar a cabo la extracción de las pectinasas, a partir de la solución clara anteriormente mencionada, puede llevarse a cabo una concentración en vacío o alternativamente se puede usar una sal (sulfato de amonio, sulfato de sodio, cloruro de sodio o fosfato ácido de amonio) o solventes orgánicos (isopropanol, acetona, etil acetato, metanol o etanol), pueden ser utilizados para la precipitación de la mezcla enzimática. Después de la precipitación, la mezcla enzimática es centrifugada o filtrada y después secada a bajas temperaturas o secado por esprea. Subsecuentemente, es molido a un tamaño de partícula standard y usado para la preparación de formulaciones enzimáticas comerciales (55).

El polvo resultante es vendido como un concentrado con una actividad específica o diluido con varios agentes para darles una actividad estándar. Algunos ejemplos de diluyentes son la gelatina, caseína, glucosa, sacarosa, lactosa, almidón y sales. En ocasiones se llega a usar buffers para mantener condiciones de pH adecuadas para la actividad enzimática (23).

A continuación se cita otro método muy utilizado para la extracción y purificación de las pectinasas: al cultivo se le adiciona una solución al 0.9% de NaCl y después se centrifuga. El supernadado se precipitó con etanol al 85%.

La mezcla enzimática se extrae, aísla y se concentra por medio de ultrafiltración con una membrana con poros de 20 a 25 nm. Después es secada con frío (42).

Una vez que la enzima es secada se empaqueta para poder ser comercializada.

Otro método de aislamiento, muy utilizado es el siguiente; el producto se filtra, el filtrado se coloca en un contenedor con movimiento giratorio, enchaquetado en donde circula una mezcla fría a base de etilén glicol, la cual asegura una temperatura de -18°C . Si el pH del producto es muy ácido, se adiciona lentamente una solución saturada de carbonato ácido de sodio (NaHCO_3) con un pH de 4. El líquido se agita adicionando lentamente 5% de alcohol etílico preenfriado a -20°C . Se centrifuga a 30,000 rev/min y se obtiene un precipitado protéico de color oscuro con escasa actividad enzimática. Sin embargo repletando la operación con alcohol etílico al 65% preenfriado, este procedimiento produce un precipitado liofilizado en forma de polvo con 90% del total de la actividad enzimática. El producto se conserva en la oscuridad a 5°C .

3.4. CONTROL DE CALIDAD.

Existen varios ensayos para evaluar la calidad de las pectinasas, las cuales varían en las condiciones estándar.

El principal factor de una enzima es su actividad la cual debe ser evaluada por el productor, el distribuidor y el consumidor. El método de ensayo de la actividad de la pectinasa debe proveerse por el fabricante o el distribuidor para que la interpretación de los resultados sean los mismos y no exista confusión en éstos (33).

A continuación se muestran algunos ejemplos de éstos.

CUADRO No. 10 Condiciones de Ensayo para Evaluar la Calidad de las

Pectinasas				
ENZIMA	TIEMPO DE REACCION	TEMPERATURA	pH	SUSTRATO
Pectinasa	120 - 180 min.	45°C	3.4-3.6	Jugo de manzana 100%
Pectinesterasa	>10 min	37°C	3.5	Pectina con alto contenido de
Poligalacturonasa	15 min.	30°	4.2	metoxilo 0.5% Polipectato de sodio 0.2%

(33)

CAPITULO IV APLICACIONES

4.1. PARAMETROS DE APLICACION

MECANISMO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA. El mecanismo de actividad enzimática está gobernada por tres parámetros que interactúan entre sí: concentración enzimática, temperatura y tiempo de reacción. La hábil utilización de este mecanismo permite adaptar la tecnología enzimática a muchos procesos de la industria alimentaria. Las reglas que se deben observar son las siguientes:

- a) Duplicando la concentración enzimática se logrará el mismo resultado en la mitad del tiempo y viceversa.
- b) Para la mayoría de las pectinasas, un incremento en la temperatura de 10°C aproximadamente duplica su actividad enzimática dentro de un rango de 10 a 50°C. Actualmente, existen pectinasas en el mercado capaces de actuar a temperaturas superiores a los 60°C y otras debajo de los 10°C.
- c) Existe una estrecha relación entre el tiempo de reacción y la temperatura; mientras más alta sea la temperatura, más rápido se agotará la actividad enzimática. Este principio tan importante es olvidado muy a menudo. También pueden acelerar la inactivación las condiciones poco favorables, como son el pH no favorable, contenido de polifenol alto, contenido de bióxido de azufre alto o la presencia de inhibidores en el sustrato (7).

En el cuadro siguiente se muestran los tiempos en los cuales las pectinasas permanecen activas en relación con la temperatura de procesamiento.

CUADRO No. 11 Tiempos de actividades de las Pectinasas a Diferentes

TEMPERATURA	Temperaturas	
	LAPSOS DE TIEMPO EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	
	Pectinasas	Pectinasas A.T.*
debajo 30°C (86°F)	Varios días	Varios días
40°C (104°F)	4 - 8 hrs.	8 - 16 hr
45°C (113°F)	2 - 4 hrs.	4 - 8 hrs
50°C (122°F)	1 - 2 hrs.	2 - 4 hrs.
55°C (131°F)	1/2 - 1 hrs.	1 - 2 hrs.
60°C (140°F)	pocos min.	1/2 - 1 hrs.

(15)

*Pectinasas A.T.: Pectinasas que tienen mayor resistencia a las temperaturas altas.

MECANISMO DE HIDROLISIS DE PECTINA. Este mecanismo se puede dividir en dos etapas:

- a) La disolución de la protopectina.
- b) La disolución de la pectina soluble.

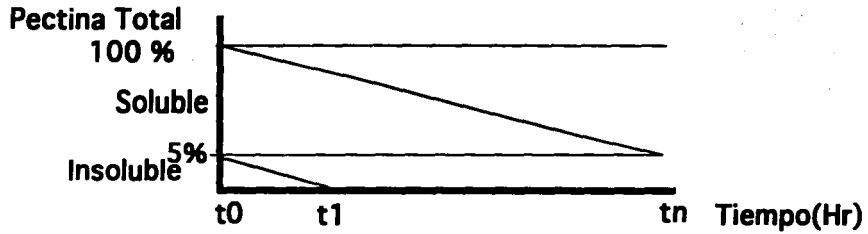
Esto puede ser ilustrado por medio de los tres casos generales que se presentan.

CASO 1. El sustrato está constituido por 5% de protopectina y 95% de pectina soluble. Este caso es típico en la depectinización del jugo de manzana.

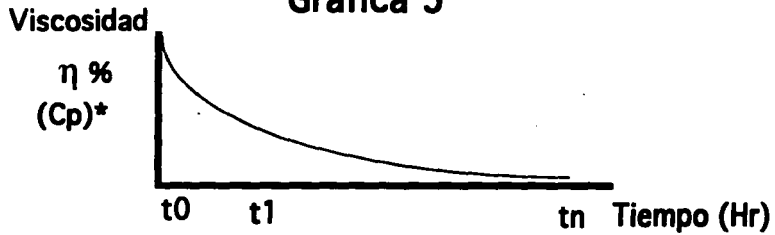
La pequeña cantidad de protopectina se disuelve rápidamente al tiempo t_1 , y se disuelve después junto con la pectina soluble (Gráfica 4). La curva que muestra el decremento de la viscosidad con el tiempo se muestra en la gráfica No.5.

Con el equipo de medición adecuado puede ser posible detectar una pequeña y lenta reducción de la viscosidad durante el primer período de tiempo de t_0 a t_1 , este retardamiento puede deberse a la disolución de la pequeña cantidad de protopectina presente.

Gráfica 4



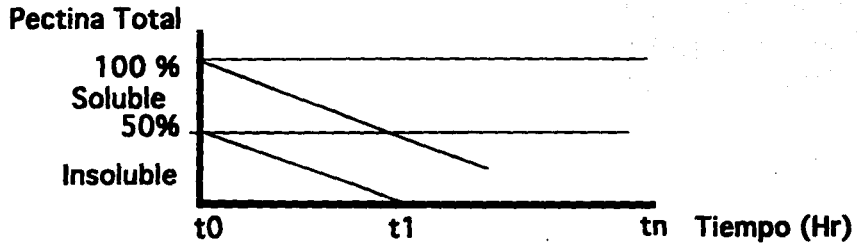
Gráfica 5



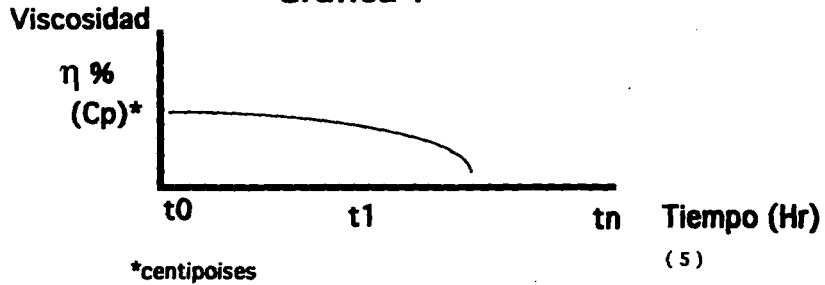
*centipoises

(5)

Gráfica 6



Gráfica 7



En el tiempo t_n , los pesos moleculares de las sustancias pécticas presentes se han reducido hasta un punto en el cual su contribución a la viscosidad es casi nula. Esto se muestra en la gráfica No. 5 (7). La curva de viscosidad se aproxima cada vez mas a la del agua.

CASO 2. Cuando el sustrato se compone de un 50% de protopectina y de un 50% de pectina solubilizada, como es el caso de la maceración de frutas difíciles de prensar.

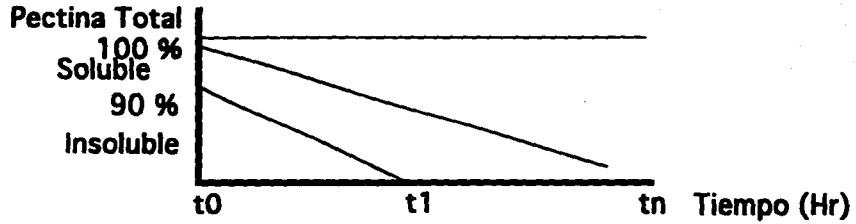
Durante el período de tiempo t_0 a t_1 se disuelve aproximadamente la misma cantidad de protopectina y pectina (gráfica. No. 6).

La concentración de pectina disuelta permanece constante durante este período de tiempo; la curva de viscosidad permanece más o menos horizontal en el tiempo t_1 . Cuando la protopectina se ha agotado la viscosidad empieza a disminuir gradualmente (gráfica. No.7).(7)

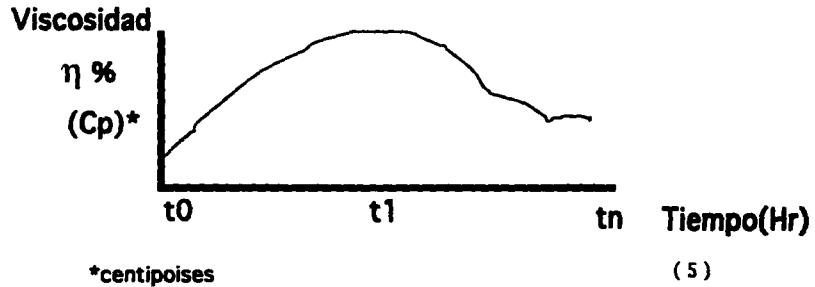
CASO 3. Cuando el sustrato contiene el 90% de protopectina y el 10% de pectina disuelta como es el caso de la maceración de las manzanas inmaduras.

Durante el lapso de tiempo t_0 a t_1 ocurre en mayor medida la disolución de la protopectina que la degradación de la pectina. En consecuencia, el nivel de la pectina disuelta se incrementa durante ese período de tiempo (gráfica No.8), y la viscosidad se incrementa (gráfica No.9). En el tiempo t_1 , después de que la mayor parte de la protopectina ha sido disuelta, comienza una nueva fase en la cual la cantidad de la pectina disuelta decrece gradualmente disminuyendo así su viscosidad(5).

Gráfica 8



Gráfica 9



4.2. MECANISMO DE CLARIFICACION.

El mecanismo de clarificación puede ser dividido en tres etapas:

- a) Hidrólisis enzimática.
- b) Coagulación.
- c) Sedimentación.

Cada etapa esta influenciada por la viscosidad. Los jugos extraídos de frutas frescas son en general sistemas coloidales estables, en donde su principal estabilizador es la pectina, el cual actúa a través de su viscosidad como un coloide protector, evitando que reaccionen las proteínas del jugo con los polifenoles para producir así una clarificación espontánea.

En la primera fase de la clarificación el sistema coloidal debe ser desestabilizado para proseguir con la segunda etapa. La desestabilización se puede llevar a cabo por la misma acción del jugo o por un adicinado comercial que contenga enzimas del tipo de endohidrolasas. La viscosidad debe descender hasta un punto en el cual no más del 5 al 10% de los enlaces glucosídicos de la pectina se encuentren rotos.

En la segunda etapa de la clarificación ocurre una floculación o coagulación de coloides suspendidos, junto con un rompimiento de la nube. Este proceso normalmente está reforzado por medio de la adición de agentes apropiados, teniendo cuidado de no adicionarlos al principio ya que una floculación forzada en un jugo insuficientemente depectinizado origina una clarificación incompleta.

Si el jugo ha recibido una pasteurización anterior a la segunda etapa, la clarificación espontánea no se presentará ya que el tratamiento térmico elimina algunas proteínas.

En la tercera etapa de la clarificación la velocidad de la sedimentación está determinada por el tamaño y la gravedad específica de las partículas. También determina la velocidad de sedimentación la viscosidad del fluido y

4.3. APLICACIONES DE LAS ENZIMAS PECTICAS EN LOS PROCESOS DE:

A. INDUSTRIA DE JUGOS.

Las primeras enzimas utilizadas en la industria de jugos de frutas fueron las enzimas pécticas para la clarificación de jugo de manzana. Fueron introducidas simultáneamente a Estados Unidos por Z.J. Kertesz y en Alemania por A. Mehlitz. Desde entonces el procesamiento de jugos y frutas se ha desarrollado en una industria de grandes avances tecnológicos. Las funciones de las enzimas pécticas han llegado a ser más especializadas que otras enzimas, tales como amilasas y celulasas, las cuales también forman una parte integral en la tecnología actual de jugos de frutas (7).

Las enzimas que tienen un uso más generalizado en la industria de jugos son las enzimas pécticas. Su sustrato, la pectina resulta ser un componente esencial en la estructura de la fruta, en donde junto con la hemicelulosa, se encarga de ligar las células para así formar un tejido. Durante el procesamiento del jugo, cuando el tejido de la planta es desintegrado, algunas pectinas se solubilizarán saturando el jugo, la pectina restante permanece en las paredes celulares. Las pectinas de algunas frutas, pueden dificultar el procesamiento o disminuir la calidad del jugo, por lo que en la mayoría de los casos es deseable disminuir la cantidad de pectinas o eliminarlas por completo (8).

Las enzimas pécticas son comunmente utilizadas para la producción de jugos de frutas y vegetales. Existen dos operaciones en las que se utilizan éstas:

- a) **Maceración.** Para lograr una licuefacción total o parcial de la pulpa de la fruta para la producción de néctares de fruta.
Para incrementar el rendimiento del jugo y mejorar la extracción de otros componentes de la fruta, tales como el color y el sabor.
- b) **Tratamiento del jugo.** Reducción de la viscosidad y facilidad en la operación de concentrado. Además de incrementar el rendimiento en las operaciones de clarificación, filtración y estabilización.(21)

Existen tres mecanismos esenciales que influyen en la aplicación de las enzimas pécticas, éstos son:

1. El mecanismo de actividad enzimática que está basado en la interacción de tres parámetros: concentración de la enzima, aplicación de temperatura y tiempo de reacción. Estos parámetros pueden ser variados con ciertos límites para adecuarse a las operaciones del proceso.
2. El mecanismo de la degradación de pectina depende del tipo de enzima utilizada y de la composición péctica del sustrato. Las enzimas pueden ser seleccionadas para atacar preferencialmente sobre sustancias pécticas específicas que se encuentran presentes. La composición propia del sustrato gobernará como la viscosidad incrementa o decrementa durante el tratamiento enzimático, dependiendo de la relación entre

pectina soluble y pectina insoluble. Una aplicación apropiada de estos factores es esencial para lograr el objetivo deseado (22).

3. El mecanismo de clarificación toma lugar en tres diferentes fases sucesivas: desestabilización, coagulación y sedimentación (24).

Actualmente la aplicación de las enzimas pécticas en el tratamiento de jugos puede ser utilizada para diferentes propósitos. Esto se debe a que existen muchas presentaciones comerciales de los jugos, debido a los diferentes gustos de los consumidores y a las posibilidades que ofrece cada fruta para su procesamiento.

En la última década, en muchos países europeos se ha practicado comúnmente la práctica de concentración de jugos turbios durante la estación corta de producción de frutas, dejando a la clarificación para ocasiones en donde se cuente con más tiempo. Sin embargo, la producción de jugos concentrados solamente es posible si el jugo es suficientemente depectinizado. Para lograr este estado, la depectinización tiene que ser llevada hasta un punto en donde la viscosidad del jugo alcance su valor mínimo. Para este propósito se deben romper entre 5 y el 10% de los enlaces glicosídicos (32).

Se utiliza un tratamiento similar en la producción de jugo de naranja concentrado. Se tiene que tener cuidado especial para no llegar a depectinizar demasiado ya que esto ocasionaría el deterioro de la estabilidad de la nube en el jugo rediluido. Esto puede ser prevenido utilizando una endopoligalacturonasa libre de ésteres.

En la clarificación de jugos, la pectina debe ser suficientemente degradada para no impedir la fase de coagulación de la clarificación. El sustrato péctico debe ser depolimerizado más allá del punto en donde el ensayo de

viscosidad sea inaplicable y cuando la prueba de alcohol nos dé una aproximación útil.

La estabilidad de un jugo clarificado para que no se lleve a cabo la formación de la nube es consecuencia de una depectinización eficiente, aunque en ocasiones las floculaciones pécticas pueden ser producidas durante el almacenamiento posterior a bajas temperaturas. Para solucionar este problema, se puede utilizar una dosis mayor de enzimas o también se puede llevar a cabo una reacción suplementaria después de terminada la sedimentación. Para lograr una protección completa hacia la formación de una nube se deberá degradar completamente a la pectina a ácido oligalacturónico.

La depectinización total es necesaria solamente cuando el jugo es destinado a la producción de licor, en donde el nivel relativamente alto de alcohol precipitará cualquier polímero péctico que contenga más de 510 residuos de ácido galacturónico.

Los métodos de clarificación mencionados anteriormente están basados en la hidrólisis pectínica utilizando pectinasas depolimerizantes (hidrolasas y llasas).

Una proposición diferente ha sido probada con el objetivo de remover la pectina a través de la floculación, utilizando únicamente una pectinesterasa no depolimerizante. El ácido péctico resultante es precipitado en forma de pectatos insolubles, y éste debe formar un sedimento de aspecto gelatinoso. La ventaja de éste método es que el jugo resultante retiene una proporción mayor que la inicial de polifenol (36).

En resumen, podemos decir que el grado de depectinización requerido en cualquier paso del proceso, varía de acuerdo al objetivo perseguido. Esto también se cumple para los demás coloides presentes en el sustrato, en el cual

la pectina es el más importante. En el caso del almidón, las enzimas necesarias han sido desarrolladas y pueden ser suministradas ya sea por separado o junto con las pectinasas.

Las proteínas son removidas generalmente por un tratamiento de bentonita, ya que la utilización de enzimas ha representado problemas que no han podido resolverse por completo. En el caso de las hemicelulasas contenidas en jugos de frutas, se ha hecho muy poco acerca de su identificación y cuantificación y por lo tanto no se han desarrollado enzimas específicas (49).

PROCESO PARA EL JUGO DE MANZANA. El esquema No. 8 , muestra un diagrama de flujo típico de una línea de procesamiento de jugos. Después de que las frutas han sido lavadas, almacenadas y escaldadas, son desintegradas en un molino y calentadas a la temperatura necesaria para el tratamiento enzimático de prensado. Esto puede ser llevado a cabo utilizando de 3 a 20 gr. de pectinasas por cada 100 Kg. de fruta, y de 0.2 a 2.0 gr. de celulasas por cada 100 Kg. de fruta. La temperatura óptima para el tratamiento enzimático de prensado de las manzanas es de 30°C (66).

El tratamiento de prensado también ayuda a romper a la pectina insoluble, la cual se presenta como partículas pequeñas de aspecto gelatinoso. Estas partículas obstaculizan la extracción del jugo de dos maneras; la primera, saturando el jugo, el cual no está disponible para el prensado; y la segunda, porque las partículas bloquean los canales del drenaje por los que el jugo debe de fluir. El tratamiento de prensado, se puede considerar terminado, cuando el jugo alcance el nivel de coloración deseado y cuando su viscosidad ha regresado al valor inicial o inclusive menor (al inicio de la reacción enzimática la viscosidad se incrementa debido a la solubilización de la pectina insoluble). La molienda de la manzana no debe ser llevada a una temperatura mayor de 30°C

debido a que esto puede destruir su estructura física, la cual es esencial para la operación de prensado.

Después de que la masa ha sido presionada, el aroma de los jugos es eliminado y el jugo se dirige hacia el tanque de clarificación. El jugo de manzana es centrifugado antes de pasar al tanque con el fin de lograr la separación de la mayor parte del almidón no gelificado.

La parte restante del almidón (aproximadamente un 5%) es gelificado en dicho tanque. La depectinización y clarificación de los jugos puede ser llevado a cabo a una temperatura de 20 a 25°C, utilizando normalmente de 1.5 a 3.0 gr. de pectinasas y de 0.5 a 2.0 gr. de amilasas por hectolitro de jugo. Se sabe que una temperatura más alta ofrece ventajas debido a que las enzimas en general, incluyendo a las pécticas, tienen mayor actividad a mayor temperatura. Sin embargo, el rango de temperatura entre 25 a 45°C debe ser evitado, ya que se crean condiciones ideales para el crecimiento de microorganismos, especialmente de levaduras (7).

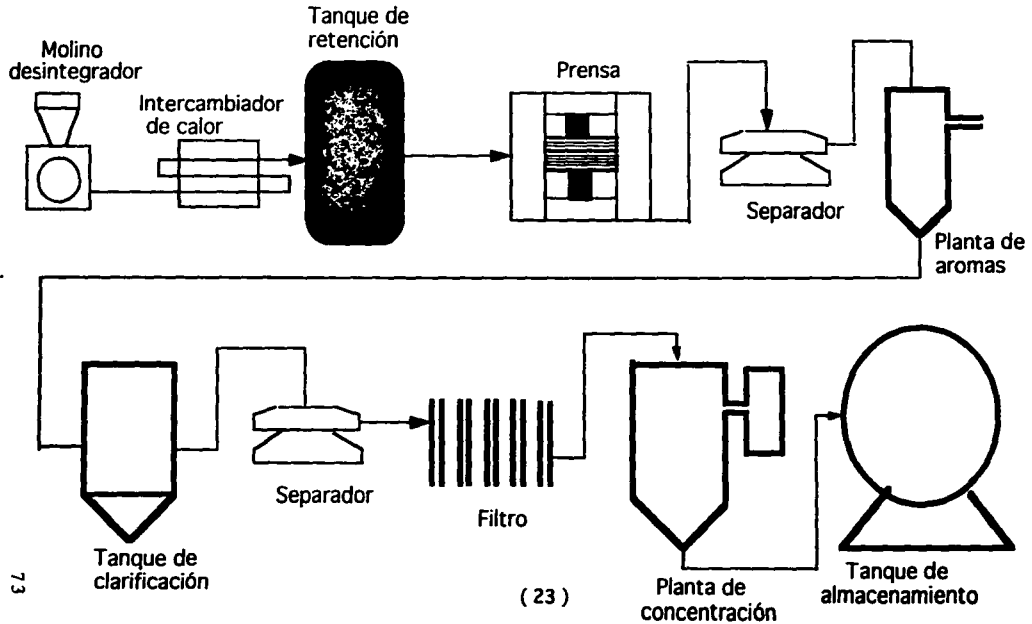
La depectinización produce dos efectos; la coagulación de la nube, la cual se estabiliza con pectina insoluble y rompe la viscosidad causando pectina soluble. Como mencionamos anteriormente, cuando los jugos de manzana están siendo procesados, el 5% del almidón gelificado restante debe ser hidrolizado por medio de una amiloglucosidasa.

Después de este proceso el jugo es separado por decantación, centrifugación y la filtración del precipitado final. Después se lleva a cabo la concentración en los casos deseados, seguida de la pasteurización y embotellado.

Cuando el consumidor acepta una ligera turbidez, el proceso sufre una variación; el jugo después del prensado es llevado directamente al tanque de

ESQUEMA #8

Diagrama de flujo de una línea de procesamiento de jugos



clarificación y las pectinas son hidrolizadas sólo hasta el punto requerido para la filtración (42).

Hace algunos años, un nuevo proceso originado de la industria de la remolacha de azúcar fue introducido, este proceso el cual se denomina extracción a contracorriente, la cual sustituye la operación unitaria de prensado.

Los jugos obtenidos por medio de éste proceso generalmente contienen menor cantidad de pectinas que las que se obtienen por medio del prensado y son depectinizados y clarificados de la misma manera.

La tendencia a futuro de la industria de jugos será la licuefacción de las frutas. El objetivo de éste método es el de macerar y desintegrar el tejido de la fruta con enzimas pécticas y otras enzimas que ayuden a separar por completo la parte sólida de la parte líquida. El producto final contendrá todos los componentes presentes de la fruta (35).

PROCESO PARA EL JUGO DE UVA: El jugo de uva blanco y su concentrado son producidos por métodos similares a los utilizados en el jugo de manzana. Las uvas son machacadas y escaldadas seguidas por una operación de preprensado con enzimas pécticas en el desjugador para incrementar el rendimiento. En este caso se debe utilizar de 1.6 a 5.0 gramos de pectinasa por cada 100 Kg. de fruta. Después de drenar el jugo, el prensado restante es reprensado. El jugo obtenido es depectinado en los tanques de clarificación, después es estabilizado, clarificado, centrifugado y/o filtrado, por último es pasteurizado, concentrado y embotellado.

Las uvas rojas tienen un contenido de pectina alto, lo que origina algunos problemas en el prensado. Este proceso y el escalado de las uvas rojas se realiza a temperaturas entre los 60 y 65°C donde se lleva a cabo una plasmólisis para acelerar la extracción del color y donde el prensado es tratado

con enzimas pécticas por aproximadamente de 0.5 a 1.0 horas para incrementar el rendimiento. En algunos casos el prensado es calentado antes a una temperatura de 80 a 82°C para destruir las oxidasas de la fruta y así prevenir la oxidación y pérdida de color. El jugo que fluye es drenado y el producto del prensado es reprensado. Tanto el jugo libre como el jugo del prensado son depectinizados con enzimas pécticas, si es necesario se realiza un acabado del jugo, estabilizado, centrifugado y/o filtrado y concentrado o embotellado (21).

B. PROCESOS DE LA INDUSTRIA CITRICA.

Las cuatro aplicaciones de las enzimas en la industria cítrica son: el lavado de la pulpa, disminuir la viscosidad del jugo de naranja, la preparación de formadores de nube naturales y la clarificación del jugo del limón (38).

LAVADO DE LA PULPA. Durante el procesamiento de las frutas cítricas se obtiene jugo, hollejo o cáscara y pulpa. La pulpa, la cual forma la cuarta parte del total de la fruta, contiene una cantidad de jugo considerable el cual no puede ser obtenido fácilmente por medio del prensado. Por este motivo se han desarrollado para obtener el jugo utilizando un proceso a contracorriente consistiendo de tres a cinco pasos utilizando agua. Las enzimas pécticas son utilizadas en este proceso, las cuales se adicionan a la pulpa antes de la extracción y así incrementar los sólidos lavables, además de disminuir la viscosidad de la pulpa, de manera que se logre obtener un concentrado de 60°Brix sin correr riesgos de gelificación.

El tratamiento de la pulpa puede ser llevado a cabo en un proceso continuo o un proceso batch.

CLARIFICACION DEL JUGO DE LIMON. El método tradicional de clarificación del jugo de limón involucra la protección de la descomposición microbiana utilizando de 1000-2000 mg. de dióxido de azufre por litro para

permitir que ocurra la autoclarificación. Dependiendo del pH del jugo y de su temperatura, esto puede tomar de 4 a 6 semanas. Este proceso requiere por lo tanto de una gran capacidad de almacenamiento.

Ultimamente se han desarrollado las enzimas pécticas que muestran un incremento en su actividad a valores de pH bajos (2.2-2.8) y que modifican la temperatura en el jugo del limón en un tiempo de 3 horas a temperatura ambiente.

Futuros desarrollos en la industria cítrica, parecen ser las enzimas que desaparecen el sabor amargo en el jugo de limón (65).

DISMINUCION DE LA VISCOSIDAD DEL JUGO DE NARANJA. El jugo de naranja preparado a partir de ciertos tipos de frutas, puede tener una alta viscosidad e inclusive llegar a gelificarse si el concentrado llega a tener más de 65°B. Este serio problema ha sido resuelto por medio del uso de enzimas pécticas, utilizando de 1.6 a 3.5 gr. por hectolitro del jugo. Sin embargo, debe mencionarse que esta aplicación de las enzimas pécticas es ilegal en algunos países como por ejemplo los Estados Unidos.

C. PREPARACION DE FORMADORES DE NUBES NATURALES.

Debido a que el uso de los aceites bromados y de los formadores de nubes artificiales en las bebidas cítricas ha sido prohibido en muchos países, existe una demanda por los formadores de nubes naturales adecuados originados de la misma fruta cítrica. Entre los métodos utilizados actualmente los más efectivos son los que utilizan las enzimas pécticas.

Se utiliza como materia prima la cáscara del cítrico junto con su pulpa, esta es molida hasta alcanzar un diámetro de partícula entre 3 a 5 mm. Después es mezclado con el agua en una proporción de 1:1 a 1:1.5, esta mezcla es calentada a una temperatura de 95°C para lograr destruir la pectinesterasa

contenida en la fruta y después enfriado a 50°C. Después se adicionan las enzimas pécticas y se dejan actuar.

Normalmente se utilizan 3.5 gr. de pectinasa por cada 100 Kg. de materia prima y se deja actuar por un lapso de 1 hora. Durante ese tiempo, las enzimas llevan a cabo una clase de maceración la cual permite la liberación de los materiales formadores de nube, tales como la celulosa, pectinas, hemicelulosas y organelos de los microorganismos. Este líquido es separado de los sólidos para ser pasteurizados y concentrados (23).

D. INDUSTRIA VITIVINICOLA.

Podemos definir al vino como un producto natural, el cual resulta de un gran número de reacciones bioquímicas, especialmente enzimáticas que suceden durante la maduración de las uvas, y continúan en la cosecha y a través de las fermentaciones alcohólica y maloláctica, la clarificación y aún después del embotellado.

La producción de jugo y vino de uva utiliza diferentes tecnologías con una misma meta, la extracción de compuestos importantes. En algunas ocasiones, la extracción de jugo se dificulta por la presencia de sustancias de alto peso molecular como la pectina y la hemicelulosa.

A pesar de que en la uva existen varias enzimas, estas se encuentran en cantidades tan pequeñas que su valor práctico resulta ser muy pequeño dado el corto tiempo que tienen para actuar en el procesamiento para obtener tanto vino como jugos. El objetivo de adicionar enzimas es el de complementar las actividades enzimáticas naturales presentes en el sustrato (9).

Durante la maceración u operación de prensado, se adicionan enzimas para obtener una buena extracción inicial de algunos constituyentes tales como

color y sabor. Otra razón para adicionar dichas enzimas al vino o al jugo es la de hidrolizar las sustancias solubles de alto peso molecular como los coloides, los cuales pueden estabilizar la turbidez y dificultar la clarificación y filtración del producto final.

La mayoría de estas reacciones se han dejado a la naturaleza y a los microorganismos presentes en las uvas. Pero la ciencia ha habilitado a los vitivinicultores a influenciar algunas reacciones en direcciones apropiadas con la ayuda de enzimas pécticas. Es de conocimiento general que los vinos, particularmente aquéllos de alta calidad, no pueden ser producidos y estabilizados en forma sencilla, de acuerdo con un esquema de producción preestablecido. Una evaluación subjetiva de la vendimia y de las características deseadas en el producto final es deseable y esto requiere de un monitoreo continuo al igual que una implementación de controles, decisiones de momento y mucha experiencia. El uso de enzimas pécticas hace esto particularmente posible. En principio existen dos diferentes aplicaciones de las pectinasas en el proceso de producción de vinos:

1. Tratamiento enzimático de las uvas prensadas para mejorar la producción y extracción, y
2. Tratamiento enzimático del jugo o el vino para facilitar su clarificación (12).

Existen dos tecnologías básicas utilizadas en la producción de vino tinto, la fermentación clásica con la piel de la uva y la termovinificación. En ambos procesos se puede implementar el uso de sustancias pécticas. A continuación se tratará de la implementación de pectinasas durante la fermentación clásica.

El tratamiento enzimático sobre las uvas prensadas tiene las siguientes ventajas:

- Mayor contenido en el mosto de: azúcares fermentables, componentes de sabor, ácidos minerales, etc.
- Fermentación rápida y menos turbulenta.
- Menor formación de espuma.
- Reducción importante del tiempo que se traduce en una extracción de color más rápida y mejor en el vino tinto.
- Facilidad de prensado.
- Incremento en la producción total.
- Clarificación más rápida y mejor.
- Filtración facilitada.
- Vinos con características de mejor bouquet y cuerpo con bajo contenido en taninos.
- Maduración rápida de vinos.
- Aumento en la cantidad de mosto de primera calidad y menos presionado en el vino blanco.
- Mejoramiento general en la calidad del vino.

Con el tratamiento enzimático se hará una mejor utilización del equipo de proceso, ahorrando tiempo y aumentando la capacidad de éste.

En primer término, durante el prensado de las uvas se logra una mayor extracción del azúcar si se utilizan enzimas. Esto se debe a que como el azúcar se concentra debajo de la piel de las uvas, las variedades ricas en pectina presentarán dificultad para la extracción del azúcar durante el prensado quedando así en el residuo. Con el tratamiento enzimático el azúcar es transferida completamente al mosto, dando como resultado un mayor rendimiento alcohólico. Lo mismo ocurre con los componentes que aportan el sabor.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

En cuanto al tratamiento enzimático durante la fermentación se presentan las siguientes ventajas:

- Remoción más rápida de las sustancias mucosas.
- Mejor clarificación y menos oxidación.
- Menor volumen de heces.
- Fermentación mejorada con espuma controlada.
- Clarificación más rápida y mejor después de la fermentación.
- Filtración más rápida.
- Intensificación y refinamiento del sabor, limpieza y auténtico bouquet.

La presencia de enzimas promueve una mejor fermentación eliminando la formación de ácidos volátiles, dando como resultado un incremento en el contenido alcohólico.

La fermentación es menos turbulenta sin prolongar el tiempo que tarda. La espuma que se forma es más fina y se desintegra fácilmente, por lo que los tanques de fermentación pueden ser llenados a un volumen mayor que cuando no se utiliza un tratamiento enzimático. Con el uso de enzimas se ha detectado un aumento en el volumen de fermentación de un 30 a 40%, y los riesgos de pérdidas por exceso de espuma en los tanques se ven considerablemente reducidos (64). Además, existe un menor incremento en la temperatura y prácticamente no existen interrupciones durante la fermentación debido al sobrecalentamiento.

La experiencia ha indicado que los vinos que provienen de mostos fermentados, son fácilmente clarificados después de la fermentación. El mejoramiento en la calidad del vino, especialmente en el bouquet, puede ser explicado por el hecho de que exista una remoción más eficiente de las

sustancias mucosas. Esta operación trae consigo algunas desventajas. Sin embargo, cuando las uvas trituradas son tratadas con enzimas, se puede incrementar el contenido en taninos y sustancias coloridas debido a una alta concentración de enzima, al tiempo de maceración y a la temperatura a la cual se lleve a cabo este proceso. En estos casos se deberán encontrar las condiciones óptimas de trabajo y mantenerlas durante el proceso (9).

El tratamiento enzimático del mosto no causa problemas y el bajo costo del tratamiento lo hace altamente económico. El uso de las pectinasas para el tratamiento del mosto es muy simple, inmediatamente después que el jugo ha sido separado se agrega el preparado enzimático en una dosis de 0.5 a 1 gramo por hectolitro de jugo.

En la práctica, lo más común es agregar las pectinasas pesadas al batch próximo a fermentar. Es necesario mezclar el contenido del tanque. En el caso en que la enzima se agregue al tanque lleno se requiere de un mezclado más riguroso. La dosis recomendada de enzimas puede ser ajustada de acuerdo con el contenido de pectina de mosto y al tiempo que se desee para remover las sustancias mucosas (40).

La reducción en el tiempo que tarda la fermentación de la piel de la uva es probablemente la ventaja más importante en cuanto al tratamiento enzimático. El tiempo de dicha fermentación se reduce de un 30 a un 50% del total.

Aumenta la extracción del color, en el caso del vino tinto, en los casos donde el tiempo de fermentación es disminuido. Cuando se utiliza un equipo especial como rototanes o fermentadores continuos, la capacidad de producción se ve aumentada considerablemente, por el uso de enzimas.

Para obtener realmente estas ventajas, resulta esencial mezclar el contenido del tanque en un mínimo de dos veces al día con el fin de mantener a

la enzima en contacto con el hollejo y de esta manera pueda efectuarse la extracción de las sustancias que proveen el color (40).

La extracción del color por medio de las pectinasas es lento inicialmente. Las sustancias mucosas que se encuentran debajo de la piel (esencialmente pectinas), las cuales deben ser descompuestas durante las primeras seis a ocho horas, una vez logrado esto, las sustancias colorantes podrán ser liberadas.

El tiempo de extracción es una desventaja en la producción de vino tinto, mientras que en la producción de vino blanco se incrementa el rendimiento mediante una maceración enzimática sin incremento de color. Los diferentes preparados enzimáticos dan rendimientos diferentes en cuanto a la máxima extracción del color. El rendimiento del preparado depende de la habilidad para liberar la pectina altamente esterificada y no modificada directamente de los sólidos, a esta habilidad se le llama actividad protopectinasa.

Cuando se ha utilizado un preparado enzimático adecuado en la fermentación de los hollejos, el resultado es un mejoramiento en la calidad del vino, debida al hecho de que las sustancias que proveen el aroma y el color pueden ser extraídas, mientras que al mismo tiempo se reduce el contenido de sustancias tánicas. Además la maduración de estos vinos es acelerada, de tal manera que en algunos casos se puede embotellar después de uno o dos meses. En general estos vinos llegan a ser más complacientes y placenteros al igual que con mejor cuerpo y bouquet (9).

En la práctica para el vino tinto, se agregan 2 gramos de preparado enzimático disueltos en agua por 100 Kg. de uvas maceradas. La cantidad total de enzima requerida por el batch en producción deberá ser añadida al tanque de fermentación lleno inmediatamente después que las uvas han sido maceradas. Para obtener una distribución óptima de las enzimas en el tanque,

es necesario mezclar lo mejor posible. Es recomendable que el mezclado se haga cada 12 horas.

Resulta esencial el drenar el líquido tan pronto como se haya alcanzado el color y la intensidad deseados. El factor determinante para suspender la fermentación en este caso es la indicación que da la aparición de las características de color e intensidad son las deseadas y no la medición de la densidad del mosto, como se hace convencionalmente. Esta medida se alcanzaría muy tarde, ya que aparecería una cantidad anormal de taninos, los cuales pueden provocar una serie de reacciones secundarias no deseables.

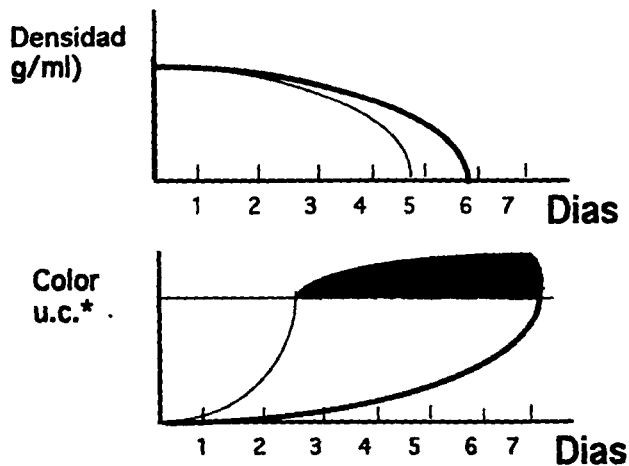
Es importante hacer un uso completo de las ventajas de una fermentación corta sobre los hollejos, para producir vinos de la más alta calidad (12).

En la siguiente gráfica (No.10) se muestran algunas mejoras por el uso de enzimas en el proceso de fabricación de vino tinto.

A continuación describiremos el tratamiento a seguir en el caso del vino blanco. En la práctica el tratamiento enzimático requiere de la inserción de un tanque de maceración entre la trituración y el prensado. La dosis de enzima utilizada en este caso es de 1 a 2 gramos de preparado enzimático por 100 kg. de uva triturada. Resulta mejor adicionar las pectininas disueltas en agua a una concentración del 1 al 2% a la tolva de la bomba de la trituradora. Si la enzima es agregada al tanque, se recomienda un buen mezclado con el fin de que la enzima sea distribuida homogéneamente. Se debe mantener la mezcla en el tanque de 2 a 4 horas, dependiendo de la temperatura, cuando son menores a los 15°C se deberá incrementar la dosis de enzima.

GRAFICA #10

Mejoras enzimáticas en el procesamiento del vino



■ Taninos no deseables

— Sin enzimas

- - Con enzimas

*unidades colorimetricas

(9)

TERMOVINIFICACION. Esta técnica representa una alternativa para la fermentación sobre el hollejo que provee los medios para aumentar la calidad del vino cuando para su fabricación se utilizan uvas parcialmente dañadas por la presencia de hongos.

Dependiendo de las características de la vendimia, la termovinificación se realiza con o sin calentamiento flash de las uvas maceradas. El tratamiento térmico conduce a la plasmólisis de las células rompiendo las membranas celulares e incrementando su permeabilidad, de tal manera que la velocidad de extracción de las sustancias celulares tales como azúcares, ácidos y componentes de aroma y color, se ve incrementada.

A continuación podemos mencionar algunas de las ventajas que tiene el uso de enzimas pécticas en la termovinificación:

- Extracción más rápida de componentes de aroma y sabor.
- Reducción del tiempo de calentamiento a 50°C y por lo tanto de la capacidad de separación del mosto.
- Incremento en el volumen del mosto libre.
- Incremento en la producción total.
- Facilidad en el prensado de las uvas.
- Clarificación más rápida y mejor.
- Menor formación de espuma durante la fermentación.
- Facilidad de filtración de los vinos.

Mientras mayor sea la cantidad de sustancias mucosas en las paredes celulares que puedan ser rotas, más rápida será la extracción y menor viscosidad del líquido utilizado por la extracción, el mosto. La solución liberada

de las sustancias mucosas por la inducción de la enzima, está formada principalmente por protopectina, e incrementa la cantidad de mosto en un 20%.

El incremento de viscosidad que provoca la pectina disuelta, inhibe la clarificación y produce problemas de formación de espuma, lo cual disminuye la capacidad de fermentación. Gracias a la degradación que sufre la pectina por el ataque enzimático se elimina este problema y se facilita la filtración de los vinos.

Los mejores resultados se han obtenido utilizando de 2 a 3 gramos del preparado enzimático por cada 100 Kg. de uvas prensadas. Si el valor de pH es menor a 3.2, se recomienda usar la dosis más alta. El tratamiento enzimático (0.5 a 4 horas) se detiene tan pronto como se alcance el color y la intensidad deseados (34).

E. MACERACION DE FRUTAS Y VEGETALES.

En la industria alimentaria la maceración se lleva a cabo por varias razones. En la mayoría de los casos se realiza con el objetivo de incrementar el rendimiento del jugo y para facilitar la extracción de las sustancias solubles celulares.

Actualmente, los conocimientos acerca de la estructura de las paredes celulares y de la naturaleza de las sustancias que forman parte de esta, son más exactos y al mismo tiempo más complicados. Los estudios realizados acerca de este tópico revelan que las enzimas pectolíticas solubilizan la protopectina que se encuentra en la pared celular liberando así los constituyentes celulares, la pectina solubilizada se va con el jugo incrementando así su viscosidad. Este método ayuda mucho en el caso de las frutas de esta especie (4).

Un caso diferente se presenta en las manzanas demasiado maduras. Aquí, la estructura de la pared celular ha sido alterada por las enzimas propias

de la fruta, teniendo así una estructura más suave en la que se encuentra el jugo atrapado. En estos casos se debe utilizar una enzima péctica soluble y así disminuir la viscosidad del jugo (46).

Como el objetivo de la licuefacción total o parcial del tejido de la fruta o verdura es la suspensión de células ilesas -como es el caso de los purés de bebé- se recomienda la hidrólisis enzimática de las membranas intracelulares.

Este proceso se lleva a cabo por medio de macerasas, las cuales son preparaciones enzimáticas específicas y contienen endopoligalacturonasas, enzimas proteolíticas y celulolíticas. Las sustancias pécticas atacadas por estas macerasas han sido clasificadas dentro del grupo de las protopectinas, las cuales son insolubles en agua en su estado original y poseen un grado de esterificación medio. Los productos finales obtenidos tienen alta viscosidad (75).

Una aplicación importante de esta tecnología es la producción de bases de néctares en donde se requiere adicionar el 50% de agua para reducir la viscosidad. La reducción de la viscosidad también se puede lograr utilizando una preparación enzimática que contenga pectinasas reductoras de la viscosidad. Esta técnica es utilizada actualmente por los productores de jugo de zanahoria de primera clase.

Existen técnicas alternativas para lograr el mismo objetivo, sin embargo, presentan algunas desventajas, como por ejemplo, el método térmico en donde se llegan a alterar las propiedades organolépticas del producto (7).

F. OTRAS APLICACIONES.

PRESERVACION DE LA MADERA. Una de las aplicaciones potenciales de las enzimas pécticas es el tratamiento de las coníferas comerciales. Al parecer, las enzimas pécticas provenientes de algunas bacterias logran aumentar la permeabilidad de la madera. Para mejorar este efecto, se

recomienda además utilizar amilasa y xilasa. La operación se lleva a cabo dentro de tanques inoculados de bacterias que sintetizan las enzimas mencionadas, durante 12 días.

La actividad pectínica más importante en este proceso es llevada a cabo por medio de la endopoligalacturonasa-llasa, producida por el *Bacillus subtilis* y el *Flavobacterium pectinovorum* (78).

ANÁLISIS QUÍMICOS. Existen algunas indicaciones de que las enzimas pectínicas serán en el futuro herramientas indispensables para el análisis de productos vegetales. Actualmente existen algunas marcas comerciales para este propósito tales como el PECTINOL 100.

Estas preparaciones enzimáticas han sido utilizadas para la evaluación del papel de los constituyentes pectínicos en el jugo de tomate, en el análisis de los tejidos de las manzanas, además de otros casos.

La principal dificultad en la aplicación de estas preparaciones enzimáticas es que no son suficientemente puras por lo que los resultados obtenidos no son muy confiables. Sin embargo, se realizan desarrollos para lograr enzimas puras y así lograr investigaciones más fidedignas (74).

FERMENTACION DEL TABACO, TE, CACAO Y CAFE. Esta actividad pectínica no está muy estudiada y existen muchas preguntas sin contestar acerca de este tema, sin embargo, lo citaremos ya que es muy interesante.

Después del secado, las hojas del tabaco son colocadas en montones y humedecidas hasta alcanzar un contenido de humedad de 20 - 25%, es entonces cuando se lleva a cabo la fermentación en la cual se alcanza una temperatura de hasta 158°F (70°C).

Al parecer las bacterias responsables de esta fermentación son del tipo de *E. coli*. Estas bacterias producen cambios importantes en los constituyentes

pécticos de las hojas del tabaco, las cuales son ricas de pectin metilesterasa. Aparentemente durante la fermentación la enzima mencionada es un importante producto, ya que esta enzima actúa sobre los ácidos pectínicos produciendo metanol. Esta mezcla de la enzima con el sustrato puede realizarse por una plasmólisis parcial debido a la exposición a las altas temperaturas. También durante la fermentación se presentan algunas hidrólisis de los constituyentes pécticos y como no existen enzimas pectolíticas en las hojas del tabaco probablemente ocurren debido a la presencia de enzimas bacterianas.

Después de que las vainas del cacao son recolectadas, las semillas son removidas y apiladas en cajas o canastas en las cuales se lleva a cabo la fermentación. Las semillas crudas son envueltas en una masa de pulpa blanca mucilaginosas, la cual debe ser removida. Los intentos que se han realizado con enzimas o microorganismos para que realicen este proceso no han tenido éxito.

La fermentación se lleva a cabo en 2 a 7 días durante los cuales la mayor parte de la pulpa se agota por lo que se piensa que existen microorganismos involucrados en este proceso. Se conoce que en este proceso se producen compuestos orgánicos como el ácido acético, el ácido láctico, el ácido butírico el etanol y algunos ésteres (3).

Existen numerosas preparaciones comerciales para la fermentación del café. Estas preparaciones contienen principalmente mezclas de enzimas pécticas y en ocasiones celulasas y hemicelulasas. Estas preparaciones comerciales no son muy utilizadas debido a razones comerciales. La mayoría de las industrias las utilizan exclusivamente durante los períodos pico o cuando la fermentación natural es demasiado lenta.

La fermentación se realiza con el objeto de remover el tejido que envuelve los frijoles del café (74).

4.4. INMOVILIZACION DE LAS ENZIMAS PECTICAS

Una enzima inmovilizada es aquella cuyo movimiento ha sido restringido de alguna manera.

La utilización de enzimas en procesos industriales presenta una serie de desventajas o limitantes tales como: el costo del aislamiento de la enzima, su inestabilidad y el hecho de que en su forma soluble libre sólo puede ser utilizada una sola vez. Por todo esto encontramos grandes ventajas en la utilización de la inmovilización enzimática en el procesamiento de alimentos, además de tener la posibilidad de reutilizar las enzimas, se logra un mayor control de la reacción enzimática evitándose así la contaminación del producto con restos enzimáticos.

Para lograr una adaptación exitosa de la inmovilización enzimática se tienen que considerar los siguientes puntos.

1. Costo. Como todo desarrollo tecnológico industrial, debe existir una ventaja económica en la adaptación de dicha tecnología. Con esto queremos decir que se debe disminuir el costo de producción, logrando una mejor calidad o el desarrollo de un nuevo producto.

2. Eficiencia de conversión. También es muy importante la eficiencia con la cual la enzima inmovilizada convierte el sustrato en el producto deseado.

3. Estabilidad. Cuando una enzima posee una estabilidad operacional pequeña, el incentivo para inmovilizarla es minimizado por el uso de la enzima en su forma soluble.

4. Estado del producto. En la determinación del éxito potencial de la inmovilización de una enzima se debe considerar que si el producto a fabricar es nuevo o si ya se había producido antes (28).

La inmovillización de las enzimas pécticas ha sido sugerida para la clarificación de varios jugos. La desventaja existente para la inmovillización de estas enzimas es que estas no son muy costosas y el proceso ha sido optimizado utilizando las enzimas en su forma soluble obteniendo magníficos resultados.

Se han llegado a realizar estudios acerca del efecto de la inmovillización de la endopoligalacturonasa del *A. niger*. En estos estudios la enzima fue covalentemente unida a metacrilato utilizando glicina, B alanina, ácido 4-aminobutanóico, glicil-glicina y ácido aminohexanóico como espaciadores.

La inmovillización de la enzima causó un decremento en su actividad siendo este decremento inversamente proporcional al tamaño de la cadena. Este hecho, además de los parámetros cinéticos aparentes de la enzima inmovilizada indicaron que el obstáculo estérico y probablemente los efectos de difusión son los responsables de decremento de la actividad enzimática (41).

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. La Biotecnología ofrece actualmente a la industria alimentaria un mejoramiento de sus procesos, costos y de sus productos terminados mediante la utilización de enzimas.
2. Las enzimas pectolíticas o pectinasas actúan sobre las sustancias pectínicas, constituyentes de algunas frutas, desintegrándolas, logrando así su desaparición en los casos en los que éstas no son deseadas.
3. El principal microorganismo productor de las pectinasas es el Aspergillus niger.
4. Mediante una fermentación sumergida, el Aspergillus niger producirá con alto rendimiento pectinasas utilizando un medio de cultivo constituido por pectina de manzana, sacarosa, suero, nitrato de amonio y sulfato de amonio.
5. La fermentación sumergida debe llevarse a cabo de preferencia en un sistema contínuo, ya que éste permite mantener un estado uniforme.
6. Para lograr una óptima utilización de las pectinasas se debe cumplir estrictamente con los parámetros de aplicación los cuales son: la concentración enzimática, la temperatura y el tiempo de reacción.
7. Las enzimas que tienen un uso más generalizado en la industria de jugos son las pectinasas. Durante el procesamiento del jugo, las pectinas de algunas frutas pueden dificultar el procesamiento o disminuir la calidad del jugo por lo que es necesario disminuir la cantidad de pectinas o eliminarlas por completo.

8. La industria vitivinícola requiere de las pectinasas para lograr extraer el jugo de la uva con un mayor rendimiento y para facilitar la clarificación del jugo extraído.
9. Otros sectores de la industria que se ven beneficiados por el uso de las pectinasas son: maceración de frutas y vegetales, preservación de la madera, fermentación del tabaco, té, cacao y café, y , análisis químicos. Además de existir otros que también las utilizan en una menor cantidad.
10. Actualmente no son fabricadas las pectinasas en México, por lo que éstas tienen que ser importadas de Europa y Estados Unidos principalmente.

BIBLIOGRAFIA

1. A.F. Langlykee, C.V. Smythe and D. Perlman.
Enzyme Technology 1982.
2. Aguilar, G. Huirón C.
Inst. Biomed., UNAM, Mexico City
Enzyme Microb. Technology 1986 8(9) 541-545
3. Arunga, O.R.
Cofee
Economic Microbiology
Vol. 7 259-274 1982.
4. Asal, Sadao
"Preparation of Pastes from Vegetables and Fruits Using Various
Enzymes".
Appl. 85/3, 105 1986.
5. Baum, F.
"Method and Equipment for Production of Pectolytic Enzymes".
German Democratic Republic Patent 145 027 1980.
6. Bauman, J.W.
"Enzymes and Food Procesing".
Applied Science Publishers
Ltd. London 1981.
7. Beveridge, T.
"Clarified Natural Apple Juice: Production and Storage Stability of Juice
and Concentrate".
J. of Food Science 50 (3) 453-470 1983.

8. Bock, W., Schawaller, J., Fleming
 "Continuous Enzymic Treatment of Pectic-containing Liquids".
 German Democratic Republic Patent
 D.D. 202, 620 1983.
9. Brown, W., Owgh, C.S.
 "A Comparison of Activity and Effects of Two Commercial Pectic Enzyme Preparations on White Grape Musts and Wines".
 American Journal of Enology and Viticulture 32 (5) 272-276 1981.
10. Bruce P. Wasserman
 "Thermostable Enzyme Production".
 Food Technology 78-88 1984.
11. Carlos Huitrón, C.A. Gilbón
 "Biotecnología de Enzimas".
 Inst. de Investigaciones Biomédicas pp. 37-52 1983.
12. Castiño, M., Bella P.
 "Pectolytic Enzymes in Red Wine Making".
 Revista de Viticulturae di Enología
 34 (5) 197-197 1981.
13. Chaga, S.
 "Maceration and the Protopectinase Activity of Moulds".
 J. of Food Science 18 136-147 1981.
14. Chopra, S., Menta, P.
 "Influence of Various Nitrogen and Carbon Sources on the Production of Pectolytic, Cellulolytic and Proteolytic Enzymes by *Aspergillus niger*".
 Folia Microbiol. (Prague) 30 (3), 117-25 1985.
15. Cooke, R., Ferber, C.

- "Purification and Characterization of Polygalacturonase from Commercial *A. niger* Preparation".
 Biochimica et Biophysica acta.
 Vol. 452, pag. 440-451 1986.
16. Directorio de la Industria Alimentaria de la República Mexicana.
 3a. edición, 1986.
17. Dongowski, G., Bockw
 "Preparation of Substantially Polygalacturonase - free Pectinesterase
 Preparation".
 Nahrung 30 (10) 1057- 1059 1986.
18. Ed Wiley
 "Fermentation and Ezyme Technology".
 New York 1979.
19. Elias, A.N., Foda, M.S., Attia, L.A.
 "Formation of Extracellular Polygalacturonase and Pectin
 Methylesterase Activities by Fungi and Yeasts".
 Egythian Journal of Microbiology
 Vol. 18 225-228 1983.
20. Endo Akira
 "Studies in Pectolytic Enzymes of Moulds Part VIII".
 Agr. Biol. Chem. 28 535-542 1984.
21. Fan Yung
 "Clarification of Blended Fruit Juices".
 J. of Food Science 3, 105-106 1983.
22. Fan Yung, a.f., Dobroskok, L.P.
 "Enzymic Clarification of Apple Juice".

- J. of Food Science 8, 250-261 1984.
23. Fogarty, W.M. and Kelly, C.T.
"Microbial Enzymes and Biotechnology".
Applied Science.
 24. Frank M., Rombouts and Walter Pilnik.
Economic Microbiology, Vol. 5. "Microbial Enzymes and Bioconvertors".
Academic Press 1980.
 25. Friedrich J., Cimmerman A., Humski-Pavlovic L.
"Comparison of Screening Test and Fermentation Test for the Selection of
Pectolytic *A. niger* Strain".
Prehrambeno.-Technol.-Biotechnol. Rev. 24, 159-162 1986.
 26. Friedrich J., Cimmerman A., Steiner Walter.
"Production of Pectolytic Enzymes by *Aspergillus niger*; Effect of Inoculum
Size and Potassium Hexacyanoferrate II-trihydrate".
Appl. Microbiol. Biotechnol. 33(4), 377-81 1990.
 27. Friedrich J., Cimmerman A., Steiner Walter.
"Submerged Production of Pectolytic Enzymes by *Aspergillus niger*: Effect
of Different Aeration/Agitation Regimes".
Appl. Microbiol. Biotechnol. 31, 490-494 1989.
 28. Friese Elke et al.
"Improved Manufacture of Pectinolytic Enzymes with Immobilized Fungi".
Akademie der Wissen Shaften der DDR.
DD 246, 316 1986.
 29. Gavrilova, N.N.
"Biosynthesis of Pectolytic Enzymes by the Immobilized Mold Fungus
Aspergillus niger".

- Deposited Doc. VINITI 4054-82 1982.
30. G. Beldman, F.M., Rombouts, A.G.J., Voragen.
"Application of Cellulase and Pectinase from Fungal Origin for the
Licuefaction and Saccharification of Biomass".
Enzyme Microb. Tech. Vol. 6 1402-17 1984.
 31. Gierschener, K.
"Pectin and Pectic Enzymes in Fruit and Vegetable Technology".
Gordia 81 (718) 171-176 1981.
 32. Greshner, K., Valet, R., Endress, H.V.
"New facts in the Theory and Practice of Fruit Juice Clarification and
Fining."
Flasiges Obst. 49(10) 574-582 1982.
 33. Godfrey, T., Reichelt, V.
"Pectic Enzymes Technology in Wine Making".
Food Industries of South Africa.
35 (5) 50-56 1982.
 34. Godfrey, T., Reichelt.
"Industrial Enzyme. The Application of Enzymes in Industry".
Ed. The Nature Press 1982
 35. Gortges, S., Dickmann, H.
"Prevention of Cloudiness in Apple Juices".
Flasiges obst. 49(10) 562-68 1982.
 36. Gramp, E.
"Preparation of Apple Juice Concentrates; Immediate Clarification of
Intermediate Storage".
J. Food Science 17(6) 12-13 1984.

37. Gutcho Sidney
"Microbial Enzyme Production".
Noyes Data Corporation
Park Ridge, New Jersey 1984.
38. Hasselberger
"Use of Enzymes and Immobilized Enzymes".
Nelson-Hall, Chicago 1982.
39. Harris, J., Dennis, C.
"Heat Stability of Fungal Pectolytic Enzymes".
Journal of Science and Food Agriculture.
33 781/791 1983.
40. Haupt, W.
"Pectolytic Enzymes in Wine Making".
Weinwirtschaft 117(34) 1014-1017 1981.
41. Heinrichova and Rexova
"Effect of Immobilization of *A. niger* Extracellular Endo D-galacturonase on
Kinetics and Action Pattern".
Carbohydrate Research, 98 115-22 1984.
42. Hemfort, H., Bott, E., Lehmann, H.
"Examples of Modern Separation and Clarification Methods Used in the
Treatment of Liquid Food Products".
J. of Food Science 37(20) 590-603 1983.
43. Henley, J.
"Cider Making".
Breuer 69 (827) 357-61 1984.
44. Henry Delincee

- "Characterization of Fungal Pectinase by Thin Layer Isoelectric Focusing and Gel Filtration".**
Journal of Food Biochemistry 2, 71-85 1987.
45. **Herbert, D.**
"A Theoretical Analysis of Continuous Culture Systems, Continuous Culture of Microorganisms".
Society of Chemical Industries (S.C.I.)
Monograph No. 12 21-53 1985.
46. **Herbert O. Hultin**
"Current and Potential Uses of Immobilized Enzymes".
Food Technology 7, 66-82 1987.
47. **Hermesdörfer H., Jelke E.**
"Production of Pectinolytic Enzymes by *A. niger* in Submerged Culture".
Z. Allg. Mikrobiol. 24 413-424 1984.
48. **Hornecka, Danuta et al**
"Effect of Various Methods of Storage on Enzyme Biosynthesis by Filamentous Fungi".
Microbiol. Tech. Biochem. 39, 101-110 1985.
49. **I. Szajer, Cz. Szajer.**
"Clarification of Apple Juices by Pectin Lyase".
Biotechnology Letters Vol. 4 No. 9 553-556 1982.
50. **Jane E. Harris and Colin Denis**
"Heat Stability of Fungal Pectolytic Enzymes".
J. Sci. Food Agri. 33, 781-791 1983.
51. **Jeann C. Johnson**
"Industrial Enzymes - Recent Advances"

- Noyes Data Corp. 1987.
52. J.F. Thibault and C. Mercier.
"Aspergillus Niger Endopolygalacturonase, Characterization and Some Properties".
Journal of Food Biochemistry 2 379-393 1978.
53. John F. Kennedy
Biotechnology Volume 7a
Enzyme Technology
N.Y., Cambridge 1987.
54. Johns, F.D. and Rand
"Enzymes in Food and Beverage Processing".
Ed. R.L. Ory and A.J. Angelo, Series No. 47 1988.
55. John R. Whitaker
"Pectic Substances, Pectic Enzymes and Haze Formation in Fruit Juices".
Enzyme Microb. Technol. Vol. 6 341-349 1984.
56. Joseph Willson
"Use of Sugars and other Carbohydrates in the Food Industry".
American Chemistry Society 1985.
57. Keller, S., Jen J., Bruner, J.
"Purification of Commercial Pectinase by Hydrophobia Chromatography"
J. of Food Science 47(6) 472-481 1989.
58. Kertesz, Z.I.
"The Pectic Substances".
Interscience Publishing, N.Y. 1981
59. Kvetoslava Heinrichova

- "Purification, Characterization and Mode of Effect of Another D-galacturonase from *A.niger*".
Collection of Czechoslovak chemical communications 1985.
60. L. Tuttobelo.
"Variazioni dell'attivita' Pectollica con *A. niger* Incubato a Diverse Temperature".
Estratto dal Vol. LII (1976) fascicolo 18 del Bolletino della societa' Italiana di Biologia Sperimentale.
61. L-Flexová Benkova.
"Isolation of Extracellular Pectolytic Enzymes Produced by *Aspergillus niger*".
Congress of Biochemistry N.Y. 1984.
62. Maldonado, M.C., Navarro, A.
"Production of Pectinases by *Aspergillus* sp. Using Different Pretreated Lemon Peel as the Carbon Source".
Biotechnology Letters 8(7) 501-504 1986.
63. Merek, Eke et al
"Pectinolytic Enzyme Preparation with Immobilized Fungi".
Akademie der Wissenschaften der DDR.
Appl. 293, 510 1986.
64. Meier, W.
"Potential Application of Pectolytic Enzymes in Wine Making".
Vinohrad 22(7) 161-167 1984.
65. Menge, M., Letz, M.
"Process for Clarification of Fruit Juices".
German Democratic Republic Patent 145, 500 1983.

66. Meurens, M.
 "Pectic Substances in Apple Juice Technology".
 Revue des Fermentations et des Industries alimentaires
 33 (2) 35-43 1985.
67. Mill, P.J., Tutobello, R.
 "The Pectic Enzymes of *A. niger* Endopolygalacturonase".
 Biochemistry Journal. 79 57,64 1981.
68. Park, Yoon Joong
 "Production of Endopolygalacturonase of a Mutant of *A. niger*".
 Nongop Kisol, Yongu Pogo 1985, 12(2) 324-32.
69. Pilnik, W., Rombouts, F.M.
 "Enzymes and Food Processing".
 Applied Science Publishing, Ltd. London 1984.
70. Pitcher Wayne H.
 "Genetic Modification of Enzymes Used in Food Processing".
 Food Technology Vol. 7 321-29, 1986.
71. Prelssey N.
 "Properties of *A. niger*".
 Enzyme Microbiology Tech. Vol. 8 147-56 1983.
72. Raper, K.B., Fenneil, D.I.
 "The Genus *Aspergillus*".
 Ed. Robert E. Krieger Publishing Co.
 New York 1981.
73. Reporte de la Secretaría de Gobernación y Fomento Industrial
 "Dirección General de Estadística Sectorial e Informática".
74. Rombouts, Frank and pilnik Walter

- "Economic Microbiology Vol. 5 Microbial Enzymes and Bioconversions".
Academic Press, N.Y. 1985
75. Schmitt, Reinhard et al
"Liquefying Vegetable and Fruit Mashers and Juices".
Ger offen D.E. 3, 221, 576 1983.
76. Steven Nagy
"Citrus and Science Technology".
Volume 1
The AVI Publishing Company Inc. 1984.
77. S. Saval, Huitron C.
"Microbial Pectinases from Henequen Pulp".
Development in Industrial Microbiology
24, 547-551 1983.
78. Tanaka, Toshiaki et al
"Treatment of Wood with Pectinase"
Jpn Kokai Tokyo Koho JP 60, 225, 710 1984
79. Tempest, D.W.
"The Continuous Culture of Microorganisms".
Vol. 2 Methods in Microbiology
Academic Press, N.Y. p. 259 1985
80. Thom and Raper
"Manual of the Aspergilli".
Williams and Willnicks 1985.
81. Tutobello R., Mill P.J.
"The Pectic Enzymes of Aspergillus niger"
Biochem J. 79, 51-57 1981.

82. Underkofler, L.A.
"Industrial Fermentations".
Chemical Publishing 1986.
83. Witaker, John R.
"Pectic Substances, Pectic Enzymes".
Enzyme Microbiology Tech. Vol. 6 1984
84. Witaker, John R.
"Principles of Enzymology for the Food Sciences".
Marcel Dekker Inc. N.Y. 1986.
85. W. Janda
86. Wardsack Christine et al
"Production of Pectolytic Enzyme Mixture by Support Fixed
Microorganisms".
Akademie der Wissenschaften der DDR.
Ger (East) D.D. 201, 149 1983.
87. Wardsack Christine et al
"Pectinolytic Enzymes"
Akademie der Wissenschaften der DDR.
Ger (East) D.D. 211, 808
88. Yildiz Fatih et al
"Production of Pectinases by *A. niger*"
Doga Diln Derg, Seri D2 9(1) 88-94 1985.
89. Z. Berk
"Introducción a la Bioquímica de los Alimentos".
Ed. El Manual Moderno, S.A.
México, D.F. 1980.