

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

ESTUDIO DE DOS

PROCESOS BIOTECNOLOGICOS ALTERNATIVOS

PARA EL APROVECHAMIENTO

DEL ORUJO DE MANZANA:

ENRIQUECIMIENTO PROTEICO Y

PRODUCCION DE ENZIMAS PECTOLITICAS.

N° 830 (1)

ROQUE ALBERTO HOURS

TESIS

1988



Don.: Autor  
Fecha: 28-III-88  
Inv. E: 72756  
53.198.

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Doctor Rodolfo J. Ertola.

a mi Madre

a mi Padre

## Mi reconocimiento

al Dr. Rodolfo J. Ertola por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales.

a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por haberme permitido el uso de sus equipos e instalaciones.

al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de sucesivas becas que permitieron la realización del presente trabajo.

al Programa Nacional de Biotecnología de la Secretaría de Ciencia y Técnica por el apoyo económico brindado a estos estudios.

## Mi agradecimiento

al Dr. Rodolfo J. Ertola por haberme brindado la posibilidad de iniciarme en la investigación científica, por su dirección y por su estímulo permanente.

al Dr. Claudio E. Voget por su valiosa colaboración y asesoramiento permanente para el desarrollo del presente trabajo.

al Dr. Alberto E. Massucco por su intervención en el capítulo 2.

a la Lic. Mirta M. Faloci por la realización de las electroforesis de pectinasas.

al Sr. Carlos A. Castro por la construcción del dosificador de sustratos pastosos.

al resto del personal del CINDEFI.

# INDICE

Página

## INTRODUCCION

- Definición y concepto de Biotecnología. . . . .	1
- El problema de los residuos industriales. . . . .	2
- El ejemplo del orujo de manzana. . . . .	5
- Objetivos del trabajo. . . . .	7
- Referencias. . . . .	9

## CAPITULO 1: EL ORUJO DE MANZANA

1.1. Introducción. . . . .	11
1.2. Algunas estadísticas. . . . .	11
1.3. Evolución del cultivo e industrialización de la manzana. . . . .	12
1.4. El orujo de manzana. . . . .	14
1.4.1. Producción del orujo de manzana. . . . .	14
1.4.2. Aprovechamiento del orujo de manzana. . . . .	15
1.4.3. Composición del orujo de manzana . . . . .	19
1.5. Referencias. . . . .	22

## CAPITULO 2: ENRIQUECIMIENTO PROTEICO DEL ORUJO DE MANZANA

2.1. Introducción. . . . .	25
2.2. Materiales y métodos. . . . .	31
2.2.1. Microorganismos e inóculos. . . . .	31
2.2.2. Medios de cultivo. . . . .	32
2.2.3. Técnicas analíticas. . . . .	33
2.2.4. Desarrollo de procesos fermentativos. . . . .	34
2.3. Resultados y discusión. . . . .	37
2.3.1. Ensayos en sistema de cultivo discontinuo. . . . .	37
2.3.2. Ensayos en sistema de cultivo discontinuo con alimentación controlada. . . . .	41
2.4. Conclusiones. . . . .	46
2.5. Referencias. . . . .	48

## CAPITULO 3: FERMENTACION DE SUSTRATOS SOLIDOS

3.1. Introducción. . . . .	51
3.2. Distintos ejemplos de fermentación de sustratos sólidos. . . . .	53
3.3. Aplicaciones industriales de la fermentación de sustratos sólidos. . . . .	55
3.3.1. Producción de enzimas. . . . .	55
3.3.1.1. Amilasas. . . . .	55
3.3.1.2. Celulasas. . . . .	56
3.3.1.3. Otras enzimas. . . . .	57
3.3.2. Producción de metabolitos. . . . .	57
3.4. Características del crecimiento fúngico sobre sustratos sólidos. . . . .	58
3.5. Problemas difusionales en la fermentación de sustratos sólidos. . . . .	60
3.5.1. Transferencia de materia. . . . .	60
3.5.1.1. Transferencia de materia entre partículas. . . . .	60
3.5.1.2. Transferencia de materia dentro de las partículas. . . . .	60
3.5.2. Transferencia de calor. . . . .	61
3.6. Reactores empleados en la fermentación de sustratos sólidos. . . . .	62
3.7. Conclusiones. . . . .	65
3.8. Referencias. . . . .	67

## CAPITULO 4: PRODUCCION DE ENZIMAS PECTOLITICAS

4.1. Introducción.. . . . .	71
4.2. Sustancias pécticas. . . . .	73
4.2.1. Generalidades y definiciones.. . . . .	73
4.2.2. Estructura y composición.. . . . .	75
4.2.3. Propiedades y características. . . . .	76
4.2.4. Cambios en la composición química de las sustancias pécticas en los vegetales.. . . . .	77
4.3. Enzimas pectolíticas.. . . . .	79
4.3.1. Generalidades. . . . .	79
4.3.2. Clasificación. . . . .	79
4.3.3. Distribución en la naturaleza. . . . .	82
4.3.4. Propiedades de los distintos tipos de pectinasas.83	
4.3.4.1. Pectin esterasas.. . . . .	83
4.3.4.2. Polimetilgalacturonasas. . . . .	86
4.3.4.3. Polimetilgalacturonatoliasas.. . . . .	86
4.3.4.4. Poligalacturonasas.. . . . .	87
4.3.4.5. Poligalacturonatoliasas. . . . .	92
4.3.5. Producción industrial. . . . .	94
4.3.5.1. Selección de microorganismos.. . . . .	94
4.3.5.2. Sistemas de producción.. . . . .	95
4.3.6. Aplicaciones.. . . . .	97
4.3.6.1. Procesamiento de frutas. . . . .	97
4.3.6.2. Clarificación de jugos de frutas.. . . . .	97
4.3.6.3. Clarificación de vinos.. . . . .	99
4.3.6.4. Otras aplicaciones.. . . . .	99
4.4. Materiales y métodos.. . . . .	101
4.4.1. Microorganismos e inóculos.. . . . .	101
4.4.2. Medios de cultivo. . . . .	102
4.4.2.1. Materias primas. . . . .	102
4.4.2.2. Composición de los medios de cultivo.. . . . .	102
4.4.3. Desarrollo de los procesos fermentativos.. . . . .	103
4.4.4. Procedimientos analíticos. . . . .	104
4.4.4.1. Técnicas analíticas empleadas con el orujo de manzana. . . . .	104
4.4.4.2. Analítica de los procesos fermentativos. . . . .	104
4.4.4.3. Medida y caracterización de la actividad enzimática.. . . . .	106
4.4.4.4. Ensayos de clarificación de jugo de manzana.107	
4.5. Resultados y discusión.. . . . .	108
4.5.1. Descripción de un experimento típico.. . . . .	108
4.5.2. Influencia de la fuente de nitrógeno.. . . . .	110
4.5.3. Influencia del inóculo.. . . . .	111
4.5.4. Influencia de la temperatura.. . . . .	113
4.5.5. Influencia del tipo de orujo de manzana. . . . .	113
4.5.6. Influencia de la composición del medio de cultivo.. . . . .	116
4.5.7. Influencia del sistema de cultivo. . . . .	118
4.5.8. Influencia del secado del orujo de manzana.. . . . .	119
4.5.9. Caracterización del pool enzimático. . . . .	120
4.5.10. Ensayos de clarificación. . . . .	124
4.6. Conclusiones.. . . . .	126
4.7. Referencias. . . . .	127

## INTRODUCCION

### DEFINICION Y CONCEPTO DE BIOTECNOLOGIA

La Biotecnología es una actividad científica multidisciplinaria que ha adquirido una importancia fundamental en el mundo moderno. Por la amplitud de las áreas que abarca y por las diferentes posibilidades que ofrece en distintos ámbitos del quehacer del hombre, se ha convertido ya en uno de los pilares políticos y económicos más trascendentes para el progreso de los países.

Una definición apropiada de Biotecnología, suficientemente amplia, que delimita sus campos de aplicación y que además está ganando aceptación general en la mayor parte de los países, es la propuesta por la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) que la define como:

"La aplicación de los principios científicos y de la Ingeniería al procesamiento de materiales por agentes biológicos para proveer bienes y servicios" (Anónimo, 1985).

Los "principios científicos y de la Ingeniería" se refieren a un conjunto muy amplio de disciplinas con especial énfasis en la Microbiología, Bioquímica, Biología molecular, Genética, Inmunología e Ingenierías Química y Bioquímica.

El concepto de "agentes biológicos" se refiere en general a catalizadores biológicos, particularmente microorganismos, células animales y vegetales, virus y enzimas.

Por otra parte, el término "materiales" es muy amplio ya que cubre tanto a los de origen orgánico como a los inorgánicos.

En la definición se incluyen no solamente los procesos en los cuales se utilizan los agentes biológicos sino también a todas aquellas etapas relacionadas con la elaboración de estos últimos y al procesamiento de los materiales resultantes en el caso de que sean de naturaleza biológica.

Por "bienes" se entienden todos los productos de las industrias



vinculadas con alimentos, bebidas, productos químicos, bioquímicos y farmacéuticos, recuperación de minerales y de petróleo, etc., que hacen uso de los citados agentes biológicos.

Los "servicios" se relacionan sobre todo con aspectos vinculados a la contaminación ambiental, particularmente con la purificación del agua y el tratamiento de efluentes líquidos y sólidos cuyo origen puede encontrarse tanto en procesos industriales como en otros aspectos vinculados a la actividad del hombre. Es así que los problemas de contaminación del medio ambiente derivados de la disposición final de muchos residuos industriales pueden encontrar en la Biotecnología soluciones apropiadas.

### EL PROBLEMA DE LOS RESIDUOS INDUSTRIALES

Desde el principio de la década de 1970 se ha venido modificando considerablemente la actitud de los gobiernos y de la industria en lo que respecta al control y a la eliminación de los desechos. La preocupación general por este problema llevó inicialmente a los organismos oficiales a tratar de regular las descargas mediante la aplicación de un sistema de reglamentaciones y autorizaciones más estricto. En muchos casos, las nuevas restricciones dieron lugar a la aparición de prácticas de "tratamientos a la salida" de las plantas industriales, basados en la idea de que los procesos básicos de producción no podrían ser modificados, recurriéndose así a interponer dispositivos de depuración con el fin de disminuir las descargas finales. Este es el primer caso en que la Biotecnología aplicada al tratamiento de efluentes industriales contribuye a la preservación del medio ambiente.

Sin embargo, en muchas oportunidades los costos de los tratamientos, o sea la inversión de capital en equipos y su funcionamiento, ponían en peligro a la economía de las empresas que pasaban un época crítica debido al aumento del costo de la

energía, en razón de que se incrementaban cuanto más estrictas eran las medidas de control introducidas.

Como respuesta, la industria encaró otros medios para mejorar la situación. Estos se basaron en una mayor optimización en el uso de las materias primas a fin de reducir los desechos finales. Se trataba pues de seguir aplicando sistemas de lucha contra la contaminación, pero también de idear al mismo tiempo medios apropiados para evitar que se formaran residuos contaminantes que luego habría que tratar. Sin embargo, en muchos casos y aún con esta premisa, el problema no se resolvía.

Generalmente, y aunque se empleen las más sofisticadas tecnologías, los procesos de fabricación tienden a la producción de residuos ya que es difícil conseguir la transformación total de un material en otro que sea el producto final deseado. El problema está entonces en encontrar una posible utilización de esos residuos, en particular cuando la cantidad generada es de magnitud comparable a la de las materias primas y/o los productos finales. Por ello es que la industria moderna, sobre todo en los países desarrollados, ha conseguido aumentar enormemente las formas de utilización de residuos con el consiguiente aumento en la eficiencia de transformación de materiales en productos finales.

La idea de utilizar una tecnología inocua para el medio ambiente ha venido adquiriendo cada vez mayor credibilidad, sobre todo en los países industrializados. Esta clase de tecnologías están basadas fundamentalmente en la aplicación de procesos de fabricación más eficientes, que por consiguiente requieren menos materia prima para alcanzar la misma producción, con una mejor y completa utilización de los residuos. Además, permiten eliminar los desechos o reducirlos al mínimo, necesitan de la aplicación de prácticas innovadoras y, a veces, de la cooperación entre las diferentes industrias, en particular en lo que atañe al intercambio de ciertos residuos y subproductos.

Dondequiera que se las aplica de manera apropiada, las

tecnologías inocuas para el medio ambiente producen beneficios tanto en lo que se refiere a la rentabilidad de las industrias como a la protección del medio ambiente. Por otra parte, la reutilización de los desechos ha dado lugar en cierto número de industrias a un aumento de los márgenes de rentabilidad en cifras considerables que en determinados casos pueden llegar a justificar, no sólo la inversión inicial, sino también a permitir la subsistencia de la empresa en épocas de crisis (Anónimo, 1984).

Las actividades agropecuarias y las industrias transformadoras de sus productos generan cantidades considerables de residuos que pueden tener efectos nocivos si no son objeto de un tratamiento previo a su disposición final, aparte de que representan un recurso renovable cuyo aprovechamiento resulta interesante de estudiar (Anónimo, 1982).

En muchos de estos casos, la Biotecnología encuentra en los residuos agroindustriales materias primas de costo bajo o nulo que hacen factibles, desde el punto de vista económico, a procesos que de otra manera no lo serían. De ello resulta que la obtención de ciertos productos puede realizarse por medios biotecnológicos como alternativa a los caminos clásicos de producción, a la par de resolver un problema ecológico. Un ejemplo ya tradicional de lo anterior es la producción de acetona y butanol, que en sus comienzos se realizó por vía fermentativa empleando cereales como sustrato. Luego pasó al campo de la petroquímica y, en la actualidad, nuevamente la Biotecnología puede encarar su producción merced al uso de residuos como principal componente del medio de cultivo, ya que este es uno de los factores de mayor incidencia en el costo final del producto (Lenz, T.G. and Moreira, A.R., 1980).

En nuestro país existen una serie de ejemplos de residuos factibles de ser utilizados por medios biotecnológicos y que, por diversas razones, generalmente no se lo hace. Sumariamente podemos mencionar a la industria faeneadora de animales y a los frigoríficos, los criaderos de aves y cerdos, las procesadoras de

pescado, los lavaderos de lana, las curtiembres, las industrias del vino, de la sidra y de los jugos de fruta, etc. Situaciones típicas y a su vez extremas de la falta de tratamiento y/o aprovechamiento de residuos las vemos en los ríos de la provincia de Tucumán poluidos por los efluentes de las industrias del azúcar y del alcohol (Cabib, G. y col., 1983) y en las cercanías de las usinas lácteas de la pampa húmeda que descargan grandes cantidades de suero de queso al curso de agua más cercano sin tratamiento alguno (Mignone, C.F., 1982).

### EL EJEMPLO DEL ORUJO DE MANZANA

Sin llegar a los extremos mencionados precedentemente, la elaboración del jugo de manzana constituye un ejemplo típico de industria productora de grandes cantidades de residuos potencialmente aprovechables y que en la actualidad, en Argentina, se eliminan sin tratamiento alguno. Este es el caso del orujo de manzana, motivo del presente trabajo.

Este residuo se produce como resultado de la expresión de la fruta para la obtención del jugo que posteriormente puede ser destinado al consumo, o bien utilizado para la elaboración de sidra o vinagre. Se debe tener en cuenta que del total del peso de las manzanas procesadas, cerca de un tercio queda como orujo, lo cual significa una gran proporción de desperdicio. Por esta razón y teniendo en cuenta el costo del flete del orujo desde la planta juguera hasta el lugar de disposición final, es que en el año 1984 un empresario mostró interés en que se realizaran experiencias tendientes a su aprovechamiento. El CINDEFI, con larga trayectoria en el estudio del uso de residuos de origen agroindustrial, encaró como respuesta una recopilación previa de información al respecto. Por otra parte, en la Primera Reunión Internacional sobre la Industrialización de la Manzana, Cipolletti, Prov. de Río Negro, 20 al 24 de agosto de 1984, se planteó concretamente la necesidad de un

estudio acerca del tratamiento de efluentes en plantas productoras de jugo, particularmente en el caso del orujo, pensando en su aplicación en alguna industria satélite. Al respecto, debe mencionarse la buena predisposición demostrada entonces por algunos empresarios en colaborar en el estudio del problema.

Dentro de los procesos biotecnológicos mencionados en bibliografía para el aprovechamiento del orujo de manzana figuran varias alternativas que utilizan microorganismos. Una de ellas es la digestión anaeróbica para la producción de biogás (Lane, A.G., 1979) encontrándose que la composición del gas producido era 50-55 % de metano, 45-50 % de CO<sub>2</sub> (v/v) con un poder calorífico de 19,2 MJ.m<sup>-3</sup>, valores apropiados para su uso en quemadores de calderas. Además, se ha demostrado que el residuo sólido de la fermentación posee una composición química apropiada para su uso como fertilizante (Gellender, M., 1979). Se ha descrito una mejora del proceso en la cual el calor liberado durante la fermentación se utiliza en un biodesecador de orujo húmedo que es deshidratado para su uso con otros fines (Jewell, W.J. and Cummings, R.J., 1984).

También se menciona la producción de alcohol en cultivos en sustrato sólido sobre orujo (Hang, Y.D. y col., 1981; Hang, Y.D. y col., 1982). Los rendimientos de etanol obtenidos variaron desde 29 a más de 40 g por Kg de orujo de manzana, dependiendo del origen de las muestras. Además el residuo de la destilación contenía un tenor de proteína cruda (nitrógeno total por 6,25) de 9,4 %, valor adecuado para su uso en alimentación animal. En otro estudio se logró aumentar el rendimiento mediante una sacarificación enzimática previa, llegándose a 60 g de etanol por Kg de orujo (Miller, J.E. y col., 1982).

Otra posibilidad es la producción de ácido cítrico por fermentación en sustrato sólido (Hang, Y.D. and Woodams, E.E., 1984; Hang, Y.D. and Woodams, E.E., 1986). Los rendimientos obtenidos variaron con el tipo de orujo empleado y dependieron de la cantidad de metanol agregada al medio de cultivo, el tiempo y la temperatura de

proceso, alcanzando en el mejor de los casos valores de 90 g de ácido cítrico por Kg de orujo fermentado.

### OBJETIVOS DEL TRABAJO

En base a estos antecedentes previos se ideó un plan de trabajo tendiente al desarrollo de una tecnología que permitiera no sólo brindar a la industria juguera del valle del río Negro una alternativa a la disposición final del orujo de manzana al aire libre para que se degrade naturalmente como habitualmente se venía realizando (con los inherentes perjuicios económicos y ecológicos que ello acarrea), sino que también posibilitara la creación de nuevas industrias que lo emplearan como materia prima.

Para la realización del plan de investigación se plantearon inicialmente los siguientes objetivos con respecto a los requisitos que idealmente los procesos tecnológicos a desarrollar deberían cumplir:

1) El consumo total del orujo de manzana producido, esto es que a través de distintas alternativas tecnológicas se encontraran las vías de aprovechamiento necesarias para que su uso como materia prima absorviera el total de la cantidad producida.

2) El aprovechamiento integral, o sea que en su transformación no se produjeran residuos finales y, si esto ocurriera, que a su vez fuera posible su uso en otra actividad económicamente rentable.

3) La obtención de productos con interés fundamentalmente regional y/o nacional.

4) El logro de tecnologías que condujeran al máximo de incremento en el valor agregado de los productos obtenidos.

De análisis teórico de las posibles soluciones que la Biotecnología puede aportar al uso del orujo de manzana, surgen enfoques prácticos basados fundamentalmente en su composición química, a algunos de los cuales ya se ha hecho referencia. En nuestro caso, en el CINDEFI se plantearon 3 alternativas no

mencionadas hasta el momento en bibliografía y que presentaban interés local. Primeramente se planteó la posibilidad de un enriquecimiento proteico pensando en la elaboración de un componente de dietas para animales, tema del cual trata el capítulo 2 y que además cumple con las condiciones del aprovechamiento integral y del interés regional.

Por otra parte, la producción de enzimas pectolíticas (capítulo 4) representa otra interesante vía de estudio debido a que ellas constituyen un insumo importante de la industria juguera lo que implica un interés local. Además, la composición química de algunos tipos de orujo en cuanto a azúcares y pectina es similar a la de los medios de cultivo líquidos empleados para tal fin mencionados en la bibliografía pertinente.

Un tercer tipo de proceso es la fermentación aceto-butílica. El butanol y la acetona son importantes solventes de uso industrial cuya producción por fermentación ha vuelto a ser económicamente atractiva en virtud del aumento del costo de la clásica vía petroquímica, mucho más si se emplea un sustrato de costo bajo o nulo como es este caso. Además, esta alternativa permitiría el aprovechamiento del residuo de la fermentación, en forma similar a la propuesta en el caso de la producción de etanol, para su uso en alimentación animal.

Antes de decidir la iniciación de los trabajos se establecieron contactos verbales con empresarios interesados en prestar colaboración en los mismos. A tal efecto, se plantearon los problemas que se iban a presentar. En primer lugar, la distancia que separaba los lugares de producción del orujo de nuestros laboratorios era un inconveniente para su normal aprovisionamiento. Las muestras deberían ser congeladas para evitar su alteración y transportadas rápidamente. Además, serían necesarios viajes de investigadores a las plantas jugueras para evaluar "in situ" la problemática del orujo de manzana. Y finalmente, la realización de ensayos pilotos de transformación en la zona de producción. En

aquel momento se encontró un eco favorable a todo ello, tanto desde el punto de vista técnico como económico. Sin embargo, como se verá posteriormente, no se pudo lograr la necesaria colaboración para la realización de procesos en escalas mayores a las de laboratorio. A pesar de ello, la experiencia adquirida abrió un panorama como para que en el futuro, si se puede contar con los medios apropiados, se retomen los trabajos a fin de concretar una tecnología completa como inicialmente nos habíamos propuesto.

El objeto de este trabajo de Tesis es el estudio de las dos primeras alternativas mencionadas precedentemente, habiéndose desarrollado la tercera de ellas por otro grupo de trabajo de nuestro Instituto (Voget, C.E. y col., 1985).

#### REFERENCIAS

- Anónimo (1982). Utilizations non énergétiques des résidus agricoles et agro industriels. *Industrie et environnement* 5, 2, 1-2.
- Anónimo (1984). Tecnología industrial inocua para el medio ambiente. *Industria y medio ambiente* 7, 2, 1-2.
- Anónimo (1985). Programa Nacional de Biotecnología, Informe Preliminar, pág. 7. Secretaría de Ciencia y Técnica, Ministerio de Educación y Justicia.
- Cabib, G.; Silva, H.; Giulietti, A. y Ertola, R. (1983). The use of sugar can stillage for single cell protein production. *J. Chem. Tech. Biotech.* 33 B: 21-28.
- Gellender, M. (1979). Upgrading waste to high-grade fuel entices developers of biogas. *Chem. Internat.* 3, 17-21.
- Hang, Y.D.; Lee, C.Y. and Woodams, E.E. (1982). A solid state fermentation system for production of ethanol from apple pomace. *J. Food Sci.* 47, 1851-1852.
- Hang, Y.D.; Lee, C.Y.; Woodams, E.E. and Cooley, H.J. (1981). Production of alcohol from apple pomace. *Appl. Env. Microb.* 42, 6, 1128-1129.



- Hang, Y.D. and Woodams, E.E. (1984). Apple pomace: a potential substrate for citric acid production by *Aspergillus niger*. *Biotech. Lett.* 6, 11, 763-764.
- Hang, Y.D. and Woodams, E.E. (1986). Solid state fermentation of apple pomace for citric acid production. *Mircen J.* 2, 283-287.
- Jewell, W.J. and Cummings, R.J. (1984). Apple pomace energy and solids recovery. *J. Food Sci.* 49, 407-410.
- Lane, A.G. (1979). Methane from anaerobic digestion of fruit and vegetable processing wastes. *Food Tech. in Australia* 31, 5, 201-207.
- Lenz, T.G. and Moreira, A.R. (1980). Economic evaluation of the acetone butanol fermentation. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 19, 478-483.
- Mignone, C.F. (1982). Tesis: Transformación del suero de queso por procesos fermentativos. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
- Miller, J.E.; Weathers, P.J.; Mc Conville, F.X. and Goldberg, M. (1982). Saccharification and ethanol fermentation of apple pomace. *Biotech. Bioeng. Symp.* 12, 183-191.
- Voget, C.E.; Mignone, C.F. and Ertola, R.J. Butanol production from apple pomace. *Biotech. Lett.* 7, 1, 43-46.

## CAPITULO 1: EL ORUJO DE MANZANA

### 1.1. INTRODUCCION

Antes de hacer referencia al orujo de manzana es interesante mostrar algunas estadísticas de producción de manzanas y comentar brevemente la historia de la evolución de este cultivo, como así también lo que significa su industrialización fundamentalmente para la obtención de jugo. Finalmente, se detallan las principales aplicaciones del orujo citadas en la bibliografía y se describen las características y composición de los distintos tipos empleados en el presente trabajo.

### 1.2. ALGUNAS ESTADISTICAS

La producción mundial de manzanas (*Malus sylvestris*) oscila entre 20 y 26 millones de ton. Argentina participa en ella con aproximadamente el 3-4 % siendo uno de los cultivos con mayor importancia económica dentro de su fruticultura. Al mencionarlo, inmediatamente se lo asocia con el Alto Valle del río Negro, región que se destaca por la calidad y cantidad de su producción. Es por ello que, sin desconocer a otras provincias productoras de manzanas (Tabla 1.1), me he de referir con preferencia a aquella zona, ya que aporta el mayor volumen de producción (alrededor del 80 %) y la gran mayoría de las exportaciones frutícolas del país.

Tabla 1.1: Producción de manzanas por provincia (en miles de ton).

	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986
Río Negro	660,0	648,2	576,0	533,0	667,0	628,3	364,3
Neuquén	119,0	113,2	114,0	107,5	124,0	139,8	85,8
Mendoza	142,0	116,2	82,5	149,6	119,0	128,7	121,1
Buenos Aires	14,0	8,0	9,8	-	-	9,0	8,1
Otras	23,0	19,4	21,7	26,9	23,2	16,6	14,6
Totales	958,0	905,0	804,0	817,0	933,2	922,4	593,9

Fuente: Secretaría de Estado de Agricultura, Ganadería y Pesca.

### 1.3. EVOLUCION DEL CULTIVO E INDUSTRIALIZACION DE LA MANZANA

La región del Valle fue poblada por inmigrantes provenientes del sur de Europa, principalmente españoles e italianos que iniciaron el cultivo de la manzana y su comercialización primeramente en una escala local. Su producción fue estimulada por la llegada en 1899 del ex-Ferrocarril del Sud (hoy Gral Roca) que posibilitó el transporte rápido de la fruta hasta la pampa húmeda y por la realización de importantes obras de riego. Además, las Guerras Mundiales interrumpieron el comercio con Europa, con lo que se incrementó la venta de fruta al Brasil, todavía hoy nuestro principal mercado frutícola. También produjeron el nacimiento de la industria sidrera, debido a la imposibilidad de importación de sidra, dando lugar a la aparición del orujo de manzana como residuo de una actividad industrial (Olliver, A.V., 1960).

En la década de los años 60 gracias al apoyo de importantes medidas crediticias y fiscales tuvo lugar una importante sucesión de cambios tecnológicos tanto a nivel de productor como en las subsiguientes etapas manejadas por las empresas frutícolas. La incorporación de nuevas técnicas ya sea en la producción como en el empaque, la conservación y el transporte, condujo a una progresiva industrialización de la actividad frutícola.

La instalación de la industria del jugo de manzana corresponde a este período de la evolución de la manzanicultura, ya que las primeras plantas jugueras datan del año 1966. Estas se instalaron para cubrir una marcada necesidad como era el aprovechamiento comercial de los excedentes de fruta ya sea por descarte o por variedades no comercializables en estado fresco. La incipiente industria juguera desarrollada hasta esa época se vio rápidamente estimulada por la aparición del jugo concentrado principalmente debido a los problemas que aquella encontraba para la colocación del jugo natural, por los crecientes volúmenes de

producción disponibles y por la apertura del mercado norteamericano que impuso la radicación de nuevas plantas especialmente a partir de 1973.

La actividad ha evolucionado rápidamente y en la actualidad funcionan más de 14 empresas que emplean alrededor de 1000 personas entre directivos, profesionales y operarios que elaboran el producto moliendo más del 30 % de la producción total de manzanas (al que se le debe agregar otro porcentaje igual de la de peras) representado por fruta no apta para el consumo fresco. Además existen otras tantas plantas jugueras que poseen solamente equipos de molienda y prensado debiendo completar el procesamiento de los jugos en fábricas integradas, es decir aquellas que también tienen capacidad de acondicionamiento y evaporación (Bassi, E., 1983).

Se puede decir que en la actualidad alrededor del 60 % de las manzanas producidas en Argentina se consumen en fresco, ya sea en el mercado interno como en el externo en proporciones equivalentes. El 40 % restante se industrializa tanto para jugos en general (30 %) como para sidra y otros derivados entre los que se incluyen pulpas concentradas o no, mermeladas, conservas, caldo para vinagre y deshidratados (10 %). En lo que a jugos respecta, el 95 % de la producción se exporta representando un ingreso de alrededor de 30 millones de dólares para 1986 (Elena, M.A. y Jorge, J.M., 1986), y de más de 50 millones para el año 1987 debido a la excepcional cosecha obtenida (más de 1 millón de ton).

Existen varios tipos de jugo de manzana, a saber: natural, opalescente, clarificado y concentrado, que difieren entre sí por detalles de proceso, aditivos u otras razones (Grampp, E.G., 1981). Para su elaboración, la fruta es lavada y molida y luego se puede hacer un pretratamiento enzimático denominado maceración con el objeto de aumentar la extracción de jugo. Para ello se emplean preparados comerciales que contienen mezclas de pectinasas y celulasas (Rombouts, F.M. and Pilnik, W., 1978). El prensado es una operación de gran importancia pues su rendimiento ejerce gran influencia en el

costo del producto. Las prensas más tradicionales y que todavía se emplean en las sidreras son las de marcos con las que se obtiene un rendimiento de alrededor del 70 % en jugo y un orujo con alto contenido en azúcares. Otro modelo más moderno es la Bucher-Guyer que es tipo pistón y produce más jugo y orujos más pobres. Las prensas más modernas son las Wilmess que son de bandas y pueden trabajar en continuo. En este caso el orujo puede ser lavado y reprensado para aumentar la cantidad total de azúcares extraídos.

El jugo recién obtenido es ambarino, viscoso y con sólidos en suspensión. Para su clarificación existen tres métodos clásicos: calentamiento flash, adición de gelatina y tanino y agregado de bentonita (Rivas, J. y Vitoria, J., 1941). Una técnica más moderna se basa en el empleo de pectinasas para hidrolizar los coloides en suspensión con lo que se precipita parte de los sólidos y se solubiliza el resto.

Como alternativa del tratamiento enzimático se han desarrollado últimamente métodos de ultrafiltración en los cuales el costo del proceso es menor al anterior. Sin embargo, la inversión inicial en equipos hace que hasta el presente esta metodología se haya difundido en poca medida (Meurens, M., 1979).

#### 1.4. EL ORUJO DE MANZANA

##### 1.4.1. Producción del orujo de manzana.

El orujo de manzana resulta un serio problema económico para las plantas de jugo. Por cada 100 Kg de fruta molida se obtienen según el tipo de prensado entre 15 y 30 Kg de orujo. Esta cantidad también depende de la época del año de que se trate ya que al inicio de la temporada, y debido a la abundancia de manzanas y su bajo costo, las empresas jugueras prefieren reducir los tiempos de prensado con la consiguiente disminución en el rendimiento del proceso y aumento en la cantidad de orujo producido. A medida que avanza el año, la cantidad de manzanas va disminuyendo y su costo se va

incrementando por lo que es económicamente conveniente aumentar la eficiencia de los prensados y así la cantidad de orujo producida es menor. A partir de los meses de julio o agosto se comienza a procesar manzanas conservadas en cámaras frigoríficas que tienen un costo todavía mayor a las anteriores. Esto hace que la eficiencia del proceso de extracción del jugo llegue al máximo posible y a un mínimo la producción de orujo.

Consecuencia de lo anterior es que las cantidades de orujo que las empresas jugueras deben eliminar van disminuyendo a lo largo del año. Para ello se contratan servicios de camiones que en la época de mayor actividad de las plantas trabajan permanentemente transportando el orujo a lugares alejados de las ciudades (lo que se llama regionalmente "la barda", o sea donde termina el valle del río Negro y empieza la zona desértica) con un consiguiente costo de flete. Debe tenerse en cuenta que en años normales de producción se eliminan alrededor de 100.000 ton de este residuo, cantidad por demás interesante como para estudiar su aprovechamiento.

En virtud de ello es que los industriales jugueros han buscado, hasta ahora de manera infructuosa, maneras alternativas de eliminación del orujo que puedan solventar el mencionado gasto. Por otra parte, los problemas ecológicos que estas grandes cantidades de residuos orgánicos producen sobre el medio ambiente son otro factor a tener en cuenta al plantearse la necesidad de su aprovechamiento, ya que actúan como focos de proliferación de insectos perjudiciales para la actividad frutícola y el bienestar de la población en general.

#### 1.4.2. Aprovechamiento del orujo de manzana.

Una de las primeras alternativas para el uso del orujo de manzana fue su empleo como abono de las mismas tierras productoras de la fruta (Delorme, J.M., 1949). Sin embargo experiencias realizadas en el Alto Valle demostraron que se producía una excesiva acidificación de los suelos debido a la propia acidez del orujo y también a la

formación de ácidos orgánicos por fermentación, todo lo cual hacía necesario el agregado de minerales calcáreos al terreno con el consiguiente incremento en la salinidad de los suelos, llegando en algunos casos a niveles nocivos para los árboles frutales.

Otra de las posibilidades es su empleo como componente de la dieta de animales, particularmente de vacunos criados a corral, ya sea fresco, previo ensilado o bien seco como ingrediente de alimentos balanceados. En el primer caso el orujo es colocado en los comederos donde al poco tiempo se produce una fermentación alcohólica perceptible por el aroma a etanol que además afecta a los animales, no pudiendo sobrepasar de cierto límite la ingesta diaria. Esta práctica se realiza actualmente en un establecimiento de la provincia de Mendoza donde se engordan novillos con regulares resultados ya que es necesario suplementar la dieta con otros nutrientes fundamentalmente proteicos. Además, el período de alimentación no debe superar cierto tiempo debido a la aparición de problemas de hepatotoxicidad del etanol en los animales.

En el caso del ensilado se coloca al orujo en grandes piletones de cemento al aire libre adicionado o no de sal, urea u otros materiales orgánicos y se lo deja fermentar libremente hasta que cesa el desprendimiento de calor. La propia carga microbiana metaboliza los azúcares libres originando una serie de distintos productos entre los cuales los más importantes son ácido láctico y etanol (Toyokawa, K. y col., 1984). Al producto obtenido, que debido a su bajo pH se conserva bien, se lo mezcla con algún material celulósico (pasto seco) y un suplemento (harina de carne o pescado) para aumentar el contenido proteico. Este tipo de aprovechamiento lo está realizando para el engorde de novillos la empresa juguera ORFIVA ubicada en la ciudad de Plotier, provincia de Neuquén, hasta el presente con buenos resultados.

En cuanto a la tercera posibilidad, la firma Mari-Mari S.A. está instalando un secadero de orujo en el parque industrial de la ciudad de Cipolletti, provincia de Río Negro, el cual va a abastecer

a una planta de alimentos balanceados para vacunos. En su formulación se deben incluir otros componentes necesarios en las dietas de los animales, fundamentalmente para aumentar el contenido proteico.

Como se ve, el bajo contenido proteico del orujo de manzana es un inconveniente para su uso directo en alimentación animal, hecho este ya descrito en bibliografía (Heinemann, W.W., 1984). Por otra parte, se ha descrito el riesgo que significa su inclusión en dietas de animales destinados a la producción de carne o leche debido a la posibilidad de contener restos de sustancias químicas empleadas en sanidad vegetal que serían acumuladas en su organismo y transmitidas a la leche (Rumsey, T.S. y col., 1977; Wilson, L.L. y col., 1971). Además, se han mencionado problemas en vacas gestantes alimentadas con orujo ya que los terneros pueden nacer con malformaciones óseas o muertos en una proporción mayor a la normal, presumiéndose que este problema deriva de la presencia residual de pesticidas (Bovard, K.P. y col., 1977).

También se han hecho otros estudios nutricionales empleando orujo en dietas de distintos animales tales como conejos (Schurg, W.A. y col., 1980), cerdos (Najman, L. y col., 1981), caballos (Wolter, R. y col., 1980) y ovejas (Rumsey, T.S. and Lindahl, I.L., 1982) con resultados variables.

Otra alternativa de aprovechamiento es su empleo como combustible en las mismas plantas jugueras que de por sí consumen gran cantidad de energía fundamentalmente para la producción de vapor. El hecho de que la cantidad de calor liberado durante su combustión sea mayor al necesario para su secado haría suponer la factibilidad técnica del proceso (Sargent, S.A. y col., 1982; Mason, N.B. y col., 1985).

Un estudio económico realizado en una planta juguera de EE.UU. muestra que el costo del transporte del residuo hasta el lugar de disposición final es mayor que la amortización de los gastos de las instalaciones necesarias para utilizar al orujo como combustible, lo cual se logra en un plazo de 5 años (Sargent, S.A. y col., 1986).



Uno de los usos clásicos de orujo de manzana es su empleo en la elaboración de pectinas (Glicksman, M., 1969). La pectina de manzana alcanzó niveles de producción importantes durante la primera mitad del siglo, para luego ser desplazada por la pectina de origen cítrico fundamentalmente en los EE.UU. De una producción anual de pectinas estimada en 10.000 ton, más del 60 % es de origen cítrico principalmente de naranjas, cuyo orujo prácticamente duplica en contenido de pectina al de manzana. En nuestro país no existen plantas elaboradoras de pectina de manzana por razones desconocidas (Rique, T. y Carrazzoni, N., 1960). Sin embargo, un estudio demostró la factibilidad técnica y económica para la instalación de una fábrica de obtención de pectina a partir de orujo de manzana sobre la base de una colocación del producto en el mercado nacional superior a 40.000 Kg anuales (Janeiro Bosch, H., 1979).

Por otra parte, existe la posibilidad de exportar orujo secado para la extracción de pectinas ya que los grandes fabricantes europeos acostumbran a importar esta materia prima de distintos lugares del mundo.

También se ha descrito el empleo de la harina del orujo de manzana secado en productos de panadería y confitería de uso humano (Kazakov, A.L. y col., 1980). Se destaca la presencia de vitaminas y flavonoides con propiedades antiarterioescleróticas que harían recomendable esta práctica. Otro aspecto dentro del campo de la nutrición humana es el uso del orujo seco como elemento para dar volumen en preparados comerciales dietéticos, para lo cual se recomienda una extracción previa de los polifenoles presentes debido a sus efectos indeseables (Dreyer, J.J. and van der Walt, W.H., 1979). Habría que considerar que esto último está condicionado por la mencionada presencia de restos de pesticidas en el orujo.

Un antiguo uso del orujo de manzana es su empleo como cebo para insectos debido a la natural atracción que ejerce sobre ellos. Para tal fin, se lo mezcla con insecticidas apropiados y se lo esparce cerca de las plantaciones de frutales. Poca es la información

técnica disponible al respecto (Smock, R.M. and Neubert, A.M., 1950).

Finalmente, restan los procesos biotecnológicos de aprovechamiento del orujo de manzana, que ya han sido mencionados en la Introducción de este trabajo.

#### 1.4.3. Composición del orujo de manzana.

Morfológicamente, el orujo de manzana está constituido por tres elementos estructurales distintos, a saber: cáscara (epicarpio) 3 a 7 %, pulpa (mesocarpio) 92 a 97 % y semillas con menos del 1 %. Los principales componentes de las células poligonales del epicarpio son esencias, pigmentos, taninos y ceras de la cutícula que recubre la fruta. La pulpa está formada por elementos celulósicos y lignificados (2 a 3 %) y por un líquido que contiene azúcares, almidón, sustancias nitrogenadas, minerales, etc. Las semillas poseen alrededor del 25 % de lípidos y un 40 % de las cenizas corresponden a derivados del fósforo unido principalmente a sustancias orgánicas. También existe un 20 % de sustancias nitrogenadas (Leroy, A.M. and Zelter, S.Z., 1954).

Ya se ha mencionado el hecho de la influencia que tiene la época de procesamiento de la manzana sobre la composición del orujo debido a las características del prensado empleado. Por otra parte, la composición química de orujo va variando a lo largo del año debido a que durante su conservación, ya sea en condiciones ambientales o bien en cámaras de atmósfera controlada, se va produciendo una progresiva degradación de la protopectina que forma parte del cemento intracelular de la manzana con el consiguiente aumento en la cantidad de pectina soluble. Esta última pasa al jugo durante el proceso de prensado por lo que el orujo obtenido tiene un menor contenido de sustancias pécticas. Además los azúcares de la fruta van disminuyendo progresivamente durante el almacenamiento a consecuencia de la respiración celular, con lo que se producen orujos más pobres.

Estos dos factores, uno tecnológico como es el tipo de procesamiento de la fruta y otro biológico como es la evolución en el tiempo de almacenamiento, sumados a su vez a las distintas variedades de manzanas utilizadas en la elaboración del jugo, hacen que en la práctica se encuentren orujos de muy distintas características.

Para la realización de nuestros estudios se emplearon 6 tipos distintos de orujo cuya composición química, variedad de la manzana que le dió origen y mes de procesamiento se muestran en la Tabla 1.2.

Las técnicas analíticas empleadas en la determinación de las composiciones químicas se detallan en los ítems correspondientes a materiales y métodos de los capítulos 2 y 4.

Tabla 1.2.: Composición y origen de los orujos de manzana.

TIPO DE ORUJO	1	2	3a	3b	4a	4b
Humedad %	80,5	85,2	83,1	89,0	80,6	90,5
Fibra cruda %	3,90	2,63	1,96	2,13	3,97	2,81
Lípidos crudos %	1,10	1,50	1,38	1,58	0,80	1,20
Proteína cruda %	0,70	0,45	0,38	0,44	0,35	0,39
Azúcares solubles * %	8,7	3,7	9,1	2,1	9,1	1,4
Sustancias pécticas %	-	1,80	1,20	1,20	1,30	0,86
Cenizas %	0,40	0,25	0,29	0,21	0,27	0,24
pH	4,1	4,1	4,1	4,1	3,3	3,3
Variedad de manzana	R.D.	R.D.	R.D.	R.D.	G.S.	G.S.
Mes de procesamiento	Abril	Abril	Noviem.	Noviem.	Abril	Abril

\* En todos los casos se encontró aproximadamente un 67 % de fructosa, 23 % de glucosa y 10 % de sacarosa.

R.D.: Red Delicious. G.S.: Granny Smith.

Debe mencionarse que el orujo tipo 1 proviene de una planta productora de sidra, donde normalmente las manzanas son exprimidas con

una prensa de marcos y el orujo no es lavado con agua ni reexprimido, puesto que si bien de esta manera se aumenta la cantidad total de azúcares extraídos también se diluye al jugo, obteniéndose una sidra de menor graduación alcohólica. Además, el procesamiento de la fruta se realizó en el mes de abril, por lo tanto las manzanas empleadas tenían apenas días de cosechadas. Considerando que un orujo rico en azúcares como este podría ser la materia prima más adecuada para un enriquecimiento proteico, se lo empleó para tal fin (capítulo 2).

Los demás orujos provienen de una planta elaboradora de jugo concentrado donde habitualmente el orujo es sometido a tres prensados en equipos Willmes (prensas de bandas) y dos lavados con agua antes de ser eliminado debido a que el jugo obtenido es luego concentrado en los evaporadores. De esta manera, los orujos 2, 3b y 4b se pueden considerar como típicos de este tipo de industria. La diferencia entre ellos estriba en el hecho de provenir de las dos variedades de manzanas más empleadas para la elaboración de jugos, o bien de distintas épocas de procesamiento. Esta elección se fundamenta en el interés de estudiar el comportamiento de los distintos tipos de orujo que se puedan encontrar a lo largo del año en los procesos fermentativos a desarrollar.

Estos orujos poseen una composición química, en lo que respecta a azúcares y sustancias pécticas, similar a las encontradas en la bibliografía de producción de pectinasas en medios líquidos. Por tal motivo se los seleccionó para tal fin (capítulo 4).

Los orujos 3a y 4a tienen el mismo origen que los 3b y 4b respectivamente, con la diferencia que fueron obtenidos después del primer prensado de las manzanas, o sea que no fueron sometidos a lavados. Su elección para la producción de pectinasas se fundamenta en el hecho de ensayar una materia prima que se puede considerar, a los efectos prácticos, como proveniente de una planta sidrera aunque en realidad no lo era, pero obtenida el año siguiente

al del orujo 1, y también estudiar el efecto que un menor prensado, y por consiguiente una distinta composición, tenía sobre los resultados de las experiencias.

#### 1.5. REFERENCIAS

- Bassi, E. (1983). La industria de los jugos concentrados en la fruticultura regional. En: Análisis básico y propuesta de soluciones para la actividad agroindustrial de manzanas y peras en la República Argentina. Coordinadora de Entidades Frutícolas Argentinas.
- Bovard, K.P.; Rumsey, T.S.; Oltjen, R.R.; Fontenot, J.P. and Priode, B.M. (1977). Supplementation of apple pomace with non protein nitrogen for gestating beef cows. II. Skeletal abnormalities of calves. J. An. Sci. 46, 3, 523-531.
- Delorme, J.M. (1949). Aprovechamiento de los residuos de la fabricación de la sidra. En: Aprovechamiento de residuos industriales, 3ª Ed., pág. 99. Edit. Antonio Roch, Barcelona.
- Dreyer, J.J. and van der Walt, W.H. (1979). Evaluation of apple pomace as bulking agent. South African J. Sci. 75, 124-126.
- Elena, M.A. y Jorge, J.M. (1986). La industria de jugos concentrados. Novedades económicas. Edit. Fundación Mediterránea.
- Glicksman, M. (1969). Pectins. En: Gum technology in the food industry, chapter 6, 159-190, Academic Press, New York-London.
- Grampp, E.G. (1981). The production of apple juice concentrate. Immediate clarification or intermediate storage? Process Biochem. 16, 3, 24-27.
- Heinemann, W.W. (1984). Apple pomace in steer finishing diets. Research Bulletin XB 0939. Agricultural Research Center, Washington State University.
- Janeiro Bosch, H. (1979). Factibilidad tecnológica para la obtención de materias pécticas a partir de descartes de frutos. Consejo Federal de Inversiones.

- Kazakov, A.L.; Samokish, I.I.; Kompantsev, V.A.; Karpovich, N.S.; Krupko, I.S.; Borovskii, U.R. and Snezhkin, I.P. (1980). Biological value of apple pomace powder and its use in confectioners. *Pishch. Promst.* 2, 50-51.
- Leroy, A.M. and Zelter, S.Z. (1954). Recherches sur l'efficacité alimentaire des marcs de pomme fermiers. *Ann. Zootech.* 1, 17-27.
- Mason, N.B.; Hyde, G.M. and Waelti, H. (1985). Fruit pomace as fuel. *Trans. of the ASAE* 28, 2, 588-590.
- Meurens, M. (1979). Clarification of apple juices. En: *Filtr. beer other beverage ind. int. symp.*, cap. 11, 227-238.
- Najman, L., Toulouva, M. and Minksová, E. (1981). Effects of dried fruit pressing supplements to fat enriched feed mixtures for feedlot pigs. *Acta Vet. Brno* 50, 191-199.
- Olliver, A.V. (1960). Síntesis histórica de la fruticultura argentina. *El Cronista Comercial*, 25 de mayo, págs. 10-13.
- Rique, T. y Carrazzoni, N. (1960). Estudio de pectinas industriales de producción nacional. *Ind. y Quím.* 20, 2, 115-120.
- Rivas, J. y Vitoria, J. (1941). Preparación de jugos de manzana. *Ind. y Quím.* 3, 6, 151-157.
- Rombouts, F.M. and Pilnik, W. (1978). Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochem.* 13, 8, 9-13.
- Rumsey, T.S.; Bovard, K.P.; Fontenot, J.P.; Oltjen, R.R. and Priode, B.M. (1977). Supplementation of apple pomace with non protein nitrogen for gestating beef cows. IV: Pesticide accumulation in cows. *J. An. Sci.* 46, 3, 543-550.
- Rumsey, T.S. and Lindahl, I.L. (1982). Apple pomace and urea for gestating ewes. *J. An. Sci.* 54, 2, 221-234.
- Sargent, S.A.; Steffe, J.F. and Pierson, T.R. (1986). The economic feasibility of in plant combustion of apple processing wastes. *Agric. Wastes* 15, 85-86.
- Sargent, S.A.; Steffe, J.F. and Tennes, B.R. (1982). Apple pomace as a fuel for food processors. Paper N° 82-6032, American Society of Agricultural Engineers.

- Schurg, W.A., Reed, J.P. and Reid, B.L. (1980). Utilization of various fruit pomace products by growing rabbits. *Nutrit. Rep. Internat.* 21, 1, 55-62.
- Smock, R.M. and Neubert, A.M. (1950). Apple pomace. En: *Apples and apple products*, chapter 15, 439-450. Interscience Publishers Inc., New York-London.
- Toyokawa, K.; Saito, Z.; Inoue, T.; Mikami, S.; Takayasu, I. and Tsubomatsu, K. (1984). The effects of apple pomace silage on the milk production and the reduction of the feed cost for lactating cows. *Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ.* 41, 89-112.
- Wilson, L.L.; Kurtz, D.A.; Rugh, M.C.; Chase, L.E.; Ziegler, J.H.; Varela-Alvarez, H. and Borger, M.L. (1971). Adipose tissue concentrations of certain pesticides in steers fed apple waste during different parts of the finishing period. *J. An. Sci.* 33, 6, 1356-1360.
- Wolter, R.; Durix, A.; Letourneau, J.C. et Carcelen, M. (1980). Evaluation chez le poney de la digestibilité des pellicules de soja, du marc de pommes, des caroubes et du tarteau de pépins de raisins. *Ann. Zootech.* 29, 4, 377-385.

## CAPITULO 2: ENRIQUECIMIENTO PROTEICO DEL ORUJO DE MANZANA

### 2.1. INTRODUCCION.

Según la FAO, durante las dos últimas décadas, la producción de alimentos tanto a nivel mundial como regional fue mayor que el aumento de la población, pero la diferencia entre ambas se ha estrechado (Nicol, B., 1974). Esto indica que la tasa de producción anual de alimentos es inferior que la de crecimiento poblacional, con lo cual al correr del tiempo, de no revertirse esta tendencia, se producirá una verdadera deficiencia alimentaria.

Por otra parte, dentro de la alimentación es bien conocido el papel que juegan las proteínas, como así también la importancia que reviste la calidad (valor biológico) de las mismas.

Las fuentes de proteínas de origen tradicional son las aportadas por la agricultura, ganadería, avicultura y pesca, es decir, las que se utilizan a diario, siendo los ejemplos más representativos la carne, los huevos, los lácteos y los cereales.

Dentro de las fuentes proteicas no tradicionales pueden mencionarse las provenientes de las semillas de oleaginosas y concentrados de sus proteínas (residuos de la industria aceitera que utilizan maní, germen de maíz, colza, nabo, sésamo, lino, etc.), las legumbres (soja, poroto, arveja, garbanzo, haba, lupino, etc.), las harinas de pescados, las algas, el krill, los dializados de suero de leche, las proteínas unicelulares, etc. Se estima que este tipo de fuentes proteicas está destinado a ocupar un lugar preponderante dentro de la alimentación mundial debido a que las tradicionales dependen en última instancia de tierras aptas para su producción, las cuales inexorablemente tendrán un límite y es aquí donde intervienen las no tradicionales ya que en algunos casos no tienen una dependencia tan estricta en cuanto al lugar de producción (Valenciano, O.A., 1980).

Dentro de las fuentes proteicas no tradicionales, las proteínas



unicelulares ocupan un espacio importante. Se las puede definir como todo microorganismo (bacterias, algas, hongos y levaduras) susceptible de ser cultivado con fines alimenticios, sea para humanos o animales (Mateles, R.I. and Tennenbaum, S.R., 1968).

Los microorganismos presentan una serie de ventajas dignas de mencionarse con respecto a su capacidad de producir proteínas que, por otra parte, han sido ampliamente divulgadas en la bibliografía del tema. Presentan en término medio un contenido proteico en base seca de entre el 40 y 50 %, su obtención es independiente de las condiciones climáticas, las instalaciones necesarias para su producción requieren poco espacio, pueden utilizar sustratos muy variados y presentan una gran velocidad de crecimiento. Este último punto es importante porque supone una gran ventaja con respecto a las fuentes tradicionales. Por ejemplo, el tiempo necesario para duplicar el peso es de 20 a 120 minutos para bacterias y levaduras, de 2 a 48 horas para hongos y algas, 1 a 2 semanas para pasturas y algunas plantas, 2 a 4 semanas para pollos, 4 a 6 semanas para cerdos y 1 a 2 meses para bovinos (Humphrey, A.E., 1969). En cuanto a la productividad, expresada en kg de proteína/día por cada 1000 kg de biomasa, el ganado vacuno presenta un valor de 1, la soja en época de crecimiento 10, las levaduras  $10^6$  y las bacterias  $10^{11}$  (Riviere, J., 1977).

Ya se ha mencionado la capacidad que presentan los microorganismos de utilizar sustratos de los más variados orígenes para su crecimiento. En la Tabla 2.1 se puede observar la gran diversidad de materiales empleados en medios de cultivo destinados a la producción de proteínas microbianas como así también algunas de las características de los mismos.

Tabla 2.1: Variedad de sustratos potencialmente empleables para la producción de proteínas microbianas (adaptada de Gaden, E.L., 1974).

SUSTRATO	DISPONIBILIDAD (1)	PRETRATAMIENTO	RENDIMIENTO (2)	OTRO USO
<b>GLUCIDOS</b>				
Melazas: de caña de remolacha	amplia, estacional concentrada, estacional	simple simple	0,25-0,30 0,27-0,33	Etanol Etanol
Suero de queso	limitada, anual	simple	0,03	Alimentación animal
Líquidos sulfíticos	concentrada, anual	simple	0,008	-
Residuos de papa	limitada, estacional	simple o ninguno	-	Alimentación animal
Residuos de frutas y hortalizas	limitada, estacional	simple o ninguno	-	Alimentación animal
Almidón de: granos mandioca	amplia, estacional concentrada	hidrólisis hidrólisis	0,5-0,6	Alimentación
<b>Celulosa</b>				
madera	concentrada, anual	hidrólisis	0,03	Combustible
bagazo	concentrada, estacional	hidrólisis	0,1-0,3	Combustible
marlo de maíz	limitada, estacional	hidrólisis	0,13	-
cáscaras	limitada, estacional	hidrólisis	-	Alimentación animal
residuos urbanos	concentrada, anual	hidrólisis	-	-
<b>ALCOHOLES</b>				
Metanol	amplia, anual	ninguno	0,25-0,5	Industria química
Etanol	amplia, anual	ninguno	0,6-0,7	Combustible
Propanol	limitada, anual	ninguno	0,4	Industria química

(1) Amplia: disponible en amplias zonas en cantidades potencialmente utilizables. Limitada: relativamente pequeñas cantidades. Concentrada: relativamente grandes cantidades disponibles en pocos lugares.

(2) Expresado como Kg de biomasa seca por Kg de sustrato. Para materiales celulósicos se incluye su contenido de humedad.

Es dable observar que en muchos de los casos mencionados los sustratos son residuos industriales de los más variados orígenes que constituyen elementos contaminantes del medio ambiente si no son sometidos a tratamientos de depuración antes de su disposición final. Es así que como alternativa a esto último, la producción de biomasa con fines alimenticios puede constituir una interesante opción y llegar a ser económicamente aceptable. Sin embargo, en la formulación de los alimentos balanceados destinados a animales se incluye normalmente harina de soya como principal componente proteico, por lo que necesariamente una biomasa microbiana destinada a tal fin debe ser de menor costo que este producto.

El caso particular del orujo de manzana es un ejemplo típico de un residuo agroindustrial contaminante del medio ambiente que, convenientemente manejado, puede constituir un sustrato apropiado para la producción de biomasa destinada a la alimentación animal. La estrategia a emplear, que es general para este tipo de situaciones, es la siguiente: los microorganismos poseen la capacidad de metabolizar los glúcidos presentes en el orujo convenientemente suplementado con sales minerales entre las cuales se debe incluir una fuente inorgánica de nitrógeno que va a dar origen a las proteínas microbianas. Estas pueden ser consumidas por animales y éstos a su vez por el hombre. En resumen, una fuente nitrogenada que no podría ser empleada en alimentación humana en virtud de la incapacidad metabólica del hombre para asimilarla puede transformarse en proteínas animales de alto valor biológico.

Otro aspecto que hay que tener en cuenta es el hecho de que los microorganismos poseen un contenido relativamente alto de ácidos nucleicos para su uso directo como alimento para humanos. Sin embargo, si el producto final se utiliza como alimento de animales de cría, el citado inconveniente se vería salvado ya que ellos pueden ingerirlos y metabolizarlos sin problemas en virtud de que poseen una enzima hepática llamada urato-oxidasa que desdobla al ácido úrico en alantoína de gran solubilidad y fácilmente eliminable

por vía renal.

Por otra parte, el bajo tenor de proteínas del orujo de manzana lo hace poco apropiado para su empleo directo previo secado en alimentos balanceados a menos que se lo suplemente convenientemente con fuentes proteicas. O sea que, en última instancia, serían éstas las que se reemplazarían mediante un enriquecimiento proteico microbiano.

Al producto final obtenido de esta forma le cabe la reciente denominación inglesa de "microbial biomass product" que se refiere a una mezcla compleja de sustratos sólidos y microorganismos crecidos a expensas de él, a diferencia de la clásica biomasa microbiana en la cual al final del proceso los microorganismos son separados del medio de cultivo agotado (Da Silva, E.J., 1981).

Finalmente, debe plantearse el interés económico puesto en juego en la producción de proteínas destinadas a la alimentación animal en una zona marginal como es la productora de jugo de manzana. La topografía del Alto y Medio valle del río Negro que dá lugar a una gran cantidad de microclimas, las bajas precipitaciones pluviales y su mala distribución, los fuertes vientos, la cobertura de los campos por la nieve y los cortos períodos libres de heladas, son factores fundamentales que limitan a esta zona en cuanto a la producción ganadera.

Debe mencionarse que la flora autóctona es escasa y de bajo poder alimenticio, lo que hace necesario grandes extensiones de campo para los rodeos. Todos estos factores dan a la ganadería de la zona su característica particular de transhumancia, por lo cual los productores arrear su ganado de los campos de invierno a los de verano a fines de primavera retornando a los campos de invierno a fines del otoño. Así se da el caso de arreos de más de 200 km por ejemplo de los productores del Departamento de Pehuenches, prov. de Neuquén, que tardan 45 días en llegar a la "veraneada" y 20 días al volver por estar mejor alimentado el ganado. Esta modalidad trae aparejada una serie de problemas socio-económicos, no permitiendo entre otras

cosas el arraigo de los pobladores.

Otro de los problemas que se presentan es la necesidad de terminar el engorde del ganado fuera de la zona, en la pampa húmeda, para después regresar para su consumo ya faenado (Anónimo, 1985).

Uno de los objetivos regionales, máxime al tener en cuenta que las carnes de la región se valorizan más al estar en vigencia la barrera sanitaria y considerarse al sur del río Colorado zona libre de aftosa, es evitar el éxodo del ganado fuera del territorio. Para ello resulta ineludible la solución del problema de la alimentación del mismo. Una alternativa interesante la constituye la cría de animales a corral mediante el uso de alimentos balanceados (Mendel, V.E. y Clawson, W.J., 1977). Por lo tanto, la producción de una proteína microbiana de costo accesible a partir de un residuo abundante como el orujo de manzana constituye un proyecto más que atractivo desde el punto de vista económico y un desafío para la Biotecnología.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron microorganismos aerobios en virtud de su mayor capacidad para la transformación de las fuentes de carbono del orujo de manzana en biomasa. A tal fin, se seleccionaron cepas de levaduras, en una primera etapa, en medios agarizados y luego en procesos en erlenmeyers. Posteriormente, se pasó a tanques agitados a los efectos de estudiar su comportamiento en una escala de trabajo mayor. En este caso, los problemas reológicos presentados hicieron necesario el uso de un hongo con capacidad hidrolítica de los biopolímeros responsables de la alta viscosidad del medio. Para finalizar, se realizaron experimentos con cultivos mixtos con alimentación controlada de sustrato fresco mediante un dispositivo ideado y construido en nuestro laboratorio, a los efectos de alcanzar la mayor concentración posible de sólidos en el medio de cultivo.

Como resultado de estos experimentos, se llegó a un producto final cuya composición en base seca lo haría recomendable para el

uso en dietas de animales bovinos. No se pudieron realizar ensayos en mayor escala debido a la falta de la infraestructura y del apoyo necesario por parte de la industria juguera, tal como se mencionó anteriormente.

## 2.2. MATERIALES Y METODOS.

### 2.2.1. Microorganismos e inóculos.

Para el desarrollo de las experiencias se emplearon tres cepas distintas de levaduras, a saber: *Saccharomyces lipolytica*, *Candida utilis* NRRL 1087 y *Candida* sp. aislada de un tanque de melasa (Cabib, G. y col., 1983), y una fúngica, *Trichoderma reesei* QM 9414 (gentilmente cedida por el Dr. Cuevas, INIQUI, UN Salta), todas aptas para la alimentación animal. Ellas fueron mantenidas a 4 °C en el medio de cultivo 1 (agar orujo de manzana) que demostró ser apto para tal fin.

Los inóculos de levaduras para los estudios en frascos agitados fueron preparados a partir de cultivos de 48 h sobre agar orujo de manzana y se sembraron en erlenmeyers de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo alcanzando una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>.

En el caso de la cepa de *Trichoderma*, se utilizó una cantidad suficiente de esporos obtenidos sobre agar orujo de manzana y resuspendidos en solución acuosa de Tween 80 al 0,01 % como para alcanzar una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>.

El inóculo de *S. lipolytica* para los experimentos en escala de fermentador consistió en un cultivo empleando el medio 4 de 48 h con un volumen igual al 10 % del del fermentador conteniendo  $1 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>.

Para los cultivos con *T. reesei* tanto sin o con alimentación de sustrato, los inóculos fueron similares a aquellos descritos para los estudios en frascos agitados y los de los experimentos con cultivos mixtos se describen más adelante.

En todos los casos, los cultivos se realizaron a 30 °C.

### 2.2.2. Medios de cultivo.

Los medios empleados se basaron en el uso de orujo de manzana, orujo de manzana pretratado a 100 °C durante 2 horas con el agregado de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,54 % p/v) o jugo de orujo de manzana que fue obtenido en nuestro laboratorio, mediante una prensa, hasta lograr un rendimiento aproximado del 50 % (v/p), dependiendo del propósito del experimento. El pH se ajustó en todos los casos a 4,1. Los medios generalmente no se esterilizaron y cuando se lo hizo se efectuó a 121 °C durante 20 minutos. La composición final de los medios de cultivo se muestra en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Composición de los medios de cultivo (g.L<sup>-1</sup>).

Componentes	Medio			
	1	2	3	4
Orujo de manzana	100	384,6	-	-
Orujo de manzana pretratado	-	-	384,6	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7	7	-	7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	2	2	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1	0,5	0,5	0,5
CaCl <sub>2</sub>	1	0,5	0,5	0,5
Solución de microelementos (mL.L <sup>-1</sup> )	1	1	1	1
Tween 80	-	2	2	-
Agar	30	-	-	-
Jugo de orujo de manzana csp	-	-	-	1000 mL
H <sub>2</sub> O csp	1000 mL	1000 mL	1000 mL	-
Esterilización	si	no	no	si

La solución de microelementos fue de la siguiente composición (mg.L<sup>-1</sup>): FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 5,0; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1,6; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,4 y CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 3,7 (Mandels, A. and Weber, J., 1969)

El orujo de manzana empleado fue el mencionado en el capítulo 1 y que se le asignó el tipo 1. Este orujo fue transportado desde una planta sidrera a temperatura ambiente durante alrededor de 1 día, lo que produjo un desarrollo parcial de la propia contaminación microbiana. Una vez llegado a nuestro laboratorio se lo fraccionó y congeló a -20 °C, manteniéndose en esa condición hasta su empleo.

### 2.2.3. Técnicas analíticas.

El pH de las muestras tanto de orujo de manzana como las de los procesos fermentativos fue medido con un peachímetro Metrohm modelo E 396 B empleando una dilución de 9 partes de agua y 1 del residuo.

La materia seca se determinó a 60 °C hasta peso constante. En los procesos realizados en erlenmeyers agitados se secó la totalidad del contenido de cada frasco. En el caso de los procesos efectuados en fermentador se tomaron alícuotas que se pesaron antes y después de secar, refiriéndose el contenido de materia seca a la unidad de volumen ya que la densidad del medio de cultivo era aproximadamente de 1 g.mL<sup>-1</sup>. No se midió el volumen de la muestra debido a que por sus características reológicas eran retenidas gran cantidad de burbujas de aire originando valores en defecto. Esta determinación se considera muy importante tomando en cuenta que el propósito principal de los procesos era arribar, al final de ellos, al máximo valor posible de materia seca.

El contenido de proteínas fue determinado por el método de Kjeldahl (ADAC, 1970) y calculado por diferencia entre el contenido de nitrógeno total y el de nitrógeno amoniacal, multiplicado por 6,25. El término "proteína cruda" se aplica al contenido de nitrógeno total multiplicado por 6,25.

El nitrógeno amoniacal fue evaluado por destilación de las muestras las cuales habían sido alcalinizadas mediante el agregado de suficiente cantidad de solución de NaOH y posterior medida volumétrica (Schaffeld, G. and Illanes, A., 1982).

Los lípidos totales fueron determinados por extracción con éter de petróleo, fracción 60-80 °C, en un extractor Soxhlet y los carbohidratos totales por la técnica de antrona (Herbert, D. y col., 1971) empleando glucosa como patrón.

Las cenizas se realizaron a 550 °C sobre muestras secadas y molidas.

La fibra cruda fue evaluada por gravimetría previo tratamiento a ebullición de la muestra con soluciones 1 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NaOH



(Jenkins, G.L. y col., 1951).

En todos los casos, los recuentos de microorganismos (levaduras y esporos fúngicos) en medios sin sólidos insolubles se realizaron sobre una dilución adecuada en cámara de Neubauer.

#### 2.2.4. Desarrollo de procesos fermentativos.

Los experimentos preliminares se llevaron a cabo en agitador rotatorio a 200 rpm con erlenmeyers de 250 mL de capacidad conteniendo 50 mL de medio de cultivo, cubiertos con una capa doble de gasa, en lugar del clásico tapón de algodón, para facilitar la aereación. A fin de evitar problemas con el muestreo durante los procesos se empleó un número suficiente de erlenmeyers que permitiera tomar tres de ellos en los intervalos de tiempo prefijados, utilizándose como muestra el contenido total de los mismos pero procesándolos por separado (los resultados mostrados son promedios de triplicados). El pH fue ajustado periódicamente al valor inicial mediante el agregado de solución 1 N de NaOH o de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 7 % v/v.

Las experiencias en escala de fermentadores agitados se llevaron a cabo en una unidad de fermentación LKB Ultroferm 1601 con un volumen de trabajo de 2 a 4 L. El pH fue controlado automáticamente en 4,1 mediante la adición de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 7 % v/v. La agitación fue 1000 rpm y la aereación fue fijada a 1 vvm. Además, la tensión de oxígeno disuelto fue medida y registrada automáticamente.

La potencia consumida por la agitación fue indirectamente medida por el consumo eléctrico del motor. Los valores dados se expresan en unidades arbitrarias (Au) para facilitar la medida, tomando como máximo el valor de la unidad y refiriendo los demás como fracciones de ella.

Para la adición controlada del orujo de manzana en los procesos discontinuos alimentados se empleó un dosificador controlable de sustratos pastosos que fuera diseñado y construido en nuestro laboratorio. El sistema consta fundamentalmente de un soporte al cual está adosado un motor universal de 220 V, 1/2 HP, 1800 rpm y un

cilindro de PVC de 100 mm de diámetro interno con un pistón de PVC soportado por una varilla roscada. Esta última está interconectada por un sistema de polea y correa con el motor (Fig. 2.1).

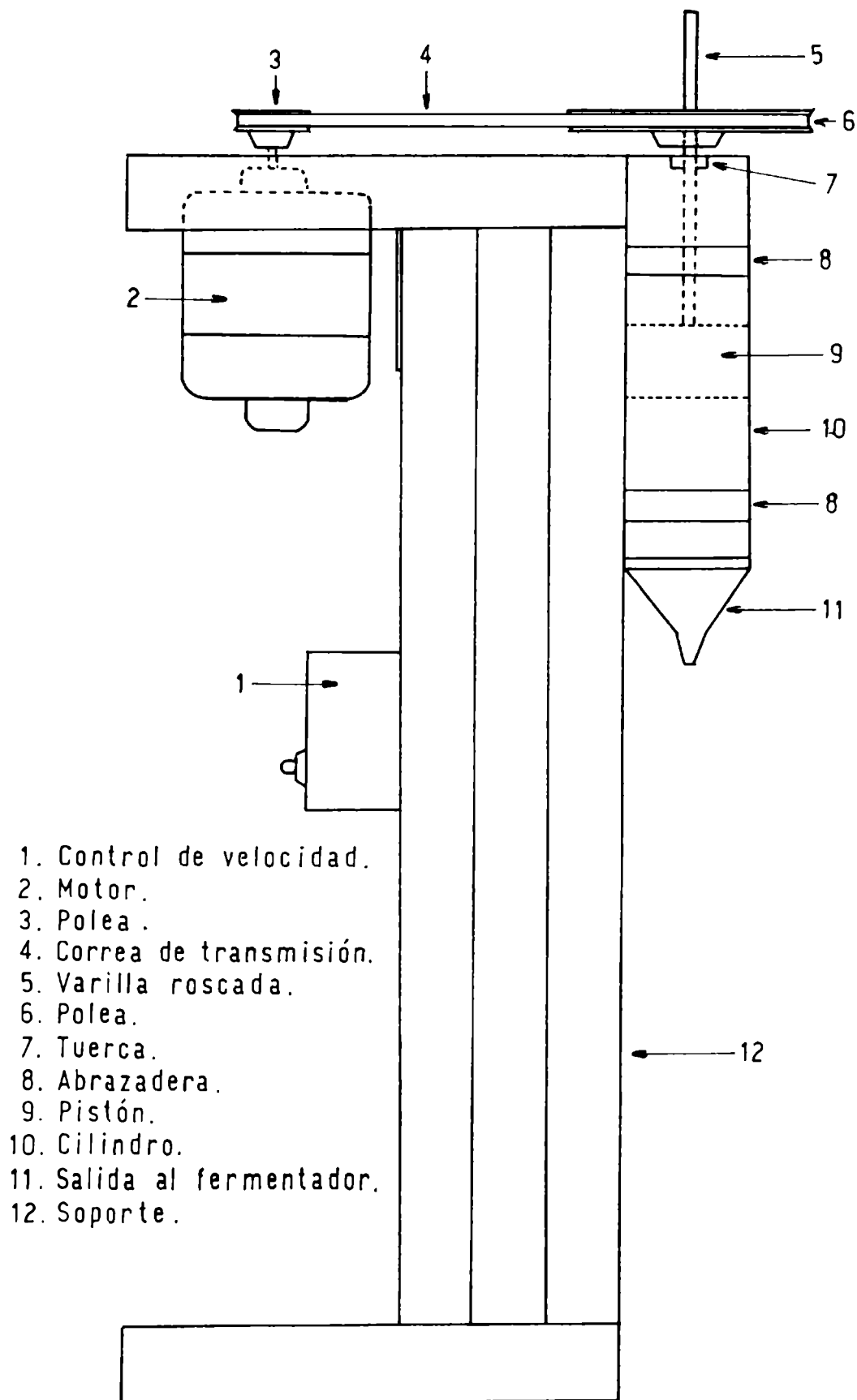


Fig. 2.1. Dosificador de sustratos pastosos.

El sistema de control utilizado, del cual se muestra un diagrama en bloques (Fig. 2.2), se construyó aprovechando la señal originada en un electrodo que mide el oxígeno disuelto del medio de cultivo. Este valor es registrado, amplificado y comparado electrónicamente con un umbral de referencia previamente fijado por el operador. Si la medida lo supera, se conecta un relay que acciona el motor del dosificador durante un tiempo también prefijado. Cumplido éste, el control espera un determinado tiempo para que el sistema evolucione y vuelve a sensar el nivel de oxígeno disuelto, adicionando o no más sustrato según si aquel no haya o haya bajado del umbral de referencia respectivamente. Además existe la posibilidad de variar las revoluciones del motor de modo tal que de esta manera también se puede regular la cantidad de sustrato de cada adición.

El hecho de que se pueda ajustar en forma continua, simultánea e independiente el nivel de referencia del oxígeno disuelto, los tiempos de adición y espera y la velocidad de adición del sustrato permite un adecuado control de un cultivo discontinuo alimentado con un sustrato pastoso como es el caso del orujo de manzana que de otra manera no podría llevarse a cabo.

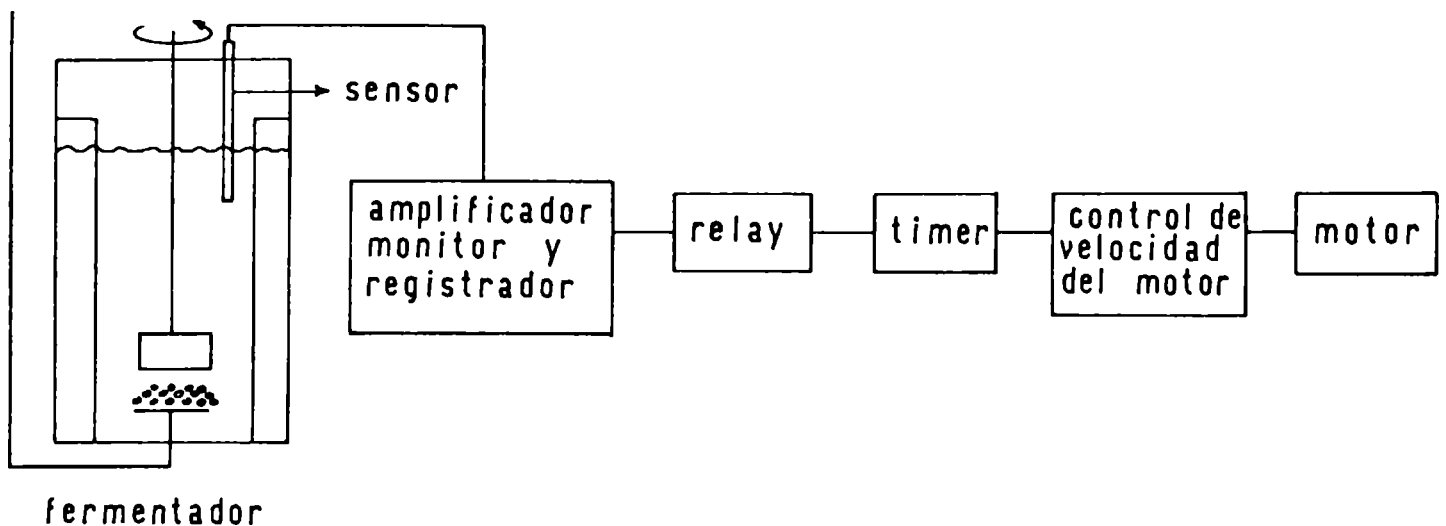


Fig. 2.2. Sistema de control.

Finalmente, los procesos discontinuos alimentados se comenzaron con el medio de cultivo 3 diluido 1,5 veces con agua. El dosificador se cargó con orujo de manzana pretratado con un pH: 1,6 que no se varió después del pretratamiento a los efectos de evitar la proliferación de microorganismos debido a que el diseño no permite evitar la contaminación proveniente del medio ambiente. También se incluyeron los demás componentes del medio de cultivo 3 a excepción del agua. El sistema se ajustó a una tensión de oxígeno disuelto del 25 %, con un tiempo de adición de 1 seg, un tiempo de espera de 90 seg y una velocidad del motor de 1000 rpm, condiciones que fueron seleccionadas en experimentos previos.

### 2.3. RESULTADOS Y DISCUSION.

#### 2.3.1. Ensayos en sistema de cultivo discontinuo.

Los microorganismos mencionados precedentemente fueron sembrados sobre el medio de cultivo 1 a fin de establecer su capacidad de desarrollo utilizando orujo de manzana. Después de 24 h de incubación se observó un abundante desarrollo de *S. lipolytica* y de *Candida* sp. y a las 48 h para *T. reesei*, mientras que *Candida utilis* mostró un crecimiento pobre aún a los 7 días, motivo por el cual fue descartada.

Con las cepas de levaduras seleccionadas se condujeron experimentos en escala de frascos agitados utilizando el medio de cultivo 2 a fin de comparar su rendimiento proteico. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 2.3. Como se puede apreciar, tanto los valores volumétricos de proteína como los de rendimientos proteicos  $Y_{p/o}$  (Proteína producida/Glúcidos solubles consumidos) son mayores en el caso de *S. lipolytica*, motivo por el cual fue seleccionada para el resto de los ensayos. Al final del proceso se alcanzó un tenor de proteínas del orden del 13 % en base seca que se considera adecuado para una dieta alimentaria de bovinos (Anónimo, 1978).

Tabla 2.3: Resultados obtenidos en escala de erlenmeyer con levaduras.

Tiempo de proceso (h)	Vol. de NaOH 1N (mL.L <sup>-1</sup> )		Peso seco (g.L <sup>-1</sup> )		Proteína (g.L <sup>-1</sup> )		Glúcidos solubles (g.L <sup>-1</sup> )		Y <sub>p/g</sub>	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Cepa										
0	-	-	88,5	88,9	2,9	3,0	33	32	-	-
11,3	20	20	87,5	86,4	3,7	4,2	29	27	0,20	0,24
23,1	46	44	85,2	81,9	6,0	6,4	18	18	0,21	0,24
34,6	50	56	83,4	77,4	7,5	8,5	11	9	0,21	0,24
48,0	50	56	81,6	74,0	8,9	9,9	4	2	0,20	0,23

1: *Candida* sp.  
2: *S. lipolytica*.

En la Tabla 2.4 se muestran los resultados obtenidos en escala de fermentadores agitados utilizando el medio de cultivo 2. En este caso se diluyó con 33 % de agua debido a que originalmente no se obtenía un buen mezclado en el reactor. Como se puede apreciar, los valores de Y<sub>p/g</sub> hallados son similares a los obtenidos en erlenmeyers. Además, los niveles volumétricos de proteína logrados, si bien son menores, guardan una relación proporcional a la dilución efectuada al medio de cultivo con un porcentaje de proteína en base seca del orden del 12,5 %.

Tabla 2.4: Resultados de las experiencias en tanques agitados con *S. lipolytica*.

Tiempo de proceso (h)	Vol. de NH <sub>4</sub> OH (mL.L <sup>-1</sup> )	Peso seco (g.L <sup>-1</sup> )	Proteína (g.L <sup>-1</sup> )	Glúcidos solubles (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/g</sub>
0	0	66,3	2,3	25	-
4,2	1,0	65,2	2,9	22	0,20
8,2	2,0	62,6	4,2	16	0,22
14,2	5,9	59,2	5,9	7	0,19
19,8	6,8	57,4	6,8	3	0,27
24,2	6,8	56,8	7,1	1	0,15

Los resultados anteriores muestran una gran similitud entre ambos procesos, pero en este último el tiempo empleado es del orden del 50 % del anterior. Puesto que la única condición distinta es el mayor grado de aeración en los fermentadores, es lógico suponer que la cinética del proceso, y no el rendimiento del mismo, está

gobernada por la velocidad de suministro de oxígeno al medio de fermentación. Este hecho indica la incapacidad de la cepa empleada de utilizar anaeróbicamente los azúcares presentes en el orujo. Para confirmar esta hipótesis, se incubó *S. lipolytica* en condiciones anaeróbicas usando medios mínimos que contenían como fuente de carbono glucosa, fructosa, sacarosa y jugo de orujo de manzana, no observándose en ninguno de ellos la producción de gas ni de etanol en coincidencia con los datos bibliográficos hallados para esta cepa (Rose, A.A. and Harrison, J.H., 1970).

De este último experimento se concluye que para poder llevar a cabo la transformación del orujo en escala de fermentadores de laboratorio es necesaria una dilución adicional del medio de cultivo, que ocasiona un menor aprovechamiento del volumen útil del reactor y un incremento en los costos de secado a que debería ser sometido el producto final en caso de ser necesario para su comercialización. Por ello se pensó en modificar las propiedades reológicas del medio de cultivo, principales causantes de los problemas de agitación, mediante una degradación biológica de los componentes del orujo de manzana responsables de su alta viscosidad, fundamentalmente pectina y fibra. La utilización de preparados enzimáticos comerciales (Miller, J.E. y col., 1982) fue descartada en razón de su alta incidencia en el costo final del producto. Como vía alternativa se pensó en la producción "in situ" de un conjunto enzimático con capacidad celulolítica y pectolítica. A tal efecto se eligió al *T. reesei* QM 9414 en razón de su probada capacidad en la producción de este tipo de enzimas (Montenecourt, B.B. y col., 1980; Haltmeier, T. y col., 1983) y aptitud para la alimentación animal, con el doble propósito de disminuir la viscosidad y de aumentar la cantidad de glúcidos metabolizables.

Ensayos preliminares realizados con el medio de cultivo 2, en frascos agitados, muestran una marcada competencia con predominio de la flora natural presente en el orujo sobre el desarrollo del hongo,

con la consecuente reducción en el rendimiento del proceso. A fin de evitar este inconveniente, debido a la carga microbiana inicial del sustrato y a la mayor velocidad de crecimiento de los contaminantes, se decidió efectuar un pretratamiento térmico del orujo de manzana. La esterilización con vapor a sobrepresión fue descartada en razón del alto costo industrial para este tipo de materiales debido a las dificultades que presentan en cuanto a la transferencia de calor (se efectúa con una gran componente de conducción y escasa convección) y la necesaria utilización de equipos con mayor resistencia mecánica y, por lo tanto, más costosos. Una de las alternativas posibles es un tratamiento térmico a presión atmosférica, previa adición de una cantidad adecuada de ácido, con dos fines específicos: favorecer la disminución de la viscosidad del medio de cultivo y reducir el contenido de la flora normal. Además, la combinación de acidez-temperatura puede actuar también produciendo una hidrólisis parcial de las sustancias pécticas y de la fibra, incrementando la cantidad de sustratos disponibles para el crecimiento de los microorganismos (Reese, E.T. y col., 1972; Fan, L.T. y col., 1982).

Las hipótesis anteriores fueron confirmadas efectuando medidas de viscosidad empleando un equipo ROTO-VISCO (HAKE Inc.) en el orujo de manzana sin y con pretratamiento previo, observándose en este último caso una disminución a un tercio de la original. Además, se encontró un 20 % de incremento en la cantidad de azúcares solubles. Por otra parte, los medios de cultivo 2 y 3 se incubaron anaeróbicamente sin sembrar durante 48 h a 30 °C observándose una mayor producción de gas y 10 veces más de etanol (medido por cromatografía gaseosa) cuando no se pretrató el orujo que cuando se lo hizo, con lo cual se demuestra la efectividad del pretratamiento.

Nuevas experiencias en escala de erlenmeyers agitados, utilizando *T. reesei* en el medio de cultivo 3, arrojaron los resultados que se indican en la Tabla 2.5 donde se puede observar que a las 48 h de

proceso se alcanzan niveles de proteína similares a los de los procesos conducidos con levaduras, correspondientes a un 15 % del peso seco. En las etapas posteriores de cultivo no se observa aumento de la cantidad de proteína producida, aunque el valor porcentual en peso seco llega hasta el 19 % a las 90 h. Este efecto no se debe a un incremento en la síntesis de proteínas sino, mas bien, es el resultado de la disminución del peso seco debida a la hidrólisis y posterior metabolización de material insoluble con formación de CO<sub>2</sub>, la cual va acompañada por una licuefacción en el medio de cultivo pero no de síntesis de biomasa.

Tabla 2.5: Resultados obtenidos en escala de erlenmeyers agitados empleando *T. reesei*.

Tiempo de proceso (h)	Volumen de NH <sub>4</sub> OH (mL.L <sup>-1</sup> )	Peso seco (g.L <sup>-1</sup> )	Proteína (g.L <sup>-1</sup> )
0	0	87,0	2,9
25,5	2,4	67,4	4,7
48,0	3,6	60,7	9,1
72,0	4,8	54,4	9,2
90,8	4,8	48,0	9,2

### 2.3.2. Ensayos en sistema de cultivo discontinuo con alimentación controlada.

En virtud de las anteriores observaciones, se pensó en la posibilidad de trabajar en un sistema con alimentación de sustrato, comenzando con un medio de cultivo diluido e ir adicionando, en función de algún parámetro de proceso, porciones de uno más concentrado hasta llegar a una relación final de sólidos mayor que la que se puede lograr en sistemas discontinuos por los problemas de agitación ya descritos. Para tal fin se empleó el dosificador de sustratos pastosos ya mencionado con la alimentación controlada mediante la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo.

Para demostrar la factibilidad del sistema se efectuaron ensayos con *T. reesei* en el medio de cultivo 3 diluido 2,2 veces y se



cargó al dosificador con el mismo medio sin adición de agua y sin neutralizar a los efectos de evitar el desarrollo de contaminantes. La evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante la etapa de alimentación se grafica en la Fig. 2.3. El resto de los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.6 donde podemos observar que los niveles volumétricos de proteína alcanzados no difieren substancialmente al de los procesos anteriores, observándose un descenso en la concentración proteica durante la etapa de adición, lo que indica que la velocidad de síntesis proteica es inferior a la de alimentación de sustrato. No obstante, el rendimiento total del proceso se ve incrementado debido al mejor aprovechamiento del volumen útil del reactor puesto que el peso seco se incrementa en un 27 % a lo largo del proceso.

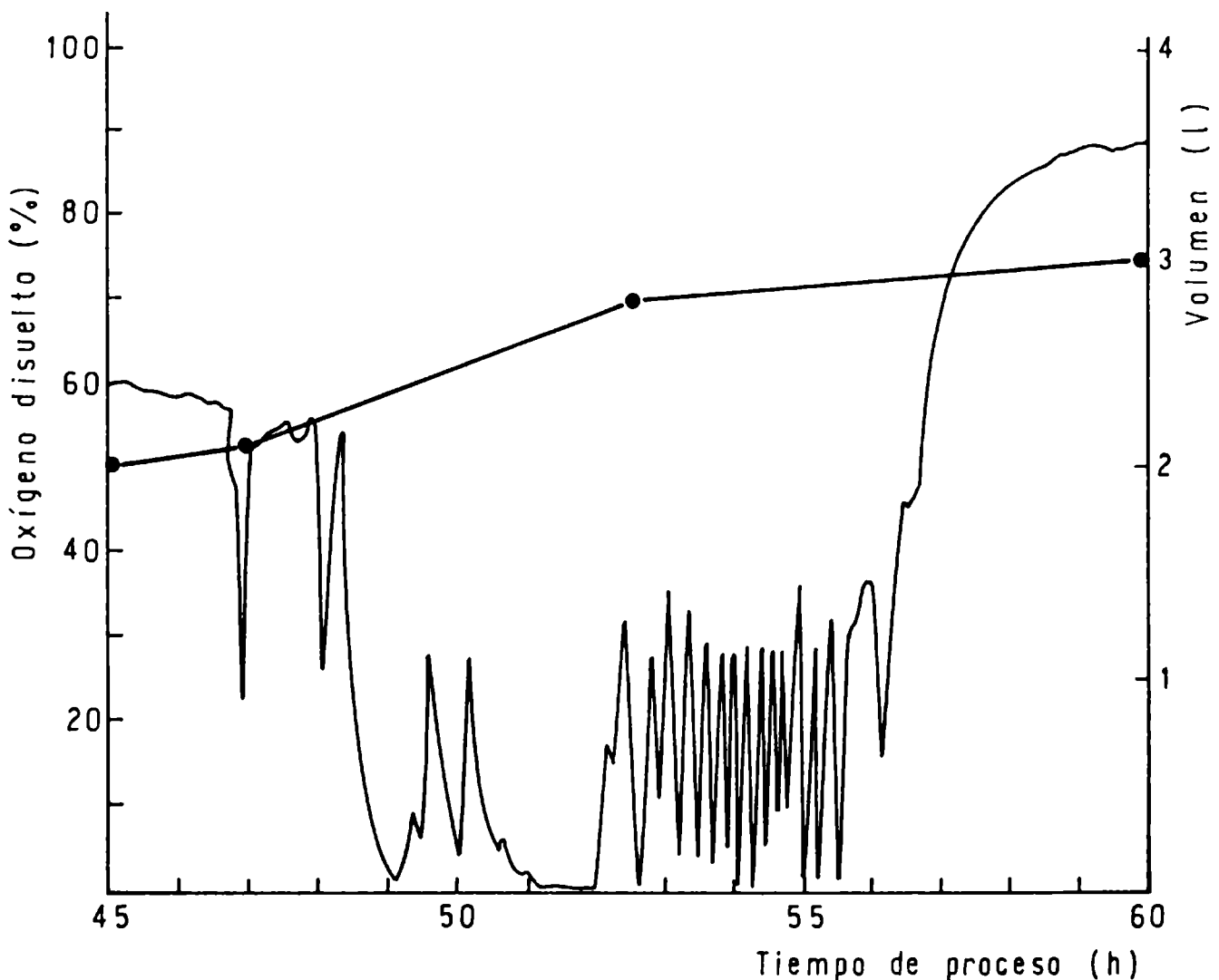


Fig. 2.3. Oxígeno disuelto y volumen total de un proceso discontinuo alimentado.

Tabla 2.6: Resultados obtenidos en cultivo discontinuo alimentado en fermentadores agitados empleando *T. reesei*.

Tiempo de proceso (h)	Volumen de NH <sub>4</sub> OH (mL.L <sup>-1</sup> )	Peso seco (g.L <sup>-1</sup> )	Proteína (g.L <sup>-1</sup> )
0	0	39,0	1,4
8,0	1,0	35,0	1,6
22,5	2,0	30,5	1,9
31,0	4,5	29,1	2,9
47,0	9,5	33,3	2,7
52,5	16,7	42,5	5,1
60,0	22,0	49,5	7,5

La alimentación de sustrato se realizó en el periodo comprendido entre las horas 45 y 55 de proceso.

De los descripto anteriormente se puede inferir que en esas condiciones de trabajo la cinética limitante del proceso es la velocidad de crecimiento del hongo. A fin de salvar este inconveniente, se diseñaron experimentos con cultivos mixtos de levadura y hongo en sistema discontinuo alimentado. En ellos se intentó aprovechar la mayor eficacia de conversión de orujo a proteína por parte de *S. lipolytica* (medida como Proteína producida/Disminución de peso seco) que determinada en los procesos en erlenmeyers es el doble que los valores obtenidos para el hongo y su mayor velocidad de crecimiento. Por otra parte, la capacidad hidrolítica de las enzimas producidas por *T. reesei* favorecería la disminución de la viscosidad del medio de cultivo.

Los inóculos de estos procesos consistieron en 800 mL de un cultivo en erlenmeyer de *S. lipolytica* de 12 h de desarrollo en el medio de cultivo 4 y 500 mL de cultivo en erlenmeyer de *T. reesei* de 72 h desarrollado en el medio 3, al cual se le agregó 300 g de orujo pretratado y se completó a 2 L con agua y el resto de los componentes del medio 3. El dosificador fue cargado como en el caso anterior con el medio 3 sin adición de agua y sin neutralizar. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 2.4.

Como se puede observar, hasta aproximadamente la hora 20 de proceso desarrollado en forma discontinua, no existen variaciones importantes de masa de caldo debido al efecto compensatorio del

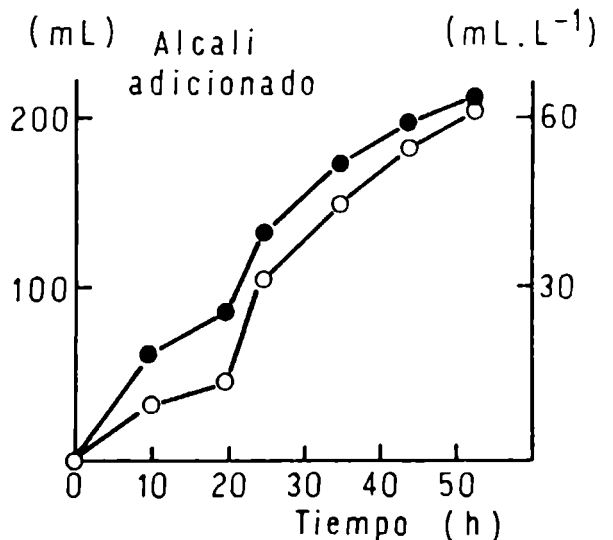
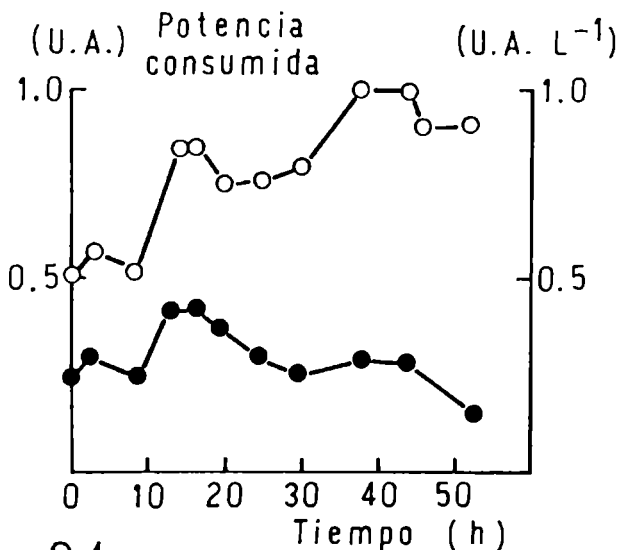
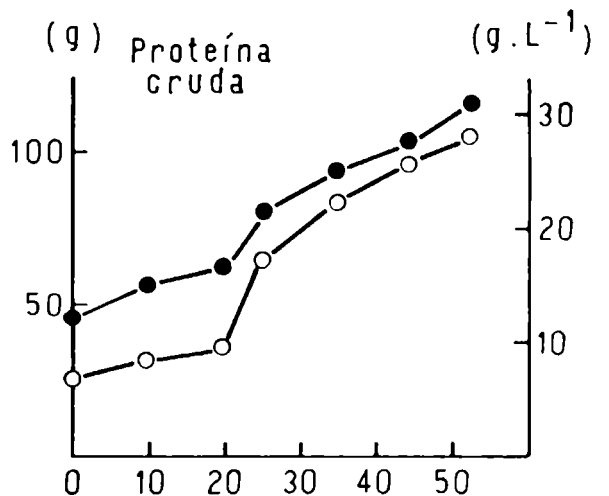
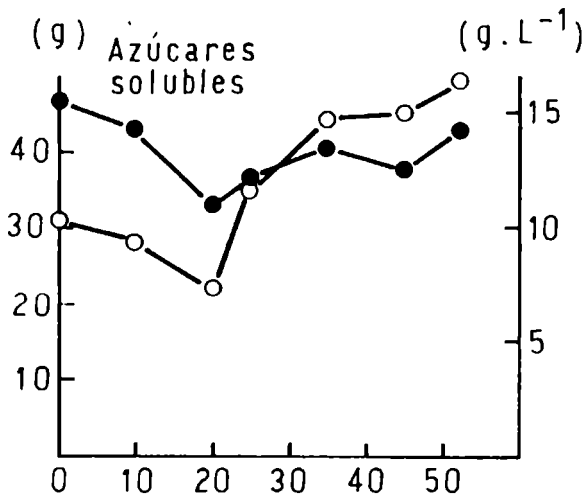
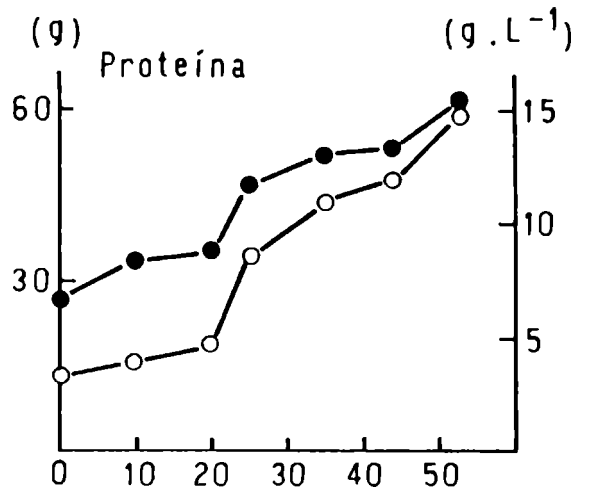
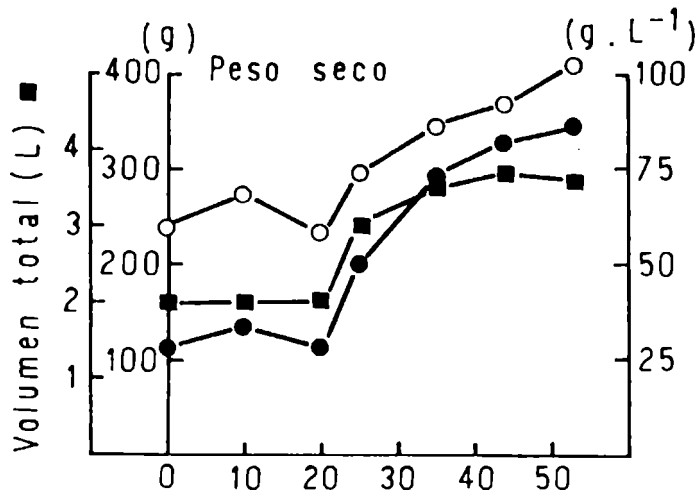


Fig.2.4. Cultivo mixto alimentado.

○ Valores totales sobre el eje izquierdo de ordenadas.

● Valores volumétricos sobre el eje derecho de ordenadas.

La alimentación se realizó entre las horas 20 y 50 de proceso.

agregado de álcali. Consecuencia de esto es que se mantuvo una buena proporcionalidad entre los valores volumétricos y totales de los demás parámetros. En este intervalo, el oxígeno disuelto descendió a valores del 40 % para subir lentamente al valor de 80 % al final del mismo, dándose así inicio al cultivo alimentado.

Los azúcares solubles mostraron un comportamiento que no se corresponde con los valores de proteína y álcali consumido. Esto podría estar asociado a una disolución de pectinas presentes en el orujo que interfieren cooperativamente en la medida de azúcares por el método de antrona, siendo responsables, junto con la desagregación mecánica de los sólidos en suspensión, del aumento de viscosidad del medio que se traduce en un aumento de la potencia consumida. Por otra parte debe tenerse en cuenta la actividad hidrolítica presente en el inóculo en la liberación de glúcidos solubles y modificación de las propiedades reológicas del sistema.

La etapa de cultivo alimentado podría ser considerada como una sucesión de estados transitorios debido al hecho de que se efectuaron adiciones discretas en forma de pulsos controlados con una velocidad de alimentación de sustrato cambiante en función de la respuesta del cultivo.

A excepción de las divergencias observadas entre las curvas correspondientes al consumo de potencia, el resto de los parámetros muestran un comportamiento acorde al agregado de sustrato fresco. Los valores de consumo de potencia por unidad de volumen observados muestran la ventaja del empleo de cultivos mixtos en este tipo de sistema puesto que se produce una importante disminución en el valor de este parámetro.

Con respecto a la producción de proteínas se debe resaltar que se alcanzan valores volumétricos del orden de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  que duplican a los obtenidos en procesos anteriores con un 15,6 % de proteína en peso seco.

## 2.4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las experiencias descritas indican la factibilidad técnica del enriquecimiento proteico del orujo de manzana por vía fermentativa, lográndose un producto de composición apta para su utilización en la elaboración de alimentos balanceados para animales rumiantes. En la Tabla 2.7 se muestra la composición química del producto final seco comparada con la de alfalfa, lo que sugiere que solamente se requeriría un ajuste en el contenido de fibra.

Tabla 2.7: Composición química (% es base seca) comparativa del orujo de manzana fermentado y de la alfalfa (*Medicago sativa*).

	Orujo de manzana fermentado	Alfalfa
Proteínas	15,6	16,1
Fibra cruda	9,1	30,0
Lípidos crudos	4,1	3,7
Carbohidratos totales	37,0	41,0
Cenizas	8,9	9,0

Por otra parte, debe resaltarse el hecho de que para estas experiencias se ha empleado un orujo parcialmente degradado por la flora natural con rendimientos interesantes, lo que abre la posibilidad de que con el uso de un material fresco se obtengan mejores resultados. Una prueba de ello fueron los valores logrados usando una pequeña partida de orujo fresco (que fue congelado inmediatamente a la salida de la prensa y mantenido en esa condición hasta su empleo para evitar la proliferación microbiana) en los medios de cultivo 2 y 3 en procesos en erlenmeyer con *T. reesei*, donde se alcanzaron tenores del 19 al 22 % de proteína en el producto final seco. Estos valores permitirían el uso de este producto en la alimentación de animales monogástricos, que son más exigentes en cuanto al nivel proteico requerido en sus dietas.

Además se ha demostrado que el empleo de un sistema discontinuo alimentado en forma controlada permite el establecimiento de una

población mixta con mayores rendimientos en proteína por unidad de volumen y buenos niveles en el producto final seco, al mismo tiempo que reduce el consumo de potencia por unidad de volumen a valores inferiores a los correspondientes a un sistema orujo de manzana-agua doblemente diluido.

Nuevas experiencias en escala mayor con una posterior evaluación del producto obtenido en animales de experimentación permitirán determinar la utilidad y la rentabilidad del proceso. A tal efecto se requirió la colaboración de industriales jugeros, ya que la infraestructura de nuestros laboratorios no lo permitía. Sin embargo y como se dijo en la Introducción de esta Tesis, la mencionada colaboración que en un principio se nos había prometido no se logró, por lo que lamentablemente no podemos aseverar que este tipo de procesos pueda tener un rédito económico significativo.

Es importante resaltar un problema que puede plantearse desde el punto de vista económico y que se refiere al costo de secado del producto final de la fermentación. En este sentido es interesante tener presente la posibilidad de consumir el alimento en fresco como tal sin necesidad de secado, o bien complementando la fermentación con una etapa de anaerobiosis utilizando bacterias lácticas y consumirlo igualmente en fresco. Esta posibilidad fue demostrada en nuestro país en la producción de un alimento para animales que contenía entre 75 y 80 % de agua, utilizado en alimentación de vacunos a corral y que podía conservarse durante 30 días sin alteraciones (Díaz Lozana, J. y Ertola, R., 1979).

Finalmente, debe resaltarse que la experiencia adquirida con respecto al manejo de un sustrato con las peculiaridades del orujo de manzana facilitó el desarrollo de los trabajos que constituyen el capítulo 4 de esta Tesis que se refiere a la producción de enzimas pectolíticas.

## 2.5. REFERENCIAS

- Anónimo (1978). The National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle. En: Nutrient requirements of domestic animals, pág. 76. Washington D.C.
- Anónimo (1985). Neuquén, su problemática y su desarrollo. Boletín de la Secretaría del Consejo de Planificación y Acción para el Desarrollo (COPADE), Ministerio de Obras Públicas, Prov. de Neuquén.
- AOAC (1970). Official Methods of Analysis, 11<sup>ª</sup> Edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Cabib, G.; Silva, H., Giuliotti, A. y Ertola, R. (1983). The use of sugar can stillage for single cell protein production. J. Chem. Tech. Biotech. 33 B, 21-28.
- Da Silva, E.J. (1981). Microbial Biotechnology: A Global Pursuit. Process Biochem. 16, 4, 38-44.
- Diaz Lozana, J. y Ertola, R. (1979). Resúmenes del III Congreso Argentino de Microbiología, D 129, Buenos Aires.
- Fan, L.T.; Lee, Y.H. and Gharpurkar, M.M. (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. Adv. Biochem. Eng. 23, 157-187.
- Gaden, E.L. (1974). Substrates for SCP Production. En: Single Cell Protein, 52-53. Davis. P. (ed.). Academic Press.
- Haltmeier, T.; Leisola, M.; Ulmer, D.; Walser, R. and Fiechter, A. (1983). Pectinase from *Trichoderma reesei* QM 9414. Biotechnol. Bioeng. 25, 6, 1685-1690.
- Herbert, D.; Phipps, P.J. and Strange, R.E. (1971). Chemical analysis of microbial cell. En: Methods in Microbiology 5B, 209-344. Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (eds.). Academic Press, London and New York.
- Humphrey, A.E. (1969). Engineering of Unconventional Protein Production. Chem. Eng. Progress Symp. Series 65, 60-65.
- Jenkins, G.L.; DuMez, A.G.; Christian, J.E. y Hager, G.P. (1951). Química Farmacéutica Cuantitativa, 3<sup>ª</sup> Ed. Edit. Atlante S.A.

México DF.

- Mandels, A. and Weber, J. (1969). The production of cellulases. En: Gould, R.F. (ed.). Cellulases and their applications, 391-414. Adv. Chem. Soc. Washington DC.
- Mateles, R.I. and Tannenbaum, S.R. (1968). Single Cell Protein. Economic Botany 22, 1, 43-50.
- Mendel, V.E. y Clawson, W.J. (1977). Dónde instalar una explotación de engorde a corral. En: Engorde a corral, cap. 1. Dyer, I.A. and O'Mary, C.C. (eds.). Edit. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Miller, J.E.; Weathers, J.; McConville, F.X. and Goldberg, M. (1982). Saccharification and ethanol fermentation of apple pomace. En: Fourth Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation, 183-191. Scott, C.D. (ed.). J. Wiley and Sons, New York.
- Montenecourt, B.S.; Kelleher, T.J.; Eveleigh, D.E. and Petterson, L.G. (1980). Biochemical nature of cellulases from mutants of *Trichoderma reesei*. En: Scott C.D. (ed.). Second Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation, 15-26. J. Wiley and Sons, New York.
- Nicol, B. (1974). Recent developments in the status of international food and nutrition. En: Single Cell Protein, Proceedings of the International Symposium, Rome, Italy, November 7-9, 1973, págs. 7-24. P. Davis (ed.). Academic Press.
- Reese, E.T.; Mandels, M. and Weiss, A.H. (1972). Cellulose as a novel energy source. En: Adv. Biochem. Eng. 2, 181-200. Ghose, T.K.; Fiechter, A. and Blakebrough, N. (eds). Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin.
- Riviere, J. (1977). Industrial Applications of Microbiology, pág. 106. Moss, M.O. and Smith, J.E. (eds.). John Wiley and Sons. Inc.
- Rose, A.A. and Harrison, J.H. (1970). The yeasts, vol 3. Academic Press, London-New York.
- Schaffeld, G. and Illanes, A. (1982). Determination of cell mass in an insoluble lignocellulosic substrate in submerged fermentation. Biotechnol. Lett. 4, 10, 667-672.



-- Valenciano, O.A. (1980). Posibilidades de incrementar la producción y consumo de alimentos proteicos. Ministerio de Salud, Provincia de Buenos Aires.

## CAPITULO 3: FERMENTACION DE SUSTRATOS SOLIDOS

### 3.1. INTRODUCCION

Los trabajos correspondientes al capítulo 4, que se refiere a la producción de enzimas pectolíticas, fueron desarrollados mediante una técnica de cultivo llamada fermentación de sustratos sólidos. Este no es un procedimiento muy difundido en el campo de la Biotecnología, por lo que creo conveniente la inclusión de un capítulo previo donde se describan los aspectos más importantes de este tema. Entre ellos merecen citarse una referencia general a esta metodología, distintos ejemplos donde se pone en práctica y una comparación final con los clásicos procesos en medios líquidos agitados.

La denominación de fermentación de sustratos sólidos (FSS) proviene de la traducción del inglés de "solid substrate fermentation", expresión empleada para designar a "toda fermentación en la cual el sustrato no está en estado líquido" (Hesseltine, C.W., 1972). Más precisamente se podría decir que son aquellos procesos donde el sustrato no está ni solubilizado ni en suspensión en un gran volumen de agua.

Esta tecnología no debe ser confundida con la antigua denominación de cultivo en superficie, ya sea sobre sustratos líquidos o sólidos, que se refiere fundamentalmente al tipo de crecimiento del microorganismo empleado (Moo-Young, M. y col., 1983). En la práctica, las FSS se llevan a cabo sobre medios pastosos de alta densidad en ausencia de líquido libre, originando los llamados sistemas de cultivo semi sólidos o sólidos según el caso.

Una diferencia substancial que existe entre el desarrollo de los microorganismos en un medio líquido con sólidos en solución frente al que tiene lugar sobre un sustrato sólido es que en el primer caso la totalidad de los nutrientes es igualmente accesible y está homogéneamente distribuída, mientras que en el otro no lo

es, al menos inicialmente. Aquí, la cantidad neta de sustratos metabolizables puede aumentar, permanecer constante o disminuir durante el proceso, en cambio en un medio líquido siempre disminuye (Knapp, J.S. and Howell, J.A., 1980).

Los sustratos normalmente empleados en las FSS son sólidos porosos, granos de cereales, productos vegetales o minerales granulados o fragmentados. En ellos el agua se encuentra bajo la forma de agua de constitución o ligada a los sólidos mediante diferentes tipos de fuerzas (covalentes, iónicas, higroscópicas o capilares). En ningún caso el agua puede ocupar la totalidad de los espacios libres y no debe de escurrir libremente (Raimbault, M., 1980).

No es fácil establecer un rango exacto de humedad entre los cuales tiene lugar este tipo de fermentaciones. El límite inferior está dado por un 12 % por debajo del cual cesa toda actividad biológica (Golueke, C.G., 1977). El límite superior depende de la capacidad de absorción de líquido del sustrato empleado que, por ejemplo, en el caso de la corteza de arce es del 40 % y en la paja de trigo del 75 % (Cannel, E. and Moo-Young, M., 1980 a). En la mayoría de los sustratos empleados empieza a aparecer líquido libre por encima del 80 % de humedad.

Existen muchos microorganismos capaces de desarrollar sobre sustratos sólidos pero los que mejor se adaptan son los hongos filamentosos. Esto es lógico ya que ellos crecen en el medio ambiente sobre materiales tales como madera, hojas y restos vegetales con baja humedad. Un caso extremo lo encontramos en *Eurotium halophilicum* capaz de crecer sobre granos de trigo con una humedad de sólo el 13-14 %. Las bacterias y levaduras pueden hacerlo con niveles de humedad entre el 40 y 70 % como en el caso del compost y el ensilado.

Los *Streptomyces* no han sido ensayados en FSS aunque es probable que lo hagan satisfactoriamente. Una referencia cita la elaboración de un preparado destinado a alimentación animal a partir del cultivo de *Streptomyces aureofaciens* sobre granos de mijo (Hesseltine,

C.W., 1977 a).

Entre los hongos existen varios géneros que se han empleado en mayor extensión en las FSS. Ellos son los *Mucor* y *Rhizopus* dentro de los Phycomycetes, los *Aspergillus* y los *Penicillium* en los Ascomycetes y los llamados "white rot fungi" en los Basidiomycetes.

La utilización de sustratos sólidos no es reciente y existen numerosas fermentaciones alimentarias basadas en este tipo de procesos que han sido practicadas con técnicas tradicionales desde hace muchos años. Por otra parte, sus aplicaciones han contribuido al desarrollo de la microbiología industrial y de la biotecnología debido a que, en algunos casos dan caminos alternativos de producción y, en otros, son la única vía de elaboración de un determinado producto.

### 3.2. DISTINTOS EJEMPLOS DE FERMENTACION DE SUSTRATOS SOLIDOS

En la naturaleza los sustratos sólidos tales como residuos animales y vegetales, madera, restos de cultivos, frutos, etc., sufren una serie de procesos microbianos que los degradan y transforman. Normalmente, los ciclos biológicos incluyen una sucesión de colonizaciones de microorganismos que finalizan con la eliminación de la materia orgánica. Desde un punto de vista industrial, esta clase de procesos puede ser aprovechada controlando su evolución de diversos modos como, por ejemplo, mediante el empleo de un tipo específico de microorganismo cuando se desea obtener un determinado producto o variando las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el proceso. A continuación se resumen las principales características de distintos ejemplos de FSS.

Las FSS pueden clasificarse de acuerdo a los microorganismos empleados si éstos son propios del sustrato a ser fermentado o, si por el contrario, se los agrega exprofeso. Dentro del primer tipo se encuentra el ensilado cuyo objetivo es la conservación de alimentos

para animales por largos periodos de tiempo. Para ello se forman montículos (parvas) de materiales de origen vegetal que se dejan fermentar libremente con un desarrollo predominante de lactobacilos. Durante el proceso se produce ácido láctico que baja el pH a valores que impiden el desarrollo de otros microorganismos con lo que se logra la estabilización del material (Prescott, S.C. and Dunn, C.G., 1949).

Otro proceso con flora nativa es el compost en el cual, a la inversa del caso anterior, lo que se busca es la mayor degradación posible del sustrato. Para ello se emplean diversos sustratos tales como materiales vegetales, estiércol, residuos urbanos, etc., que sufren un ataque por la flora termófila con formación de un producto destinado generalmente al uso como fertilizante.

Dentro de las FSS con cultivos puros de microorganismos encontramos a la producción de quesos fermentados cuyo ejemplo típico es el roquefort. Otro caso es el cultivo de hongos comestibles tales como *Agaricus bisporus* y *Volvariella volvacea* sobre compost especiales (Hayes, W.A. and Nair, N.G., 1975). Sin embargo, el ejemplo más importante lo constituyen las fermentaciones alimentarias orientales ya que han constituido la base sobre la cual se han desarrollado la mayoría de las FSS en escala industrial. Existe una cantidad de ellas que son practicadas en China, Corea, Japón y el sudeste de Asia, en número superior al de 80 (Hesseltine, C.W., 1965). En la mayoría de estos casos, el proceso no implica un aumento en la cantidad del alimento sino más bien en su calidad, particularmente en las posibilidades de conservación, sus propiedades físicas, color, aroma y sabor. Por otra parte, estas fermentaciones permiten eliminar factores antinutricionales como los presentes en los granos de soja.

Una característica común de estas fermentaciones es que generalmente poseen al menos una etapa realizada en sustrato sólido y que los microorganismos empleados son hongos.

Desde un punto de vista bromatológico podemos decir que en

ellas se producen enzimas con propiedades digestivas (amilasas, celulasas, proteasas, lipasas, etc.), se destruyen gustos y aromas desagradables que son reemplazados por otros agradables, se agregan vitaminas y se aumenta la digestibilidad del alimento.

Uno de los ejemplos más representativos es la elaboración del koji que es un preparado enzimático producido mediante el cultivo de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus soyae* sobre arroz cocido u otros cereales. Su uso es similar al de la malta en los países occidentales ya que es un intermediario en la elaboración de otros alimentos como son la salsa de soja, el sake (una bebida alcohólica tradicional) y el miso (una pasta para untar usada en los desayunos o como base para sopas).

Finalmente, el tempeh es una comida indonesia obtenida mediante la fermentación de granos de soja con *Rhizopus oligosporus* durante 24 h, constituyendo una fracción importante en la dieta diaria de los habitantes de aquel país (Martinelli, A. and Hesseltine, C.W., 1964).

### 3.3. APLICACIONES INDUSTRIALES DE LA FERMENTACION DE SUSTRATOS SOLIDOS

Más allá de la fabricación de alimentos fermentados, que en ciertos casos son producidos en gran escala (koji, miso, salsa de soja, tempeh) fundamentalmente en el Japón, las FSS han dado lugar a diferentes aplicaciones industriales para la producción de enzimas y metabolitos. La mayor parte de estas aplicaciones derivan directamente de los procedimientos tradicionales y han sido optimizadas sobre todo por científicos japoneses. A continuación se resumen algunos de los ejemplos más representativos de estos procesos.

#### 3.3.1. Producción de enzimas.

3.3.1.1. Amilasas. A principios de siglo tuvo lugar en occidente la introducción de un procedimiento similar a la elaboración del koji

(Takamine, J., 1914). Este se basa en el desarrollo de *A. oryzae* sobre una mezcla de afrecho de trigo y de almidón de trigo, arroz o maíz, humidificada con una solución con sales minerales. La masa se coloca sobre bandejas metálicas perforadas en una cámara donde son esterilizadas por vapor y luego inoculadas con una suspensión de esporos. El proceso se desarrolla a 30 °C con humedad controlada durante varios días en los cuales se produce un abundante micelio y una esporulación intensa. La masa fermentada es finalmente secada, molida y mezclada con inertes hasta llevar la actividad amilolítica a los valores deseados. En el caso de necesitar enzimas con mayor grado de pureza se puede llevar a cabo una extracción, filtración y precipitación con solventes o sales. Este proceso de producción se conoce como "mouldy bran process". Una alternativa es reemplazar las bandejas de cultivo por cilindros rotatorios que giran lentamente (1 vuelta por min) alrededor de un eje horizontal a los efectos de exponer todo el sustrato al aire y de homogeneizar el medio de cultivo.

3.3.1.2. Celulasas. Las celulasas son empleadas como suplementos en raciones para animales, como componente en medicamentos digestivos, para el aislamiento de proteínas vegetales, en la elaboración de productos alimenticios y en la degradación de residuos celulósicos (Toyama, N., 1969).

Una metodología clásica para la producción de estas enzimas consiste en el cultivo de *Trichoderma reesei* sobre un medio sólido compuesto por afrecho de arroz y germen de trigo o de arroz en una relación de 4 a 1. Se incuba la masa a 25-30 °C durante 4 días obteniéndose una actividad de alrededor de 1500 FPU.mg<sup>-1</sup> (filter paper units) (Toyama, N., 1976).

En nuestro país se han desarrollado estudios relativos a la producción de estas enzimas mediante FBS con distintas especies del género *Trichoderma*, utilizando bagazo de caña de azúcar y afrecho de trigo en diferentes modelos de reactores a escala de

laboratorio. Se ha encontrado que la cinética de formación de los distintos componentes del complejo enzimático producido se encuentra desplazada con respecto a la hallada en cultivos sumergidos (Alurralde, J.L. y col., 1987).

3.3.1.3. Otras enzimas. Industrialmente se producen otras enzimas en cultivos sólidos entre las que se pueden mencionar las proteasas, pectinasas y lipasas. En la Tabla 3.1. se detallan las enzimas producidas, los microorganismo productores y el uso a que se destinan.

Tabla 3.1: Diferentes enzimas producidas en cultivos sólidos (adaptada de Simon, P. & Meunier, R., 1970).

Enzima	Microorganismos productores	Utilización
Amilasas	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Sacarificación del almidón. Panificación. Industrias textil, papeleras y alimenticia.
Invertasas	<i>S. carlsbergensis</i>	Elaboración de azúcar invertido.
Proteasas	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Mucor</i> <i>Clostridium</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas putida</i>	Hidrólisis de proteínas. Clarificación de cerveza. Curtiembres. Detergentes.
Celulasas	<i>Trichoderma konigii</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Aspergillus niger</i>	Degradación de celulosa. Industria farmacéutica. Tratamiento de residuos.
Pectinasas	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Botrytis sp.</i>	Clarificación de jugos de frutas y vinos. Industria alimenticia.
Lactasas	<i>Candida pseudotropicalis</i>	Industria láctea.
Lipasas	<i>Candida lipolytica</i>	Industria láctea.

### 3.3.2. Producción de metabolitos.

Existen distintos casos de FSS para la producción de metabolitos. Uno de ellos es la extracción de ácido gálico para lo cual se hace desarrollar un *Aspergillus niger* sobre las agallas



de roble. Esto conduce a la hidrólisis de los ésteres y glucósidos del vegetal con liberación del citado ácido que puede separarse por lixiviación (Ikeda, Y. y col., 1972).

Otro ejemplo es el ácido cítrico para lo cual se utilizan cepas de *A. niger* que se hacen desarrollar sobre residuos fibrosos amiláceos (papa con paja de trigo). Completado el proceso, la masa fermentada se extrae con agua y el ácido se purifica (Hisanaga, W. and Nakamura, S., 1966).

En los últimos años se han producido micotoxinas tales como aflatoxina y ocratoxina por FSS sobre granos de arroz o trigo. Los rendimientos fueron muy superiores a los obtenidos en medios líquidos tradicionales (Lindenfelser, L.A. and Ciegler, A., 1975).

#### 3.4. CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO FUNGICO SOBRE SUSTRATOS SÓLIDOS

Los hongos filamentosos desarrollan en cultivos sobre sustratos sólidos de distinto modo que como lo hacen en medios líquidos agitados. En un típico tanque de fermentación el micelio crece en tres dimensiones, tanto en la forma de desarrollo filamentosos como en pellets. Sobre una superficie bidimensional como una placa de agar, los hongos crecen mediante un desarrollo apical en forma radial, predominantemente hacia la zona de mayor gradiente de concentración de nutrientes. La velocidad global de crecimiento es lineal y depende del diámetro de la periferia de la colonia en donde el desarrollo de las hifas es exponencial y la velocidad específica de crecimiento es similar a las encontradas en cultivos líquidos (Trinci, A.P., 1971).

Los materiales empleados en la mayoría de las FSS tales como paja, pasto, trozos de madera y granos de cereales tienen una superficie compleja que dificulta la realización de un modelo de crecimiento apropiado. El desarrollo se hace por extensión apical de las hifas sobre la superficie del sólido, pero la dirección y la velocidad con que lo hacen depende de la disponibilidad de los nutrientes y de las características geométricas del sustrato.

Una causa importante debido a la cual los hongos son capaces de crecer sobre sustratos sólidos en ausencia de agua es su capacidad de adhesión a las superficies. Muchos hongos pueden producir polisacáridos extracelulares con propiedades adhesivas (Corpe, W.A., 1980). Además, otros poseen estructuras de sostén tales como rizoides y haustorios que proveen medios mecánicos de unión a los sólidos. Por otra parte, la capacidad hidrolítica debida a la liberación de enzimas al medio contribuye al crecimiento del micelio. Estas no sólo proveen sustancias metabolizables sino que también producen la perforación de los sustratos sólidos abriendo el camino por el cual las hifas pueden penetrar.

Esta particular forma de crecimiento fúngico sobre sustratos sólidos hace dificultosa la correcta evaluación de la biomasa en este tipo de cultivos. Muchas de las técnicas empleadas en cultivos sumergidos son inservibles en estos casos. En general se puede decir que es imposible la separación de la biomasa del resto del medio de cultivo por lo que para su medida se hace necesario la determinación de un componente de aquella y referirse al total en función de distintas correlaciones. Al respecto hay que tener en cuenta que estas correlaciones han sido obtenidos de cultivos en medios líquidos por lo que no siempre son válidas y su aplicación es limitada. Algunos de los componentes celulares que pueden emplearse son el ADN, el ARN, el ATP, las proteínas totales (Wang, D.I.C. y col., 1979) y el contenido de glucosamina (Swift, M.J., 1973; Nandi, B., 1978). También se pueden hacer medidas indirectas del crecimiento como lo son el consumo de  $O_2$  (Harris, D., 1979; Bajracharya, R. and Mudget, R., 1980) o de fuente de nitrógeno (Schaffeld, G. and Illanes, A., 1982), la producción de  $CO_2$  (Carrizalez, V. y col., 1981; Ramstack, J.M. y col., 1979) o la actividad de una determinada enzima como es el caso de la lacasa (Wood, D.A., 1979).

### 3.5. PROBLEMAS DIFUSIONALES EN LA FERMENTACION DE SUSTRATOS SOLIDOS

#### 3.5.1. Transferencia de materia.

3.5.1.1. Transferencia de materia entre partículas. La transferencia de materia, particularmente de  $O_2$  y de  $CO_2$ , desde los espacios vacíos hasta el microorganismo es un proceso de gran importancia en las FSS que depende de las características del sustrato y de su contenido de agua. Si la humedad es muy alta se disminuye la porosidad y tiende a inundarse el medio, por lo que la circulación de los gases se ve dificultada. Por el contrario, si los niveles de humedad son bajos se produce inhibición en el crecimiento de los microorganismos.

La transferencia de materia para una dada porosidad se ve facilitada por medio de un mezclado periódico del sustrato y por el pasaje forzado de aire a través de él. Si la fracción de espacios vacíos es alta esto último no es necesario ya que aquellos contienen suficiente volumen como para una adecuada oxigenación, aunque a veces es conveniente para facilitar la liberación del  $CO_2$  producido.

3.5.1.2. Transferencia de materia dentro de las partículas. Al respecto hay que considerar dos aspectos: la difusión de nutrientes dentro del sustrato y la degradación del partículas sólidas por medio de las enzimas liberadas al medio. En relación al primer punto, se puede hacer una comparación con la situación que tiene lugar dentro de los pellets en una fermentación en medios líquidos. Sin embargo, debe hacerse la salvedad de que en las FSS también hay que tener en cuenta las barreras difusionales que agregan los sólidos presentes por lo que en la actualidad no existen modelos que puedan predecir el comportamiento de estos sistemas.

En cuanto al segundo aspecto hay que tener en cuenta que el crecimiento de los microorganismos se hace a expensas de sustratos

solubilizados por la acción de sus enzimas. Si el medio es suficientemente poroso, las enzimas pueden difundir con mayor facilidad y la degradación ocurre dentro de la masa sólida. Luego, los productos de su acción catalítica deben difundir hasta la biomasa para poder ser asimilados. Para sustratos de menor porosidad, la actividad enzimática tiene lugar en las adyacencias de los microorganismos por lo que cobran importancia las enzimas unidas a su pared celular.

En muchos casos, los aspectos difusionales mencionados constituyen las etapas limitantes en el desarrollo de la biomasa, lo que obliga a su mejoramiento en condiciones de proceso.

### 3.5.2. Transferencia de calor.

La transferencia de calor en las FSS está íntimamente relacionada con la aereación del sustrato ya que la mayoría de los reactores empleados no tienen diseños que permitan su control por otros medios. Los niveles bajos de humedad crean condiciones desfavorables para la eliminación del calor producido en este tipo de sistemas, sobre todo en reactores de grandes dimensiones. Este aspecto constituye uno de los problemas más dificultosos de las FSS que han hecho retrasar su desarrollo con respecto a los clásicos sistemas líquidos agitados.

Si durante el curso de una fermentación es necesario bajar la temperatura se debe aumentar la aereación ya sea incrementando el caudal de aire en los sistemas estáticos o, en el caso de ser posible, la agitación. Por el contrario, si la temperatura es baja la aereación debe disminuirse con lo que el calor liberado por la respiración de los microorganismos se encarga de su elevación. Si es necesaria una disminución en la aereación, ésta no debe llevarse a valores inferiores a niveles críticos, en los cuales pueden tener lugar cambios metabólicos indeseables en los microorganismos. Si esto tiene lugar, se debe tomar una decisión intermedia en la cual ambos efectos negativos tengan una influencia

mínima sobre el rendimiento del proceso.

En algunos casos es necesario precalentar el medio de cultivo al inicio de la fermentación a los efectos de alcanzar la temperatura óptima de proceso. Para tal fin, existen distintos procedimientos de acuerdo al tipo de fermentador empleado.

### 3.6. REACTORES EMPLEADOS EN LA FERMENTACION DE SUSTRATOS SOLIDOS

El diseño de reactores para las FSS ha sido en su mayor parte empírico. La ausencia de datos experimentales precisos y confiables es la causa más importante de la falta de un conocimiento profundo en esta área. Esto se debe a que la instrumentación disponible comunmente usada para el monitoreo de las procesos en medios líquidos, tales como electrodos de pH, oxígeno disuelto o los ion selectivos, no funcionan adecuadamente por los bajos niveles de humedad. Además, la heterogeneidad de los sustratos empleados junto con los bajos o nulos niveles de agitación de estos sistemas originan una gran diferencia de condiciones entre distintos puntos del medio de cultivo. Todas estas circunstancias resultan en una falta de conocimientos en cuanto a las cinéticas del crecimiento de la biomasa y la formación de productos, a los requerimientos nutricionales y al control y regulación de las actividades microbianas, que no necesariamente deben ser similares a los encontrados en los medios líquidos.

Existen diferentes tipos de reactores usados en la FSS que se pueden clasificar del siguiente modo:

- a.- bandejas
- b.- parvas
- c.- columnas
- d.- tambores rotatorios
- e.- tanques agitados

Los tres primeros son sistemas discontinuos, en cambio en los demás se pueden hacer procesos continuos. Los procesos en bandejas

o en parvas se caracterizan por ser los de menor inversión y costo operativo, sin embargo en ellos no es posible efectuar casi ningún tipo de control. Por el contrario, en los últimos 3 sistemas se puede lograr un mejor control a costa de una mayor inversión.

Las bandejas empleadas para la FSS poseen marcos metálicos que sostienen mallas de alambre sobre las cuales se coloca una capa de sustrato de entre 2,5 y 5 cm de espesor. Normalmente el sustrato se esteriliza por separado, se inocula y luego se carga asépticamente, aunque existen equipos automatizados que hacen esto dentro de las cámaras de cultivo. Durante el proceso se controla la humedad y la temperatura mediante el pasaje de una corriente de aire acondicionado por dentro del fermentador.

Existen distintos tamaños de equipos que van desde la escala de laboratorio pasando por modelos de planta piloto hasta llegar a los comerciales capaces de procesar hasta una 10 ton de sustrato (afrecho de trigo para la producción de amilasas) por día. Una desventaja de estos sistemas es la gran área necesaria para los procesos en escala industrial. Por ejemplo, para el caso anterior son necesarias unas 340 bandejas de 1,8 m de lado (1100 m<sup>2</sup> totales) que se deben cargar y descargar cada 36 h, con lo que se incrementa el costo operativo del proceso.

Para la realización de procesos en escala de laboratorio pueden emplearse en una etapa inicial cajas de petri a semejanza de las bandejas tal como se describe en el capítulo siguiente. Estas presentan ventajas en su manipuleo y mediante su uso en batería se pueden ensayar distintas variables en un mismo proceso con una gran economía de tiempo.

Las parvas (del inglés windrow) se emplean exclusivamente para procesos de compost. Para ello el residuo sólido se amontona a la intemperie en filas de unos 2 m de alto y 4 m de ancho que son removidas cada 2 días mediante el uso de topadoras. Con esto se logra una mejor aereación y se acorta el proceso que dura, de acuerdo al sustrato empleado, entre 15 y 30 días (Cannel, E. and

Moo-Young, M., 1980 b).

Los fermentadores en columnas consisten en tubos de vidrio o plástico que se rellenan con el sustrato a fermentar con la condición de que quede la suficiente cantidad de espacios libres como para permitir una adecuada aereación del lecho. El aire humidificado se introduce por la parte inferior y la temperatura del proceso se regula mediante la inmersión de las columnas en un baño termostático (Raimbault, M. and Alazard, D., 1980). Este tipo de fermentadores está destinado solamente a estudios fisiológicos en escala de laboratorio (Rodriguez, J.A. y col., 1986; Gonzalez, E. y col., 1985) ya que parece improbable su escalamiento.

Los tambores rotatorios están diseñados a similitud de los rollers empleados en cultivos de tejidos. Existen unidades de laboratorio de 2 L de capacidad hasta las plantas piloto capaces de fermentar 100 kg de sustrato que rotan desde 0,15 a 15 veces por min según su tamaño (Silman, R.W., 1980). La preparación del sustrato, esterilización, incubación y secado del producto final se hace dentro mismo del tambor. También existen diseños en los cuales se han adicionado deflectores a los efectos de lograr un mejor mezclado, o bien agitadores de paletas similares a los empleados en las amasadoras de panadería (Meyer, F. and Deschamps, F., 1979).

El desarrollo microbiano en los tambores es, en general, rápido y uniforme. Sin embargo, aparecen dificultades cuando se intenta escalar el proceso ya que el micelio se rompe debido al efecto mecánico de la agitación cuanto mayor es la escala de trabajo. También se presentan otros problemas como son el control de la temperatura, la contaminación y la formación de masas esféricas de sustrato.

Los tanques agitados son similares a los tambores rotatorios con la diferencia que el eje está en posición horizontal. Pueden tener secciones internas y deflectores y en lugar de girar el tambor, como en el caso anterior, lo que gira es el eje central provisto de paletas que remueven al sustrato. En ambas cabeceras están colocadas la

entrada y la salida del aire y todo el equipo puede desarmarse para su limpieza (Lindenfelser, L.A. and Ciegler, A., 1975). No se han publicado unidades de mayor tamaño que las de laboratorio y su uso está restringido a la producción de pequeñas cantidades de metabolitos.

### 3.7. CONCLUSIONES

Para finalizar este capítulo se puede hacer un resumen de las principales ventajas y desventajas de la FSS en comparación con los clásicos procesos fermentativos con medios líquidos en tanques agitados (Hesseltine, C.W., 1977 b).

Dentro de los aspectos positivos que se deben resaltar en la FSS está el hecho de que debido a la ausencia de agua libre el volumen de medio de cultivo por gramo de sustrato fermentado es mucho menor. Esto produce ciertos beneficios:

a.- El espacio ocupado por los fermentadores es mucho menor en relación al rendimiento en producto que en muchos casos es muy superior a los obtenidos en medios líquidos.

b.- Se evita el tratamiento de enormes volúmenes de líquidos residuales.

c.- En muchos casos no hace falta separar el producto del resto del medio de cultivo (por ejemplo: comidas orientales y preparados enzimáticos crudos) que con un simple secado se logra estabilizar.

d.- Si es necesaria una extracción del producto, los volúmenes de solvente a emplear son mucho menores debido a la menor cantidad de material a tratar y su mayor concentración.

e.- Los lugares de almacenamiento del producto recién fermentado son mucho más chicos.

f.- Ya que las bacterias necesitan valores más altos de humedad para poder crecer y desarrollarse, los problemas de contaminación se ven drásticamente reducidos hasta el punto de no ser necesaria una esterilización convencional del medio. A veces es suficiente un



simple cocimiento a presión atmosférica, sobre todo como pretratamiento del sustrato.

Por otra parte, los medios de cultivo son relativamente simples, con componentes naturales generalmente de costo bajo o nulo. La aereación se logra por un simple pasaje de aire a través del sustrato, no siendo necesario en muchos casos el empleo de agitadores. Normalmente, los productos son más estables que los sustratos originales, lo que facilita su conservación.

Como desventajas, las FSS presentan los siguientes problemas:

a.- Los tipos de microorganismos que se pueden emplear están restringidos a aquellos capaces de crecer con bajos tenores de humedad, fundamentalmente hongos. Si es necesario la presencia de agua libre para su desarrollo se debe recurrir inevitablemente a los medios líquidos convencionales.

b.- Los niveles de calor producidos por la respiración de los microorganismos en escala industrial son muy importantes y es más fácil remover ese calor en un fermentador convencional que en uno para sustratos sólidos.

c.- Una etapa generalmente limitante en los procesos en medios líquidos es la transferencia de oxígeno al medio de cultivo. Esta se puede favorecer incrementando, entre otras variables, la velocidad del agitador o el caudal de aire. Sin embargo, en la FSS el paso limitante es la transferencia de oxígeno dentro de las partículas sólidas. La única solución para poder aumentar este parámetro para un determinado tipo de sustrato es disminuir el tamaño de las partículas para aumentar su superficie específica. Pero esto también tiene un límite ya que si se muele demasiado al sustrato se produce una compactación excesiva del medio de cultivo que trae aparejada una limitación en la transferencia de materia entre partículas.

d.- En la FSS la medida automática de los niveles de humedad, pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$  y producto es más difícil y en muchos casos imposible.

e.- Generalmente se necesitan grandes cantidades de esporos como inóculos, lo que suele crear problemas para su producción.

### 3.8. REFERENCIAS

- Alurralde, J.L.; Cuevas, C. y Ellenrieder, G. (1987). Producción de celulasa con cepas de *Trichoderma* en cultivos en estado sólido. Resúmenes del I Congreso Latinoamericano de Biotecnología, C3-5, Tucumán, Argentina.
- Bajracharya, R. and Mudget, R. (1980). Effects of controlled gas environments in solid substrate fermentations of rice. *Biotech. Bioeng.* 22, 2219-2235.
- Cannel, E. and Moo-Young, M. (1980 a). Solid state fermentation systems Part 1. *Process Biochem.* 15, 5, 2-7.
- Cannel, E. and Moo-Young, M. (1980 b). Solid state fermentation systems Part 2. *Process Biochem.* 15, 6, 24-28.
- Carrizalez, V.; Rodriguez, H. and Sardina, I. (1981). Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. *Biotech. Bioeng.* 23, 321-333.
- Corpe, W.A. (1980). Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. En: *Adsorption of Microorganisms to Surfaces*, 125-138. Britton, G. and Marshall, K.C. (eds.). J. Wiley and Sons Ltd.
- Golueke, C.G. (1977). *Biological Reclamation of Solid Wastes*. Emmaus, Pennsylvania, Rodale Press.
- Gonzalez, E.; Vernon, E.J. and Moctezuma, A.R. (1985). Biotechnology for the processing of pineapple waste. *Industry Environ.* oct./nov./dec., 19-20.
- Harris, D. (1979). Measurement of oxygen uptake by straw microflora using an oxygen electrode. En: *Straw decay and its effect on disposal and utilization*, 265-266. Grossbard, E. (ed.). J. Wiley and Sons, Ltd. Chisester.
- Hayes, W.A. and Nair, N.G. (1975). *The cultivation of Agaricus*

- bisporus* and other edible mushrooms. En: The Filamentous Fungi, vol. 1, chapter 11, 212-248. Smith, J.E. and Berry, D.R. (eds.). Edward Arnold, London.
- Hesseltine, C.W. (1965). A millenium of fungi, food and fermentation. *Mycologia* 57, 1, 148-157.
  - Hesseltine, C.W. (1972). Solid state fermentations. *Biotech. Bioeng.* 14, 517-532.
  - Hesseltine, C.W. (1977 a). Solid state fermentation Part 1. *Process Biochem.* 12, 6, 24-27.
  - Hesseltine, C.W. (1977 b). Solid state fermentation Part 2. *Process Biochem.* 12, 9, 29-32.
  - Hisanaga, W. and Nakamura, S. (1966). Japan Kokai 16.555.66.
  - Ikeda, Y.; Takahashi, E.; Yokogama, K. and Yoshimura, Y. (1972). Screening for microorganisms producing gallic acid from chinese and Tara tannins. *J. Ferment. Technol.* 50, 361-370.
  - Knapp, J.S. and Howell, J.A. (1980). Solid substrate fermentation. En: *Topics in enzyme and fermentation biotechnology*, chapter 4, 85-143. Wiseman, A. (ed.). Ellis Horwood Ltd., Chichester.
  - Lindenfelser, L.A. and Diegler, A. (1975). Solid substrate fermentor for ochratoxin A production. *Appl. Microbiol.* 29, 323-327.
  - Martinelli, A. and Hesseltine, C.W. (1964). Tempeh fermentation, package and tray fermentations. *Adv. Appl. Microbiol.* 17, 157-194.
  - Meyer, F. and Deschamps, F. (1979). Nouveaux fermenteurs pour milieux solides. Brevet francais 79 02625 INRCHA.
  - Moo-Young, M.; Moreira, A.R. and Tengerdy, R.P. (1983). Principles of solid substrate fermentation. En: *The Filamentous Fungi*, vol. 4, chapter 5, 117-144. Smith, J.E. y col. (eds.). Edward Arnold, London.
  - Nandi, B. (1978). Glucosamine analysis of fungus infected wheat as a method to determine the effect of antifungal compounds in grain preservation. *Cereal Chem.* 55, 2, 121-126.
  - Prescott, S.C. and Dunn, C.G. (1949). *Industrial microbiology*, 2nd edit. McGraw Hill Book Co., New York.
  - Rimbault, M. (1980). *Tesis: Fermentation en milieu solide. Croissance*

- de champignons filamenteux sur substrat amylicé. Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Rimbault, M. and Alazard, D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9, 199-209.
  - Ramstack, J.M.; Lancaster, E.B. and Bothast, R.J. (1979). Gas chromatographic headspace analysis of solid substrate fermentations. *Process Biochem.* 14, 2, 2-4.
  - Rodriguez, J.A.; Bechstedt, W.; Echevarria, J.; Sierra, N.; Delgado, G.; Daniel, A. and Martinez, O. (1986). Optimization of solid state fermentation of citrus dried peel by *Aspergillus niger* in a packed bed column. *Acta Biotechnol.* 6, 3, 253-258.
  - Schaffeld, G. and Illanes, A. (1982). Determination of cell mass in an insoluble lignocellulosic substrate in submerged fermentation. *Biotech. Lett.* 4, 10, 667-672.
  - Silman, R.W. (1980). Enzyme formation during solid substrate fermentation in rotating vessels. *Biotech. Bioeng.* 22, 411-420.
  - Simon, P. & Meunier, R. (1970). *Microbiologie industrielle et Génie Biochimique*. Mason 1 co. edit. Paris.
  - Swift, M.J. (1973). The estimation of mycelial biomass by determination of the hexosamine content of wood tissue decayed by fungi. *Soil Biology Biochem.* 5, 321-332.
  - Takamine, J. (1914). Enzymes of *Aspergillus oryzae* and the application of its amyloclastic enzyme to the fermentation industry. *J. Ind. Eng. Chem.* 6, 824-828.
  - Toyama, N. (1969). Applications of cellulases in Japan. *Enzymes and their applications*, 359-390. Am. Chem. Soc. Washington.
  - Toyama, N. (1976). Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes *Trichoderma viride* cellulase. *Biotech. Bioeng. Symp.* 6, 207-219.
  - Trinci, A.P. (1971). Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. *J. Gen. Microbiol.* 67, 325-344.

- Wang, D.I.C.; Cooney, L.C.; Demain, A.L.; Dunnill, P.; Humphrey, A.E. and Lily, M.D. (1979). Fermentation and enzyme technology. J. Wiley and Sons, Ltd. New York.
- Wood, D.A. (1979). A method of assessing biomass of *Agaricus* mycelium in wheat straw mushroom compost. In: Straw decay and its effect on utilization and disposal, 309-310. Grossbard, E. (ed.). J. Wiley and Sons, Ltd. Chisester.

## CAPITULO 4: PRODUCCION DE ENZIMAS PECTOLITICAS

### 4.1. INTRODUCCION

En virtud de la experiencia adquirida durante la realización de los trabajos correspondientes a la primera parte de esta Tesis en cuanto al manejo del orujo de manzana en procesos fermentativos es que se buscó alguna otra alternativa tendiente a su aprovechamiento por medios biotecnológicos. A tal efecto, y como ya se ha mencionado en la Introducción de esta Tesis, se estudió la producción de enzimas pectolíticas a partir de aquel sustrato.

En el país existe un mercado en expansión de pectinasas constituido por las industrias productoras de jugos (manzana, pera y cítricos) y vitivinícolas, que es satisfecho en un 75 % con productos importados (Novo, Biocon y Gist Brocades) y el resto con producción local bajo patente estadounidense (Milar) (Katz, J. y Bercovich, N., 1987). Dentro de este mercado, la zona del valle del río Negro ocupa un lugar importante. Como se dijo en el capítulo 1, las pectinasas se emplean tanto durante la maceración previa a la molienda de la fruta, a los efectos de incrementar la eficiencia de la misma, y en la etapa de clarificación del jugo. En el primero de los casos, los preparados comerciales se dosifican a razón de 7-10 g por ton de fruta (manzanas y peras) y en el segundo, alrededor de 10 g por cada 1000 L de jugo. Con estos datos se puede estimar un consumo para el año 1987 de aproximadamente unos 2800 y 2000 kg de enzima para cada caso, lo que significa, a los costos actuales, un mercado de alrededor de 400.000 dólares anuales. A esto debe adicionársele el consumo por parte de la industria de los jugos cítricos y la vitivinícola, con lo que el mercado nacional puede superar holgadamente el medio millón de dólares por año.

Teniendo en cuenta esto último, se hace atractiva la idea del desarrollo de una tecnología original para la producción local de este insumo, más aún pensando que para tal fin la materia prima de

mayor volumen es un residuo que las mismas industrias jugueras eliminan.

Es de mencionar que en la bibliografía existen referencias acerca de que en la actualidad se producen enzimas pectolíticas tanto en medios líquidos como en sustrato sólido empleando orujo de manzana, pero los procesos fermentativos están protegidos por patentes.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que el costo de estas enzimas ha disminuido últimamente en términos reales. Por ello es que para el desarrollo de una tecnología adecuada de producción se hace necesario considerar, entre otros factores, el uso de medios de cultivo económicos. En este sentido, el orujo de manzana resulta una materia prima atractiva en razón de su costo nulo y por poseer una composición tanto en azúcares como en pectina que se ajusta dentro de ciertos límites a los recomendados como óptimos por la bibliografía para este tipo de procesos.

Otro aspecto a tener en cuenta es que con el orujo de manzana se pueden realizar fermentaciones en sustrato sólido. Empleando este sistema de cultivo se ha descrito la obtención de mayores rendimientos y de complejos enzimáticos más apropiados para su aplicación industrial que los obtenidos en medios líquidos.

Además, se sabe que tiempo atrás una empresa juguera de capitales extranjeros radicada en la provincia de Río Negro desarrolló una tecnología para la producción de pectinasas en sustrato sólido mediante el uso del orujo de manzana, para luego instalar en su casa matriz una planta de producción en gran escala, la cual es abastecida desde nuestro país con orujo secado (de bajo valor comercial) y sus enzimas son vendidas, entre otras, en el mercado nacional.

Todas estas razones justificaron el estudio de la producción de pectinasas pensando en la posibilidad futura de llegar a proveer la tecnología necesaria para la instalación de una planta que pudiera competir económicamente con los productos que actualmente se

encuentran en el mercado.

En este capítulo del trabajo de Tesis se hace referencia a los estudios realizados en escala de laboratorio, en cajas de petri, como etapa inicial de un proceso de fermentación de sustratos sólidos destinado a la producción de pectinasas. Antes de describir los trabajos realizados es conveniente hacer mención a las características generales de las sustancias pécticas como así también a las de las enzimas pectolíticas. Para finalizar, se hacen algunas proyecciones basadas en los rendimientos obtenidos a fin de poder extrapolar la utilidad de los resultados alcanzados.

## 4.2. SUSTANCIAS PECTICAS

### 4.2.1. Generalidades y definiciones.

Las sustancias pécticas fueron identificadas por primera vez como "le principe gelatineux des fruits" (Braconnot, H., 1825) y su nombre proviene del griego "pectos" que significa congelar o solidificar. Se las puede definir como polisacáridos estructurales presentes principalmente en la lámina media y en la pared celular primaria de las plantas superiores. Aunque se hallan en cantidades que generalmente no superan el 1 % del peso fresco, son responsables de la integridad y la coherencia de los tejidos de los vegetales (Glicksman, M., 1969). La lámina media es la capa cementante que se encuentra entre las células vegetales y contiene principalmente sustancias pécticas y hemicelulosas, siendo todavía desconocida su composición química detallada. Las microfibrillas de celulosa de la pared celular primaria están unidas entre sí mediante una red más o menos rígida compuesta esencialmente por hemicelulosa y pectina. La degradación de las mencionadas estructuras mediante el uso de las enzimas específicas de cada caso conduce a la desintegración de los tejidos con separación de las células, proceso denominado maceración (Vanbelle, M. y col., 1983).

Para una mejor comprensión de la nomenclatura empleada a lo



largo del presente capítulo, es conveniente aclarar algunos términos relativos a las sustancias pécticas de acuerdo a las definiciones dadas por un comité de la American Chemical Society (Committee for the Revision of the Nomenclature of Pectic Substances, 1944).

a) Sustancias pécticas: es la designación de un grupo de carbohidratos poliméricos, coloidales y complejos presentes en los vegetales, que contienen una gran proporción de unidades de ácido anhidrogalacturónico. Los grupos carboxílicos a su vez pueden estar parcialmente esterificados por grupos metílicos o parcial o totalmente neutralizados por una o más bases.

b) Protopectinas: es el nombre dado a las sustancias pécticas insolubles en agua y que están fijadas en el tejido vegetal. Se las puede considerar como un derivado del ácido poligalacturónico de alto peso molecular que está químicamente unido y mecánicamente inmerso dentro de otros constituyentes de la pared celular vegetal.

c) Ácidos pectínicos: es la denominación empleada para designar a ácidos poligalacturónicos coloidales que están parcial o totalmente esterificados con grupos metílicos. Son capaces de formar, en determinadas condiciones, geles con azúcares y, si el contenido de metoxilos es bajo, la gelificación también puede tener lugar en presencia de determinados iones. Sus sales pueden ser tanto neutras como ácidas.

d) Pectina o pectinas: así son designadas aquellos ácidos pectínicos solubles en agua, de variado contenido en ésteres metílicos y grado de neutralización, capaces de formar geles con azúcares y ácidos bajo condiciones adecuadas.

e) Ácido péctico: es el nombre aplicado a las sustancias pécticas compuestas por ácidos poligalacturónicos coloidales que están totalmente libres de esterificación con grupos metílicos. Sus sales se denominan pectatos o poligalacturonatos y pueden ser tanto ácidas como neutras.

#### 4.2.2. Estructura y composición.

Las sustancias pécticas son poligalacturónidos lineales que poseen otras moléculas de no urónidos unidas a la cadena principal de residuos de ácido alfa-1,4-galactorónico (Fig. 4.1). Se supone que el ácido galactorónico tiene una conformación tipo silla (Fig. 4.2) lo que significa que las uniones entre las unidades son del tipo axial-axial y, por lo tanto, el polímero tiene un eje helicoidal con cierta tendencia al enrollamiento.

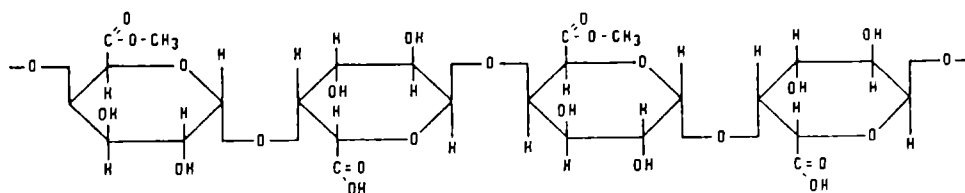


Fig. 4.1. Cadena de ácido poli-D-galacturónico parcialmente esterificada.

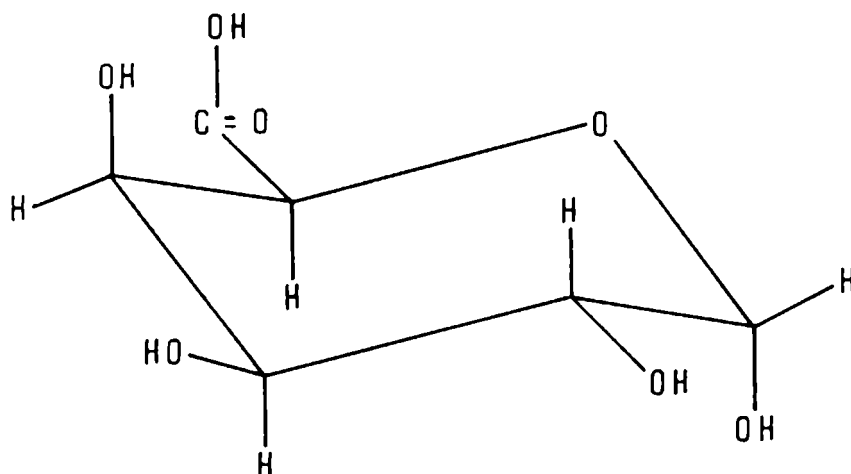


Fig.4.2. Conformación tipo silla del ácido  $\alpha$ -D galacturónico

Se ha sugerido que las sustancias pécticas consisten en una tríada de biopolímeros integrada por un alfa-1,4-D-poligalacturónido, un L-arabano altamente ramificado y un beta-1,4-D-galactano (Whistler, R.L. and Smart, C.L., 1953). Además de ellos, se han encontrado otros azúcares como ramnosa, xilosa, fucosa, glucosa y manosa (Barret, A.J. and Northcote, D.H., 1965).

Los grupos carboxílicos de las unidades de ácido galacturónico están parcialmente esterificadas con metanol, siendo el grado de esterificación variable en función de, entre otros aspectos, el vegetal de origen.

Algunos de los grupos oxhidrilos de los carbonos de las posiciones 2 y 3 pueden estar acetilados en un rango que va del 0,2 al 4 %, valores extremos que corresponden a pectina de manzana y cítrica respectivamente. La presencia de grupos acetilos reviste importancia ya que afecta a las propiedades de gelación de la pectina y por lo tanto, a su uso industrial.

El peso molecular de las sustancias pécticas ha sido motivo de numerosos estudios, encontrándose valores comprendidos entre 23.000 para la de origen cítrico (Owens, H.S. y col., 1946) y 360.000 para la de manzana (Saverborn, S., 1947).

#### 4.2.3. Propiedades y características.

Las sustancias pécticas son solubles en agua, formamida, glicerol caliente y dimetilsulfóxido, siendo insolubles en la mayoría de los solventes orgánicos. La solubilidad en agua disminuye con el aumento en el peso molecular de la pectina ensayada y las soluciones acuosas al 1-2 % (p/v) presentan una alta viscosidad. Esta propiedad depende también del peso molecular de la pectina y es influenciada por el grado de esterificación, la fuerza iónica, el pH, la temperatura y la concentración.

Las sustancias pécticas pueden ser precipitadas de sus soluciones acuosas mediante el agregado de solventes miscibles con el agua tales como el etanol y la acetona, y también por cationes

polivalentes (Dewel, H. and Stutz, E., 1958) dependiendo del grado de esterificación. Además, son precipitadas por detergentes cuaternarios (Scott, J.E., 1965) y por proteínas (Doesburg, J.J., 1965).

Los ácidos hidrolizan las uniones éster y/o glicosídicas en función de la temperatura. A bajos valores predomina la desesterificación con una pequeña degradación del polímero, en cambio a altas temperaturas se acelera la depolimerización. Este comportamiento se utiliza en la preparación de pectinas de bajo contenido en metoxilos. También el tratamiento ácido disminuye la cantidad de glúcidos no-urónidos encontrados en las pectinas, e.g. arabanos, debido a su mayor sensibilidad a los bajos pH (Pedersen, J.K., 1980).

Los grupos éster metílicos son rápidamente saponificados por álcalis diluidos a bajas temperaturas sin depolimerización, incrementándose la degradación del polímero con el aumento de aquella. Como consecuencia de la hidrólisis, no se obtienen los monómeros constituyentes del polímero inicial sino que se originan sustancias insaturadas provenientes de una ruptura glicosídica producto de una beta eliminación (Fig. 4.3). Esta reacción sólo ocurre en el enlace glicosídico adyacente a un grupo carboxilo esterificado, siendo éstas las únicas uniones químicas que se hidrolizan. De esto se concluye que los pectatos son mucho más estables a la degradación a altas temperaturas en medio alcalino que los pectinatos. Este tipo de reacción también ocurre a pH: 7,0 lo que origina que las soluciones de pectina no pueden ser esterilizadas a pH neutros sin una considerable degradación (Pigman, W. and Rizvi, S., 1959).

#### 4.2.4. Cambios en la composición química de las sustancias pécticas en los vegetales.

La protopectina es en general abundante en los tejidos de los frutos inmaduros. El proceso normal de maduración involucra cambios

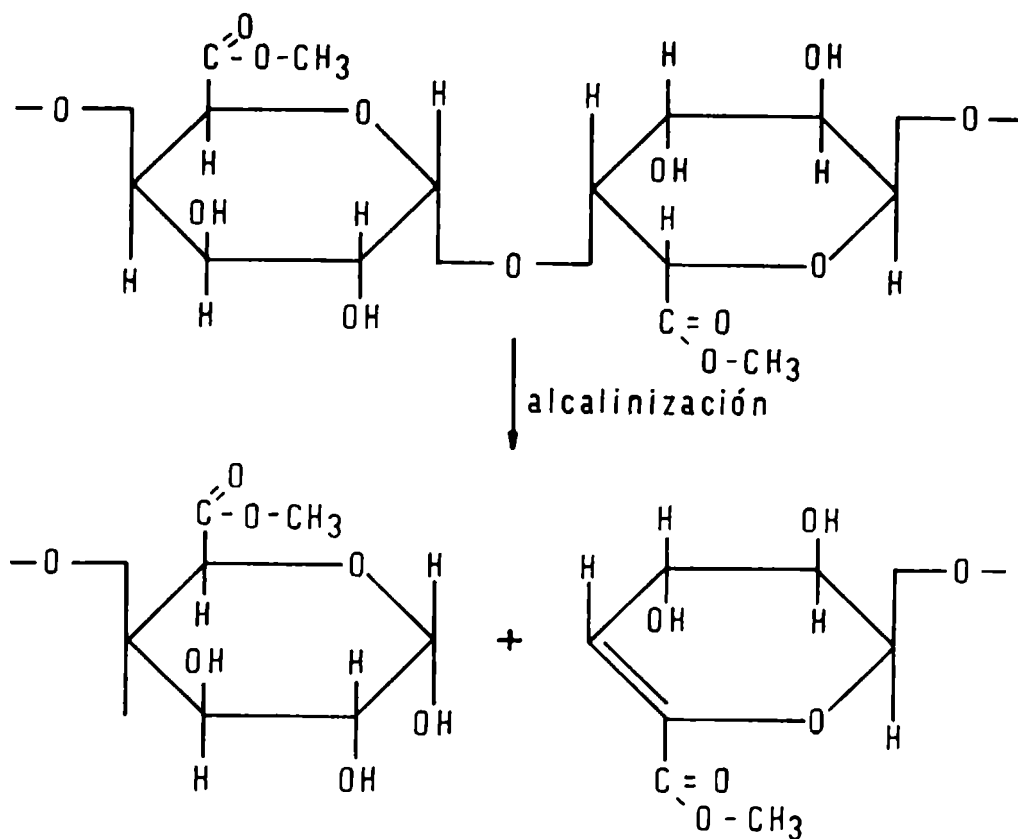


Fig.4.3. Degradación alcalina de la pectina.

hidrolíticos que conducen a la formación de pectinas que a su vez, en los primeros estadios de crecimiento, están completamente metiladas y tienen un muy alto peso molecular. A medida que el crecimiento avanza y la fruta madura, aumenta la concentración de las enzimas pectolíticas del vegetal produciéndose una degradación de la pectina que es hidrolizada a polímeros menores con menor contenido en metoxilos y mayor contenido en carboxilos y eventualmente, en los estadios finales, se llega a los ácidos y los azúcares libres (Kertesz, Z.I., 1960).

Toda esta serie de cambios en las sustancias pécticas continúan luego de la cosecha de la fruta, originando que sus propiedades varíen en función del tiempo. Como se dijo en el capítulo 1, la composición química del orujo de manzana evoluciona durante el transcurso del año, factor este a tener en cuenta para su empleo como materia prima para la producción de

pectinasas, más aun si la cepa microbiana empleada necesita de la presencia del inductor natural de aquellas enzimas.

#### 4.3. ENZIMAS PECTOLITICAS.

##### 4.3.1. Generalidades.

Debido a la amplia distribución de las sustancias pécticas dentro del reino vegetal, es que existen variados sistemas enzimáticos capaces de degradarlas. Es así que la pectólisis juega un importante papel asociada a muchos procesos biológicos en los cuales están involucrados materiales de origen vegetal, incluyendo la elongación de las células y el crecimiento de las plantas, la maduración de los frutos, la abscisión de las hojas, etc. (Fogarty, W.W. and Ward, O.P., 1972).

Las enzimas pectolíticas son también producidas por bacterias, hongos, levaduras, insectos, nematodos y protozoarios. La pectólisis microbiana es un importante fenómeno vinculado a la patogénesis vegetal, a las simbiosis entre microorganismos y plantas, a la descomposición de restos vegetales, a los procesos digestivos en animales incluyendo al hombre, ciertas fermentaciones y alteraciones en frutas y vegetales, etc. Más allá de todos estos casos, las pectinasas son importantes desde el punto de vista industrial, fundamentalmente por su uso en la elaboración de vinos, jugos y preparados de frutas, en la extracción de aceites vegetales y en ciertos procesos de enriamiento de fibras textiles tales como el lino, el yute y el cáñamo (Rombouts, F.M. and Pilnik, W., 1980).

##### 4.3.2. Clasificación.

Las pectinasas han sido clasificadas en dos grandes grupos a saber, enzimas desesterificantes (pectinesterasas) y enzimas depolimerizantes que cortan la cadena principal en subunidades menores.

Las pectinesterasas (pectin metilesterasas, pectasas) son

clasificadas como hidrolasas éster carboxílicas que desesterifican pectina produciendo metanol y ácido péctico.

Las depolimerasas cortan enlaces glicosídicos ya sea por hidrólisis (hidrolasas) o por beta eliminación (liasas). Antes de 1959 se pensaba que la depolimerización de las sustancias pécticas era debida solamente a una ruptura hidrolítica. Sin embargo, en aquel año se descubrió una enzima que degradaba el enlace 1-4 por transeeliminación (Albersheim, P. y col., 1960). A la luz de esta información se clasificó a la pectinasas del modo mostrado en la Tabla 4.1., en la cual, para ordenar las enzimas depolimerizantes, se han seguido los siguientes criterios:

- a) Si hidrolizan pectina o ácido péctico.
- b) Si actúan mediante un mecanismo de hidrólisis o de transeeliminación.
- c) Si la ruptura es al azar (endo) o a partir de un extremo (exo).

El criterio a) puede establecerse comparando la actividad de la enzima problema tanto con una pectina de alto grado de metoxilación como con ácido péctico. Sin embargo, cuando se afirma que la pectina es el sustrato preferido, se debe estar seguro que la acción catalítica no sea debida a la presencia contaminante de pectin esterasa en el preparado enzimático.

Con respecto al punto b) debe aclararse que ambos tipos de ruptura originan la producción de grupos reductores. Sin embargo, el doble enlace formado en los productos originados en la ruptura transeeliminativa tiene un pico de absorción máxima a 235 nm, lo que posibilita el empleo de medidas espectrofotométricas para su evaluación. Cuando la aparición de poder reductor no es acompañada por un incremento en la absorbancia a 235 nm, se debe adjudicar la actividad catalítica a una acción hidrolítica no transeeliminativa. Además, todas las liasas estudiadas hasta el presente son activadas por calcio, ion no requerido por las otras hidrolasas, lo cual puede ser utilizado como criterio para la

discriminación.

Tabla 4.1: Clasificación de las enzimas pectolíticas. La nomenclatura ha sido tomada de Enzyme Nomenclature (1973).

## ESTERASAS

Pectin esterasas (PE): Transforman pectina en ácido péctico mediante desesterificación de los restos metoxilos (EC 3.1.1.11).

## DEPOLIMERASAS

A) Actúan sobre pectina.

### 1.- Polimetilgalacturonasas (PMG)

a) Endo-PMG (EC 3.2.1.41): producen ruptura al azar de las uniones alfa 1,4 glicosídicas de la pectina (preferentemente con alto grado de esterificación).

b) Exo-PMG: producen ruptura secuencial de las uniones alfa 1,4 glicosídicas a partir del extremo no reductor de la cadena de pectina.

### 2.- Polimetilgalacturonatoliasas (PMGL)

a) Endo-PMGL (EC 4.2.2.3): producen ruptura al azar de los enlaces alfa 1,4 glicosídicos de la pectina mediante un proceso de transeliminación que origina ésteres galacturónicos con uniones insaturadas entre los carbonos 4 y 5 en el extremo terminal del fragmento formado.

b) Exo-PMGL: producen la eliminación secuencial del resto terminal de la cadena de pectina por ruptura transeliminativa.

B) Actúan sobre ácido péctico.

### 1.- Poligalacturonasas (PG).

a) Endo PG (EC 3.2.1.15): producen hidrólisis al azar de las uniones alfa 1-4 glicosídicas del ácido péctico.

b) Exo-PG (EC 3.2.1.40): producen una hidrólisis secuencial de las uniones alfa 1,4 glicosídicas del ácido péctico.

### 2.- Poligalacturonatoliasas (PGL).

a) Endo-PGL (EC 4.2.2.1): producen ruptura al azar de las uniones alfa 1,4 glicosídicas del ácido péctico mediante un proceso de transeliminación.

b) Exo-PGL (EC 4.2.2.2): producen ruptura secuencial de las uniones alfa 1,4 glicosídicas del ácido péctico mediante un proceso de transeliminación.

En cuanto al punto c) se puede relacionar la disminución de la viscosidad de la mezcla de reacción con la producción del poder reductor para así discriminar entre un mecanismo de ataque al azar o



en un extremo de la molécula del sustrato. Cuando un 50 % de disminución de la viscosidad se produce con sólo un 2-3 % de las uniones glicosídicas hidrolizadas se debe pensar en un ataque al azar. Para un ataque terminal, la velocidad de disminución de la viscosidad es mucho menor.

#### 4.3.3. Distribución en la naturaleza.

Como se mencionó precedentemente, las enzimas pectolíticas se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza, por lo que a fin de sistematizar su estudio se han clasificado en dos grandes grupos: a) las provenientes de vegetales y b) las producidas por microorganismos.

Con respecto a las primeras, se ha descrito la presencia de tanto exo como endo-PG en plantas superiores con propiedades similares a las de origen fúngico. En particular, se han hecho estudios de caracterización de las PG provenientes de palta, rabanito, pepino, zanahoria y tomate (Patel, D.S. and Phaff, H.J., 1960). También se ha detectado la presencia de PE en frutas cítricas y en tomates, con un pH óptimo de alrededor de 7,5. En cambio, una PE de manzana poseía uno de 6,6 (Pollard, A. and Kieser, M.E., 1959) y una de uva uno de 5,6, con una temperatura óptima de 40 °C (Marteau, G., 1959).

Dentro de las pectinasas de origen microbiano, encontramos a las bacterianas y a las fúngicas, habiendo ejemplos en ambos grupos de microorganismos capaces de producir más de una de tales enzimas. En la Tabla 4.2 se mencionan algunos microorganismos productores de pectinasas.

Tabla 4.2. Microorganismos productores de enzimas pectolíticas.

Microorganismo	PE	PMG	PMGL	PG	PGL
<i>Aeromonas</i> sp.					+
<i>Bacillus</i> sp.					+
<i>Bacteroides ruminicola</i>	+				+
<i>Clostridium multifementans</i>	+				+
<i>Cytophaga deprimata</i>					+
<i>Erwinia aroideae</i>			+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp.	+				+
<i>Xanthomonas campestris</i>	+				+
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	
<i>Acrocylindrium</i> sp.	+			+	
<i>Botrytis cinerea</i>	+			+	
<i>Colletotrichum trifolii</i>	+			+	+
<i>Coniothyrium diplodiella</i>	+			+	
<i>Corticium rolfsii</i>	+			+	
<i>Gloeosporium kake</i>				+	
<i>Fusarium oxysporum</i>	+			+	+
<i>Kluyveromyces fragilis</i>				+	
<i>Penicillium</i> sp.	+		+	+	
<i>Rhizoctonia solani</i>	+		+	+	
<i>Rhizopus tritici</i>				+	
<i>Sclerotinia fructigina</i>	+		+	+	
<i>Thielaviopsis basicola</i>	+				
<i>Verticillium albo-atrum</i>	+		+	+	

#### 4.3.4. Propiedades de los distintos tipos de pectinasas.

4.3.4.1. Pectin esterases. Las PE son producidas por plantas superiores, numerosos hongos y algunas levaduras y bacterias. Los estudios más detallados se han realizado sobre PE de origen vegetal, en cambio el conocimiento de las propiedades bioquímicas de las demás es bastante escaso. Se han encontrado diversas formas moleculares o isoenzimas de PE en diversas frutas y en ciertos hongos. Las principales características de los casos mejor conocidos se detallan en la Tabla 4.3.

La actividad de las PE puede ser evaluada por diferentes métodos (Rexová-Benková, L. and Markovic, O., 1976). Usualmente se realiza una titulación simultánea a la liberación de los grupos carboxílicos por acción de la enzima sobre el sustrato. Existen otros métodos basados en la valoración del metanol liberado que son particularmente útiles cuando se desea medir la actividad enzimática a un pH muy bajo, en sistemas buferados o en

tejidos vegetales. En ellos, el metanol puede ser destilado y medido por oxidación a formaldehído (Holden, M., 1945) o bien, se puede aumentar la sensibilidad transformando el metanol en un nitrito metílico volátil que se determina por medio de cromatografía gas-líquido (Bartolome, L.G. and Hoff, J.J., 1972). Otra alternativa implica la digestión de la pectina en presencia de un buffer de bicarbonato en un respirómetro de Warburg de modo tal que los grupos carboxílicos liberados desplacen cantidades equivalentes de CO<sub>2</sub> (Kiermeier, F., 1948).

Tabla 4.3: Principales propiedades de algunas PE de origen vegetal y fúngico (Rombouts, F.M. and Pilnik, W., 1980)

Fuente de enzima	Punto isoelectrico	Peso molecular	Actividad específica (1)	pH óptimo
<b>Frutos</b>				
Banana I* (2)	8,9	30.000	457	6,0
II*	9,4	30.000	529	6,0
Naranja (3)			2.200	8,0
Naranja I* (4)	10,0	36.200	694	7,6
II*	11,0	36.200	762	8,0
Ciruela (5)			25	7,5
Tomate I* (6)		27.500	1.150	6-9
II*			724	8,0
III*		27.800		
<b>Hongos</b>				
<i>Acrocylindrium</i> sp.				7,5
<i>Coniothyrium diploidea</i> I*				4,8
II*				4,8
<i>Corticium rolfsii</i>		37.000		3,5
<i>Fusarium oxysporum</i>		35.000	203	7,0
<b>Bacterias</b>				
<i>Clostridium multifementans</i>		400.000	48	9,0

(1) Unidades.mg<sup>-1</sup> de proteína.

(3) *Citrus natsudaikai*.

(5) *Prunus salicina*.

\* Una de las múltiples isoenzimas.

(2) *Musa paradisiaca*.

(4) *Citrus sinensis*.

(6) *Lycopersicon esculentum*

Las PE de naranja muestran una disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato con un grado de polimerización por debajo de alrededor de 10, haciéndose nula con el trimetil éster del trímero (McCready, R.M. and Seegmiller, C.G., 1954). Los puntos preferidos de ataque sobre la molécula de pectina son probablemente aquellos grupos metil éster adyacentes a grupos carboxílicos libres (Solms, J. and Deuel, H., 1955). Sin embargo, en pectinas altamente metiladas, alrededor de la mitad de la actividad de PE podría iniciarse sobre el extremo reductor de las moléculas (Lee, M. and Macmillan, J.D., 1970). La PE de *C. multifementans*, que está complejada con una exo-PGL, solamente ataca el sustrato desde el extremo reductor de la molécula (Sheiman, M.I. y col., 1976).

La desesterificación enzimática de la pectina avanza linealmente a lo largo de la molécula mediante el mecanismo llamado de la simple cadena (Heri, W. y col., 1961). De este modo se forman trozos de la molécula con grupos carboxílicos libres que aumentan notablemente la sensibilidad de la pectina a la precipitación por calcio (Kohn, R. y col., 1968). Normalmente, la desesterificación no es completa, quedando un resto de alrededor del 10 % de los enlaces éster intactos (Solms, J. and Deuel, H., 1955).

La actividad de PE es muy influenciada por la presencia de cationes mono y divalentes (Mac Donnell, L.R. y col., 1945). También es inhibida por pectatos (inhibición por producto final). De acuerdo con una teoría (Lineweaver, H. and Ballou, G.A., 1945) las PE podrían formar un complejo inactivo con el pectato lo que explicaría el efecto activante de los cationes debido a que ellos podrían liberar a la enzima aumentando su actividad. Específicamente se ha estudiado la acción activante de distintas concentraciones de sodio, lo que debe tenerse en cuenta en estudios del efecto del pH sobre la actividad enzimática cuando los buferes usados contienen a este catión (McColloch, R.J. and Kertesz, Z.I., 1947).

4.3.4.2. Polimetilgalacturonasas. Se han aislado dos fracciones de endo-PMG de *A. niger* a partir de un preparado comercial de pectinasas (Pectinex). La primera tiene un pH óptimo de 4,0 e hidroliza a la pectina altamente esterificada originando una serie de productos que van del monómero al pentámero. En cambio, la segunda muestra un pH óptimo de 7,0 con productos que van del dímero al pentámero (Albersheim, P. and Killias, U., 1962). Sin embargo, es extraña la ausencia de más información acerca de este tipo de enzima, por lo que se duda de su verdadera existencia (Edstrom, R.D. and Phaff, H.J., 1964).

4.3.4.3. Polimetilgalacturonatoliasas. Las endo-PMGL son producidas casi con exclusividad por hongos, siendo las únicas excepciones descritas una cepa de *E. carotovora* (Almengor-Hecht, M.L. and Bull, A.T., 1978), otra de *E. arvoideae* (Kamimiya, S. y col., 1972) y una pseudomona aislada de raíces (Ohuchi, A. and Tominaga, T., 1974). En la Tabla 4.4 se detallan las principales propiedades de algunas endo-PMGL.

Tabla 4.4: Principales propiedades de algunas endo-PMGL (Rombouts, F.M. and Pilnik, W., 1980).

Fuente de enzima	Punto isoeléctrico	Peso molecular	Actividad específica (1)	pH óptimo
<b>Hongos</b>				
<i>Aspergillus fonsecæus</i>			19	5,2
<i>Aspergillus japonicus</i>	7,7	32.000	355	6,0
<i>Aspergillus niger</i>	3,5		24	5,2
<i>Aspergillus niger</i>	3,5			5,9
<i>Aspergillus niger</i> I*	3,65	35.400	17	6,0
<i>Aspergillus niger</i> II*	3,75	33.100	44	6,0
<b>Bacterias</b>				
<i>Erwinia arvoideae</i>		30.000	400	8,1

(1) Unidades.mg<sup>-1</sup> de proteína. \* Una de las múltiples isoenzimas.

Las endo-PMGL causan una rápida caída de la viscosidad de las soluciones de pectina y su acción disminuye rápidamente con la disminución de la longitud de la cadena de oligogalacturonatos (Edstrom, R.D. and Phaff, H.J., 1964). Los sustratos de menor peso molecular que pueden ser degradados son el tetragalacturonato y el trigalacturonato totalmente metilados para las enzimas de *A. fonssecaeus* y *A. niger* respectivamente.

Se ha demostrado mediante estudios cinéticos realizados con dos isoenzimas sobre oligogalacturonatos totalmente metilados que el número de subsitios del sitio de unión del sustrato era de 8 y 9 o 10 y que en la unión participaban restos de tirosina y grupos carboxílicos (Van Houdenhoven, F.E.A., 1975).

Esta enzima ha adquirido gran importancia en virtud de que su acción catalítica no produce metanol, con lo cual su uso es más apropiado en la degradación de sustancia pécticas de vegetales destinados a la alimentación (Ishii, S. and Yokotsuda, T., 1972; Szajer, I. and Szajer, C., 1982).

4.3.4.4. Poligalacturonasas. Las endo-PG son producidas por numerosos hongos y bacterias, tanto saprofíticos como patógenos vegetales, y también por algunas levaduras. Además se las encuentra en plantas superiores, especialmente en frutos maduros. Algunas de las principales características de las endo-PG de distintos orígenes se muestran en la Tabla 4.5. De igual modo que con las PE, aquí también se presentan isoenzimas con distintas propiedades producidas por el mismo organismo.

Tabla 4.5: Propiedades de algunas endo-PG de origen vegetal y microbiano (Rombouts, F.M. and Pilnik, W., 1980).

Fuente de enzima	Punto isoelectrico	Peso molecular	Actividad especifica (1)	pH óptimo
<b>Frutos</b>				
Tomate I* (2)		84.000		4,5
II*		44.000		5,0
<b>Hongos</b>				
<i>Aspergillus niger</i> I*	3,8			4,0
II*				4,5
III*	4,5			5,5
<i>Aspergillus niger</i> I*		35.000	81	4,1
II*		85.000	44	3,8
<i>Aspergillus niger</i>		46.000	75	5,0
<i>Aspergillus japonicus</i>		35.500	1.362	4,5
<i>Botrytis cinerea</i>		69.000	2.049	4,0
<i>Fusarium oxysporum</i> I*	7,0	37.000	194	5,0
II*	7,0	37.000	148	5,0
<i>Rhizopus arrhizus</i>		30.300	92	5,0
<i>Trichoderma koningii</i> I*	6,4	32.000		5,0
II*	6,6	32.000		5,0
<i>Verticillium albo-atrum</i>		30.000	2.075	6,5
<b>Levaduras</b>				
<i>Kluyveromyces fragilis</i>			168	4,4
<b>Bacterias</b>				
<i>Erwinia carotovora</i>			362	5,3
<i>Pseudomonas capacia</i>			125	4,5

\* Una de las múltiples isoenzimas.

(1) Unidades.mg<sup>-1</sup>.

(2) *Lycopersicon esculentum*.

En el caso de *Aspergillus niger* son datos de diferentes autores.

La mayoría de las endo-PG tienen un peso molecular comprendido entre 30.000 y 35.000 y son de naturaleza glicoproteica. Su actividad

se desarrolla específicamente sobre poligalacturonato, mostrando una gran disminución en su capacidad hidrolítica sobre pectinas con el aumento en el grado de esterificación de éstas. La actividad sobre oligogalacturonatos disminuye con la disminución en el grado de polimerización, llegando a que el digalacturonato no es hidrolizado y, en algunas de las enzimas, tampoco el trigalacturonato. Los pectatos con grupos acetilos esterificando a los oxhidrilos de los carbonos 2 y 3 son también degradados a la misma velocidad, pero los valores de las constantes de Michaelis se incrementan y no se llega hasta el mismo grado de hidrólisis final que en el caso anterior.

Las endo-PG pueden ser medidas evaluando el aumento del poder reductor o la disminución de la viscosidad de la solución del sustrato. Se han descrito distintos métodos de medida del incremento del poder reductor (Rexová-Benková, L. and Markovic, O., 1976), pero los preferidos son los test colorimétricos de Somogyi-Nelson (Spiro, R.G., 1966) y el de Milner (Milner, Y. and Avigad, G., 1967). Ambos métodos son convenientes ya que evitan el uso de condiciones de reacción fuertemente alcalinas bajo las cuales los sustratos con un alto grado de esterificación son degradados por una beta-eliminación incrementando la aparición de grupos reductores con lo que se obtienen valores de actividad enzimática con error en exceso.

Los métodos viscosimétricos son muy sensibles para el ensayo de las endo-PG. Estas enzimas producen un 50 % de caída en la viscosidad de una solución de pectato con un bajo porcentaje de hidrólisis de las uniones glicosídicas (Rombouts, F.M. and Pilnik, W., 1972). Debido a diferencias en su modo de acción, las enzimas de diferente origen pueden variar este porcentaje, aun bajo condiciones de ensayo cuidadosamente estandarizadas, situación similar a la que ocurre con las alfa-amilasas (Robyt, J.F. and French, D., 1967). Al respecto, se han descrito dos mecanismos de acción diferentes. En uno de ellos, en el complejo enzima-sustrato se hidroliza al azar una unión glicosídica, siguiendo una completa disociación en enzima



y productos. En el otro caso, la hidrólisis al azar de una unión glicosídica es seguida por una hidrólisis secuencial en uno de los productos, originando la liberación de oligogalacturonatos. El primer mecanismo tiene lugar con la enzima de *Kluyveromyces fragilis*, la cual hidroliza pectato mediante la producción de una serie de oligogalacturonatos de alto peso molecular, que son subsecuentemente hidrolizados hasta llegar finalmente al di y al monogalacturonato (Phaff, H.J., 1966). Un ejemplo del segundo mecanismo se encuentra en la enzima producida por *Colletotrichum lindemuthianum*, la cual a pesar de ser del tipo endo origina predominantemente tri y digalacturonatos durante todo el curso de la reacción (English, P.D. y col., 1972).

Las endo-PG también muestran diferencias considerables en los modos de acción sobre los oligogalacturonatos. Estas diferencias son determinadas tanto por la naturaleza del sitio activo de las enzimas como por el tamaño y la posición de los grupos catalíticos. Por ejemplo, una hipótesis (Rexová-Benková, L., 1973) sostiene que el sitio activo de la enzima de *A. niger* está compuesto por cuatro subsitios y que el grupo que cataliza la hidrólisis está situado entre los subsitios 1 y 2 (Fig. 4.4). Otro caso es el de las enzimas de tomate y de *Erwinia carotovora* en las cuales los sitios activos están formados por un número menor de subsitios, postulándose que habría otros sectores de la molécula de la enzima encargados de orientar a los sustratos con alto grado de polimerización (Koller, A. and Neukom, H., 1969).

Los grupos catalíticos de la endo-PG de *A. niger* son histidina y uno con un resto carboxílico (Rexová-Benková, L. and Slezárik, A., 1970), en tanto se presume que existen grupos carboxílicos y algunos alcohólicos secundarios del sustrato involucrados en las interacciones con la enzima (Rexová-Benková, L. y col., 1977).

En cuanto a las exo-PG podemos decir que se encuentran en plantas superiores, en el tracto intestinal de numerosos insectos, en hongos y

en algunas bacterias. Existen una serie de trabajos acerca de esta enzima de origen vegetal, entre las que se incluyen a las de zanahoria y durazno (Pressey, R. and Avants, J.K., 1975 a), frutas cítricas (Riov, J., 1975), pepino (Pressey, R. and Avants, J.K., 1975 b), pera (Pressey, R. and Avants, J.K., 1976), manzana (Bartley, I.M., 1978) y avena (Pressey, R. and Avants, J.K., 1977). En todos estos casos, las enzimas presentan mayor actividad con pectatos de no muy alto peso molecular, los cuales son atacados desde el extremo no reductor con producción de monogalacturonato. El pH óptimo es de alrededor de 5,0 y son estimuladas por la presencia de calcio.

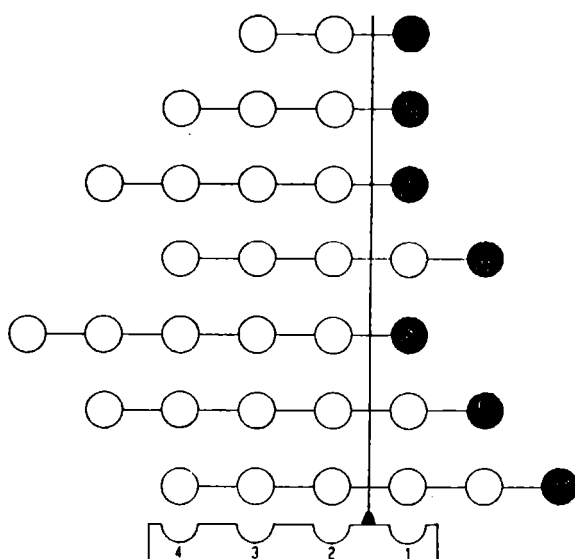


Fig. 4.4. Modelo de clivaje de oligogalacturonatos y del sitio activo de endo-PG de *A. niger*.

- Residuo de galacturonato.
- Grupo reductor terminal.
- Unión glicosídica.
- 1, 2 y 3: subsitios de unión.
- ▲ Sitio catalítico

La actividad de las *exo*-PG de insectos es proporcional al largo de la cadena de pectato del cual liberan monogalacturonato y como característica distintiva se puede decir que el sustrato es atacado por el extremo reductor (Courtois, J.E. y col., 1968).

En cuanto a las *exo*-PG microbianas, muchas de ellas tienen preferencia por oligogalacturonatos en tanto que, desde el punto de vista de su lugar de acción, las hay extracelulares como una de *A.*

*niger* (Heinrichová, K. and Rexová-Benková, L., 1976) y también unidas a la pared celular como la de *Acrocylindrium* sp. (Kimura, H. and Mizushima, S., 1973). Las *exo-PG* de *Erwinia aroideae* y la de una *pseudomona* prefieren sustratos de alto peso molecular que es hidrolizado desde el extremo no reductor (Hatanaka, C. and Imamura, T., 1974).

4.3.4.5. Poligalacturonatoliasas. Las *endo-PGL* son producidas por varios grupos de bacterias y por algunos hongos patógenos de vegetales. En la Tabla 4.6 se detallan algunas características generales de las *endo-PGL* más recientemente descritas.

Tabla 4.6: Principales propiedades de algunas *endo-PGL* de origen microbiano (Rombouts, F.M. and Pilnik, W., 1980).

Fuente de enzima	Punto isoeléctrico	Peso molecular	Actividad específica (1)	pH óptimo
<b>Bacterias</b>				
<i>Bacillus polymyxa</i>				8,3-9,6
<i>Bacillus subtilis</i>	9,85	33.000		8,5
<i>Erwinia aroideae</i>		37.000		9,1
<i>Erwinia carotovora</i>			90	8,5
<i>Pseudomona fluorescens</i>	10,3	42.300	956	9,4
<i>Streptomyces fradiae</i>			176	9,1
<i>Xanthomonas campestris</i>			1.050	9,5
<b>Hongos</b>				
<i>Cephalosporium</i> sp.			364	9,9
<i>Hyponyces solani</i> I*	10,2-10,5	32.400		8,5
II*		42.000		

(1) Unidades.mg<sup>-1</sup> de proteína.

\* Una de las múltiples isoenzimas.

La mayoría de estas enzimas tienen un alto valor de pH óptimo y un requerimiento absoluto por la presencia de calcio. Por medio de una beta eliminación en los sustratos se producen productos con una doble unión entre los carbonos 4 y 5 conjugada con el grupo carboxílico, lo que hace que tengan una máximo de absorción a 235 nm. Por ello, las *endo-PGL* pueden ser ensayadas convenientemente por métodos espectrofotométricos en el ultravioleta, con un

coeficiente de extinción de  $4.600 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$  (Macmillan, J.D. and Phaff, H.J., 1966).

Los pectatos son muy buenos sustratos para las endo-PGL, no así los galacturonatos altamente sustituidos como las gomas tragacanto y karaya. Usando tetragalacturonato se demostró que el verdadero sustrato de la enzima era la sal cálcica, mientras que el anión tetragalacturonato libre actuaba como un inhibidor competitivo (Atallah, M.T. and Nagel, C.W., 1977).

Su acción catalítica hace que la viscosidad de las soluciones de sustrato baje rápidamente con respecto al número de uniones glicosídicas cortadas. Además, su actividad disminuye con la disminución en el largo de la cadena del sustrato. Más específicamente, la constante de Michaelis aumenta con la disminución del peso molecular del sustrato, mientras que la velocidad máxima en condiciones de sustrato saturante permanece constante (Nagel, C.W. and Wilson, T.M., 1970). La mayoría de las endo-PGL descritas son capaces de degradar hasta trigalacturonato como el sustrato de menor peso molecular. Sin embargo, otras son incapaces de hacerlo. Esta propiedad permitió su clasificación en dos grandes grupos (Rexová-Benková, L. and Markovic, D., 1976).

Las exo-PGL son enzimas que atacan con preferencia pectatos y no pectinas, presentando un pH óptimo entre 8,0 y 9,5. En el caso de las producidas por *C. multifementans* y por *S. nitrospereus* es necesaria la presencia de calcio, no así con las de *Erwinia* sp aunque es fuertemente activada por la presencia de sodio (Hatanaka, C. and Ozawa, J., 1973).

La velocidad de reacción de las exo-PGL es la misma tanto con poligalacturonatos como con oligogalacturonatos, siendo el trigalacturonato el sustrato de menor peso molecular hidrolizado. El caso de la enzima producida por *C. multifementans* es particular ya que está complejada con una PE. El complejo es activo sobre pectina altamente esterificada, produciendo grupos carboxílicos libres y digalacturonatos insaturados en una relación de 2:1.

Aparentemente, las dos actividades actúan de una manera coordinada en la cual la cadena de sustrato pasa del sitio activo de la esterasa al de la liasa sin un intermedio disociado de las enzimas.

#### 4.3.5. Producción industrial.

4.3.5.1. Selección de microorganismos. El primer paso para el desarrollo o la mejora de un proceso industrial de producción de pectinasas es la búsqueda de microorganismos con un nivel de producción apropiado. Esta selección resulta usualmente del chequeo de cientos de cepas en cuanto a su capacidad productiva de una determinada enzima por los clásicos métodos en placa descritos para enzimas hidrolíticas en general (Dingle, J. y col., 1953). Otras alternativas interesantes son la realización de test más específicos como lo son los ensayos de clarificación de jugo de manzana, los tratamientos de homogeneizados de frutas y la maceración de discos de papa (Endo, A. and Miura, Y., 1961).

Una seria restricción en la búsqueda de nuevas cepas productoras es el hecho de que pocos microorganismos tienen la aprobación oficial para su uso en la industria alimenticia. Esta es probablemente la razón principal por la cual los preparados comerciales son obtenidos por cultivos generalmente del género *Aspergillus*, particularmente *A. niger*, *A. oryzae* y *A. wentii*. No se producen pectinasas de origen bacteriano a pesar de que ciertas bacterias como *B. subtilis* y *P. fluorescens* sintetizan constitutivamente grandes cantidades de PGL, enzima con importancia industrial en la elaboración de puré de papas y en la maceración de vegetales trozados.

Otro aspecto importante en la economía de los procesos de producción de pectinasas es el vinculado al aislamiento de mutantes más productivos, resistentes a la represión catabólica y formadores de grandes cantidades de enzima sin la necesidad del uso de inductores.

4.3.5.2. Sistemas de producción. En general, las enzimas microbianas se producen mediante dos grandes métodos a saber, procesos sumergidos o cultivos en superficie sobre sustratos sólidos. El primero de ellos posee ventajas de un mejor y mayor control sobre las variables del proceso por lo que está más ampliamente difundido. Sin embargo, se tiene la impresión que en el caso de las pectinasas se emplean actualmente métodos de cultivo en superficie en mayor medida que lo divulgado, ya sea por razones de rendimientos enzimáticos o bien por la composición de la mezcla de enzimas producidas.

El diseño de un medio de fermentación bien balanceado es una etapa crítica para la obtención de altos niveles enzimáticos. Así, en el caso de procesos sumergidos, la composición exacta de los medios industriales se mantiene en reserva. Estos generalmente contienen mezclas de carbohidratos (glucosa, melasas, almidones, harinas, etc.), sustancias nitrogenadas (macerado de maíz, extracto de levadura, gelatina, caseína, vinazas, etc.) y minerales. Con estos componentes se pueden producir enzimas que sean constitutivas, pero la mayoría de las pectinasas comerciales son inducibles por lo que se hace necesario el agregado de sustratos conteniendo pectina tales como pulpa de remolacha, cáscara de frutos cítricos u orujo de manzana. Además del efecto inductor, la presencia de pectina favorece la liberación de las enzimas del micelio (Nyiri, L., 1968).

En el caso del uso de cultivos sólidos para la producción de pectinasas, el medio se prepara a partir de afrecho de trigo adicionado de otros ingredientes similares a los mencionados anteriormente. Todos ellos se mezclan con agua de acuerdo con ciertas especificaciones a los efectos de que no quede una fase líquida libre. Los procesos se pueden llevar a cabo tanto en cámaras cerradas con bandejas perforadas en su interior conteniendo capas del medio de cultivo o bien, en tambores rotatorios horizontales de varios metros de diámetro con sustrato ocupando entre 1/2 y 2/3 del volumen. Después de la inoculación con la suspensión de esporos

se hace circular aire a través de los reactores el cual puede o no ser humectado y/o termostatzado para mantener las condiciones del proceso dentro de los rangos más apropiados.

En ambos sistemas de cultivo el tiempo requerido para la máxima producción enzimática varía entre 1 y 6 días. Completada la fermentación, en el caso de procesos sumergidos se separa la masa celular por centrifugación o filtración. En los medios sólidos, las enzimas deben ser extraídas por medio de equipos de extracción en contracorriente empleando agua adicionada o no de conservadores. Alternativamente, la masa fermentada puede ser secada al vacío y molida, obteniéndose un preparado comercial crudo.

En ambos casos, la solución enzimática obtenida puede ser concentrada al vacío o bien se pueden someter a una precipitación fraccionada mediante la adición de sales tales como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  o  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  o con solventes orgánicos como isopropanol, acetona, acetato de etilo, metanol o etanol. Luego de la precipitación, la torta de proteínas se separa por centrifugación o filtración y se seca al vacío a bajas temperaturas o puede redisolverse para obtener un concentrado enzimático con la adición de estabilizantes. En el caso de un preparado en polvo se tamiza y se formula mezclándose con inertes tales como gelatina, caseína, glucosa, sacarosa, lactosa, almidón y sales que también pueden usarse en un preparado líquido. La tierra de diatomeas es un excipiente empleado cuando el preparado enzimático va a usarse en un proceso en el cual la solución a tratar va a ser posteriormente filtrada. En algunos casos, se adicionan buffers y sales a los efectos de mantener un pH apropiado para lograr la máxima estabilidad del preparado enzimático.

Se estima que el mercado mundial de enzimas empleadas por la industria alimenticia es de alrededor de 45 millones de dólares anuales, del cual algo menos de un cuarto corresponde a las pectinasas manufacturadas por distintas compañías en Europa, EE.UU y Japón.

#### 4.3.6. Aplicaciones.

4.3.6.1. Procesamiento de frutas. En muchos procesos de elaboración de productos conteniendo frutas, la presencia de pectinasas tiene efectos indeseables. Las peras y duraznos que van a ser enlatados se ablandan durante el almacenamiento a menos que la actividad enzimática propia de la fruta sea inhibida. Un escaldado previo al cocimiento de la fruta logra estos fines. También la adición de calcio o la de  $\text{SO}_2$  dan buenos resultados. En el caso de la industria de dulces, mermeladas y jaleas, la inactivación de las enzimas juega un papel importante en la calidad del producto ya que de lo contrario luego de la cocción la fruta pierde su forma o no se logra la consistencia adecuada.

Por otra parte, la producción de concentrados de tomate de alto grado Brix sería imposible a menos que su pectina sea totalmente degradada. Una ventaja es la presencia nativa de PE y de PG que colaboran en la hidrólisis. En cambio, las frutas cítricas son ricas solamente en PE, lo que hace que en la preparación de sus concentrados se formen pectatos de calcio que dan aspecto indeseable al producto. Esto a su vez es a veces buscado como en el caso del dulce de zapallo en trozos debido a que el pectato cálcico hace mantener su forma.

Como consecuencia de lo anterior podemos decir que la presencia de pectinasas nativas en frutas puede tener o no un efecto beneficioso dependiendo del tipo de producto a elaborar. Sin embargo, un punto importante es el hecho de que las medidas específicas de las distintas actividades enzimáticas proveen importante información en cuanto a resolución de problemas industriales relacionados con la gelificación, viscosidad y enturbiamiento de distintos productos alimenticios.

4.3.6.2. Clarificación de jugos de frutas. El uso de pectinasas en los procesos de obtención de jugos de frutas es una práctica que



se realiza en Alemania y EE.UU. desde la década de 1930. En la elaboración de jugos clarificados, la degradación de las sustancias pécticas es necesaria para asegurar una adecuada transparencia en el producto final. En otros casos, la eliminación de estos polímeros facilita el prensado de la fruta a los efectos de obtener altos rendimientos en jugo.

En el proceso de clarificación del jugo de manzana, cuando las pectinasas son adicionadas se produce una rápida caída en la viscosidad después de un período lag de unos 10-15 min. Después de cierto tiempo, que depende de la temperatura, tipo de fruta y cantidad y actividad de enzima adicionada, se produce un cuáguo que flocula lentamente. De las características de este proceso se puede dilucidar la eficiencia de una preparación enzimática. Luego el jugo es centrifugado o filtrado a través de tierra de diatomeas. Durante este tiempo se desarrolla un color más oscuro debido a la presencia de polifenol oxidasas, fundamentalmente en el flóculo, en tanto que el sobrenadante no es tan afectado. Sin embargo, es conveniente que los tiempos de tratamiento no se extiendan en demasía a los efectos de lograr un producto de la mejor calidad posible por lo que los preparados enzimáticos deben tener una alta actividad clarificante (Kilara, A., 1982).

Por otra parte, se ha descripto una mejora en la calidad de la sidra cuando el jugo de manzana destinado a su elaboración es sometido a un tratamiento con pectinasas (Bauchwitz, E., 1966).

El jugo de uva debe poseer un buen cuerpo y, por lo tanto, una alta viscosidad. De ello uno podría asumir que el uso de pectinasas no es necesario. Sin embargo, los fabricantes buscan productos con gran intensidad de color lo que se logra aumentando la eficiencia en la extracción de los pigmentos presentes en la cáscara durante el prensado. Esto se logra con la adición de pectinasas antes de la expresión de las uvas, lo que también aumenta el rendimiento del proceso. Una adecuada dosificación de las enzimas logra los citados objetivos sin una excesiva pérdida en la viscosidad del jugo

(Cantarelli, C., 1984).

4.3.6.3. Clarificación de vinos. El uso de pectinasas con este fin fue propuesto primeramente por Cruess y Besone (Cruess, W.V. and Besone, J., 1941). Es conveniente adicionar las enzimas al mosto antes de la fermentación si es que esto no se ha realizado durante el prensado de las uvas. Esta última alternativa da mejores resultados y si es llevada a cabo a alta temperatura se incrementa significativamente la extracción de los pigmentos de las cáscaras. El uso de pectinasas está fundamentalmente recomendado en la elaboración de vinos tintos que son fermentados en presencia de los hollejos de la uva (Urlaub, R., 1978).

Aparentemente, no se ha estudiado en detalle el efecto de las PG de levaduras durante la fermentación. Parece que sus endo-PG son inefectivas a menos que las PE nativas del jugo sean activas. En el caso de la elaboración de sidra, si el jugo de manzana ha sido pasteurizado antes de la inoculación con levaduras no existe ataque a las sustancias pécticas a menos que se hallan adicionado pectinasas. Estos hechos hacen que el nivel de metanol en vinos esté muy limitado a menos que se utilicen enzimas en su elaboración. En este caso, se ha demostrado que dichos niveles se incrementan sustancialmente por lo que es necesario efectuar controles periódicos (Kilbuck, J.H. y col., 1951).

4.3.6.4. Otras aplicaciones. El antiguo proceso de enriado, mediante el cual se preparan importantes fibras textiles tales como el lino (*Linum usitatissimum*), el cáñamo (*Cannabis sativa*) y el yute (*Corchorus* sp) está vinculado a las pectinasas de ciertos microorganismos que degradan la lámina media de las fibras vegetales. Estos son procesos que no han evolucionado científicamente debido, tal vez, a la mayor demanda por las fibras sintéticas, por lo que los procedimientos involucrados no han cambiado mucho con el tiempo.

Existe un proceso anaeróbico en el cual los microorganismos involucrados son principalmente del género *Clostridium* y que es llevado a cabo en Irlanda sumergiendo al lino en pequeñas lagunas, y en Bélgica y otros países en tanques de cemento. Otro procedimiento consiste en esparcir a los vegetales sobre el suelo durante un período de unas 2 a 10 semanas, en el cual crecen fundamentalmente hongos entre los que se han aislado especies de los géneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. Hasta el presente, no se ha reportado el uso de preparados enzimáticos en este tipo de procedimientos.

Se pueden preparar pectinas de bajo tenor en metoxilos para ser usadas en la elaboración de geles de pectinato de calcio no sólo por hidrólisis parcial ácida o alcalina de los metil ésteres de la pectina sino también mediante el uso de PE fúngica libre de actividad de PG. Para ello es necesario inactivar, en el caso de estar presente, a las PG mediante tratamiento con urea de los preparados enzimáticos a emplear (Smythe, C.V. y col., 1952). El pH óptimo de las PE fúngicas generalmente coincide con el de los jugos de frutas, por lo que se pueden hacer geles de pectina con ellos en presencia de calcio y una concentración de azúcar del 25-30 % (Calesnick, E.J. y col., 1950).

Las pectinasas también pueden usarse en la extracción de aceites de cítricos ya que facilitan la ruptura de los geles formados, por lo que se incrementa el rendimiento particularmente en el caso de aceite de limón y de naranja.

También en la industria del café se emplean pectinasas para colaborar en la eliminación de la capa de mucílagos que rodea a los granos frescos, lo que usualmente se logra mediante una fermentación natural (Riviere, J., 1977).

Finalmente, uno de los usos potenciales de las pectinasas está relacionado con el tratamiento de maderas blandas a los efectos de facilitar la penetración de los preservativos empleados en su procesamientos tales como creosota y mezclas de cobre, cromo y boro.

En los métodos clásicos, esto es dificultoso aun bajo presión. Las enzimas facilitarían el proceso debido a la disolución de la lámina media de los tejidos vegetales, con aumento en la permeabilidad de la madera (Nicholas, D.D. and Thomas, R.J., 1968).

#### 4.4. MATERIALES Y METODOS

##### 4.4.1. Microorganismos e inóculos.

Las experiencias se realizaron empleando una cepa de *Aspergillus foetidus* (NRRL 341, ATCC 16878) conocida por su empleo en estudios para la producción de pectinasas (Brooks, J. and Reid, W.W., 1955; Zetelaki, K., 1976). La misma fue cultivada a 30 °C en agar papa glucosado (PDA) (The American Type Culture Collection, 1978) y los esporos obtenidos se conservaron tanto congelados a -70 °C en solución de glicerol al 15 % como liofilizados empleando suero equino como soporte. Además, se sembró una serie de tubos con PDA recto cubriéndose los desarrollos obtenidos con vaselina y manteniéndose a 4 °C. Para la preparación de los inóculos de los procesos se sembraron esporos provenientes de esta última serie de tubos en erlenmeyers de 125 mL de capacidad conteniendo 40 mL de PDA, se incubaron 7 días a 30 °C y los esporos producidos se resuspendieron en solución de Tween 80 al 0,01 %. Las otras formas de conservación de la cepa fueron preparadas pensando en la posibilidad de que bajo vaselina ocurrieran problemas en el mantenimiento del microorganismo, que afortunadamente no sucedieron. En virtud de ello, no fue necesario utilizarlas durante el tiempo que demandó el presente trabajo.

#### 4.4.2. Medios de cultivo.

##### 4.4.2.1. Materias primas.

**Orujo de manzana:** A lo largo del presente capítulo se emplearon cinco tipos diferentes de orujo de manzana, cuyo origen y composición química se discutió en el capítulo 1.

**Fuentes nitrogenadas orgánicas:** Se ensayaron diferentes sub-productos de la industria alimenticia como fuentes nitrogenadas complejas para los medios de cultivo. A continuación se detallan indicándose entre paréntesis su humedad y contenido de nitrógeno total (%): afrecho de trigo (13,7; 2,7), germen de trigo (13,0; 5,0), raíz de malta (8,3; 4,3), afrecho de arroz (11,7; 2,6) y macerado de maíz (1,0; 8,0). Además, se utilizaron otras fuentes nitrogenadas clásicas como lo son el extracto de levadura (Oxoid) y la Bacto peptona (Difco).

**Otros componentes:** Las demás drogas empleadas fueron de grado analítico, utilizándose agua destilada en todos los casos.

##### 4.4.2.2. Composición de los medios de cultivo.

Para la preparación del PDA se reemplazaron las papas por un puré comercial en escamas (Cheff, Nestlé Argentina) debido a una mayor facilidad en la preparación y a la reproducibilidad obtenida. Para tal fin se tomó en cuenta que las papas poseen alrededor de un 80 % de humedad, con lo cual la cantidad usada de puré fue del 20 % de la que tiene el PDA. En este medio se logra un desarrollo fúngico abundante y homogéneo, sin diferencias morfológicas apreciables frente a testigos elaborados con papas frescas. Por otra parte, el empleo de este sustituto evita las variaciones que pueden tener lugar al usar papas con diferentes tiempos de almacenamiento a lo largo del año.

Para el desarrollo de los primeros procesos fermentativos se empleó un medio de cultivo base cuya composición se detalla en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7: Composición del medio de cultivo base.

Orujo de manzana 2 .....	1000 g
Macerado de maíz .....	20 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	2,0 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,5 g
pH (sin ajustar) .....	4,1

A los largo de las experiencias se realizaron modificaciones al mismo, las cuales serán indicadas cuando corresponda.

#### 4.4.3. Desarrollo de los procesos fermentativos.

Para los mismos se emplearon cajas de petri de 8,5 cm de diámetro interno conteniendo 25 g de orujo de manzana, la cantidad correspondiente de fuente nitrogenada orgánica y 2 mL de una solución con las sales inorgánicas, todo lo cual se mezcló cuidadosamente para lograr la mayor homogeneidad posible y la pasta resultante se alisó con espátula hasta obtener una superficie sin ondulaciones. En los casos en que fue necesario un ajuste del pH, la preparación se hizo en común para todas las cajas y se fraccionó posteriormente en cada una de ellas. En las citadas condiciones, el medio de cultivo alcanza a tener una altura de alrededor de 0,4 cm.

Una vez cargadas, las cajas de petri se esterilizaron durante 15 min a 121 °C, colocándolas en el fondo del autoclave evitando la superposición de unas sobre otras a los efectos de que el calentamiento fuera lo más similar posible a todas ellas.

Cuando las cajas de petri alcanzaron la temperatura ambiente (en ningún caso se demoró su siembra a los efectos de evitar una mayor pérdida de humedad) se inocularon con 2 mL de una suspensión de esporos conteniendo  $1,25 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> (a menos que se diga lo contrario), la cual fue distribuida por medio de una pipeta lo más homogéneamente posible. Debe mencionarse que en todos los casos los esporos quedaron esparcidos sobre la superficie del medio de cultivo y que nunca se procedió a mezclarlos con él.

La incubación se realizó en la mayoría de los casos a 30 °C en una estufa con circulación forzada de aire, conteniendo una bandeja con agua a los efectos de mantener la humedad en el interior.

#### 4.4.4. Procedimientos analíticos.

4.4.4.1. Técnicas analíticas empleadas con el orujo de manzana. Para tal fin, se emplearon las metodologías descritas en el capítulo 2, excepto las que se detallan a continuación.

Para la determinación de azúcares solubles y sustancias pécticas se procedió de la siguiente manera: una muestra de orujo de manzana exactamente pesada se trató exhaustivamente con etanol (80 % v/v en la mezcla final). El residuo sólido se secó y molió y las sustancias pécticas se extrajeron con HCl 0,05 N, se precipitaron con etanol y se secaron a 30 °C para medirse gravimétricamente (Kertesz, Z.I., 1951). Por otra parte, una alícuota del extracto alcohólico anterior se evaporó a sequedad al vacío y resuspendió en una mezcla de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 80:20 (v:v) y los azúcares se determinaron cuali y cuantitativamente en un equipo de HPLC usando una columna microBondapak/Carbohydrate (Waters Assoc.).

#### 4.4.4.2. Analítica de los procesos fermentativos.

Análisis de las muestras de proceso. El muestreo se realizó en cada caso con tres cajas de petri, las cuales se procesaron por separado y los resultados obtenidos se promediaron.

Una vez finalizados los procesos, se mezcló cuidadosamente todo el contenido de cada caja de petri y se tomó el pH introduciendo directamente el electrodo dentro de la masa fermentada. Una porción perfectamente pesada de aproximadamente la mitad del total de la misma se llevó a 50 mL en probeta con buffer acetato (0,2 M; pH: 4,0) y se dejó extraer durante 20 min con agitación frecuente. Cumplido el

tiempo, se filtró a través de seda de vidrio y el filtrado se congeló a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en varias alícuotas para su posterior análisis (a esta solución se la denominará de aquí en más solución para análisis, SA). El resto del contenido de la caja de petri perfectamente pesado se secó a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  para determinar la pérdida de peso seco y luego fue empleado en la medida del contenido de glucosamina.

En la SA correspondiente a cada muestra se realizó la determinación de azúcares totales mediante la técnica del fenol-sulfúrico, empleando fructosa como patrón ya que este es el azúcar más abundante en el orujo. En algunos casos se utilizó un equipo de HPLC con el mismo fin, usándose un protocolo similar al mencionado para el análisis de los azúcares del orujo de manzana.

Para la estimación del crecimiento celular se utilizó el contenido de glucosamina en el medio de cultivo secado (Ride, J.P. and Drysdale, R.B., 1972). A tal efecto se realizó un desarrollo en medio líquido conteniendo jugo de manzana diluido (4 % de azúcares totales) suplementado con 2 % de macerado de maíz, 0,2 % de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 0,05 % de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH: 4,1. El micelio obtenido se lavó, secó y molió, evaluándose su contenido en glucosamina que resultó ser de  $70,4\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Sin embargo, este valor debe ser considerado de manera sólo aproximada ya que como se menciona en la bibliografía la relación de quitina (el polímero de N-acetilglucosamina constituyente de la pared celular del micelio) a peso del hongo puede cambiar en función de su edad, morfología y las condiciones ambientales en las cuales crece el microorganismo (Aidoo, K.E. y col., 1981).

Por otra parte, para tener una idea del metabolismo oxidativo del microorganismo durante el cultivo, se midió la pérdida de peso seco por diferencia entre las muestras iniciales y las del proceso, refiriéndolas al total del contenido de la caja (Peñaloza, W. y col., 1985).



4.4.4.3. Medida y caracterización de la actividad enzimática. La actividad pectolítica fue determinada por medio de un viscosímetro Ostwald a 30 °C empleando una mezcla de reacción consistente en 1 mL de buffer acetato (0,2 M; pH: 4,0) conteniendo 2,5 % de pectina de manzana y 1 % de NaCl y 4 mL de una dilución adecuada de la SA correspondiente (Tuttobello, R. and Mill, P.J., 1961 b). La actividad se calculó midiendo la cinética de disminución de la viscosidad e interpolando por medio de un programa de computadora el tiempo necesario para llegar a una caída del 50 % de la viscosidad relativa inicial (A) que se define como:

$$A = \frac{V_0 - V_T}{V_0 - V_B}$$

donde:  $V_0$  es el tiempo de flujo de la solución de pectina con enzima inactivada,  $V_B$  idem con solución de NaCl al 1 % en buffer con enzima inactivada y  $V_T$  idem con solución de pectina y enzima.

En nuestro caso, el tiempo de reacción se tomó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$t_R = t_0 + 1/2 t_T,$$

donde:  $t_R$  es el tiempo de reacción,

$t_0$  es el tiempo al cual el menisco de la mezcla de reacción pasa a través de la marca superior del viscosímetro y

$t_T$  es el tiempo de flujo total.

Como sustrato se empleó una pectina de manzana comercial que fue purificada por lavado con solución acidificada de etanol al 60 % (v/v) para eliminar impurezas (fundamentalmente azúcares que se agregan como excipientes) que tenía un contenido de anhídrido urónico de alrededor del 73 % y uno de metoxilos del 7 %. Esta pectina presentaba en solución al 0,5 % en el buffer de reacción una viscosidad 3,7 veces mayor a la del agua.

En nuestro caso, la unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que bajo las condiciones de reacción produce una caída del 50 % en la viscosidad relativa en 10 min.

Para la medida de endo-PG, se emplearon las mismas condiciones de reacción y definición de unidad enzimática excepto que el sustrato empleado fue polipectato de sodio (Sigma Chemicals Inc.).

A fin de caracterizar el conjunto de enzimas producidas, se purificaron distintas SA por ultrafiltración en un Centricom Microconcentrator con un cut off de 10.000 de peso molecular (Amicon Corp.) a fin de eliminar compuestos que pudieran interferir en las determinaciones.

Las distintas enzimas pectolíticas se caracterizaron por medio de una técnica electroforética usando tanto pectina cítrica (Sigma Chemicals Inc.) o polipectato de sodio en corridas diferentes (Cruickshank, R.H. and Wade, G.C., 1980). En cada caso, se colocó alrededor de una unidad viscosimétrica en cada punto de siembra.

La evaluación de endo-PMGL y endo-PGL se realizó por medida del incremento en la absorbancia a 235 nm de una dilución apropiada de enzima ultrafiltrada en solución 0,5 % de pectina cítrica o polipectato de sodio en buffer acetato (0,1 M; pH: 4,0) a 30 °C (Rombouts, F.M. and Pilnik, W., 1980).

Para finalizar, se determinó la presencia en las SA de otras enzimas no pectolíticas que pudieran producirse. Para tal fin se emplearon test cualitativos comunes usando placas de agar al 2,5 % buffereado a pH: 4,0 conteniendo los sustratos específicos de las siguientes enzimas: amilasas, celulasas, hemicelulasas, proteasas y lipasas.

En todos los casos de medidas enzimáticas, la solución a ser evaluada se mantuvo congelada desde la finalización del proceso fermentativo correspondiente, por lo tanto fue sometida a una sola etapa de congelación y descongelación a fin de evitar la pérdida de actividad asociada a las mismas.

4.4.4.4. Ensayos de clarificación de jugo de manzana. Los ensayos de clarificación se realizaron empleando jugo fresco de manzanas Red Delicious, Golden Delicious y Granny Smith obtenido en el laboratorio

por medio de una prensa hidráulica usando una fina tela a manera de filtro. Luego, el jugo se calentó a 80 °C durante 2 min para inactivar las enzimas nativas que pudieran presentar actividad clarificante e interferir en los resultados. Para los ensayos se utilizaron 100 mL de jugo a los que se le adicionó 30 mg.L<sup>-1</sup> de una amiloglucosidasa comercial, 50 mg.L<sup>-1</sup> de gelatina y las diferentes cantidades de los preparados crudos de enzima, todo lo cual se colocó en erlenmeyers de 125 mL de capacidad y se incubó a 40 °C con una agitación suave. Se tomaron muestras periódicamente, las cuales se calentaron a 100 °C durante 3 min para detener la actividad enzimática y se centrifugaron a 4000 G, 10 min. Como criterio de la evolución de la clarificación se midió la transmitancia a 660 nm y se ensayaron los test de alcohol y iodo para determinar la presencia de restos de sustancias pécticas precipitables y de almidón respectivamente. A su vez, se hicieron controles de la clarificación empleando jugo sin adiciones y también la mezcla de reacción sin pectinasas (Bauman, J.W., 1981).

#### 4.5. RESULTADOS Y DISCUSION

##### 4.5.1. Descripción de un experimento típico.

En la figura 4.5 se muestran los resultados de un experimento típico de producción de pectinasas. Como puede observarse, la velocidad de producción enzimática más alta tiene lugar entre las 12 y las 36 h cuando se alcanza el 90 % de la actividad máxima. De acuerdo a los valores de glucosamina de este período, la síntesis enzimática parece estar directamente relacionada al crecimiento del micelio, calculándose una biomasa a las 36 h de 4,4 mg de micelio seco por gramo de orujo de manzana. Los análisis por HPLC indican que tanto la glucosa como la fructosa son metabolizadas a la misma velocidad durante todo el proceso, en cambio la sacarosa, que no fue detectada aun en la muestra inicial, parece ser hidrolizada totalmente durante el autoclavado.

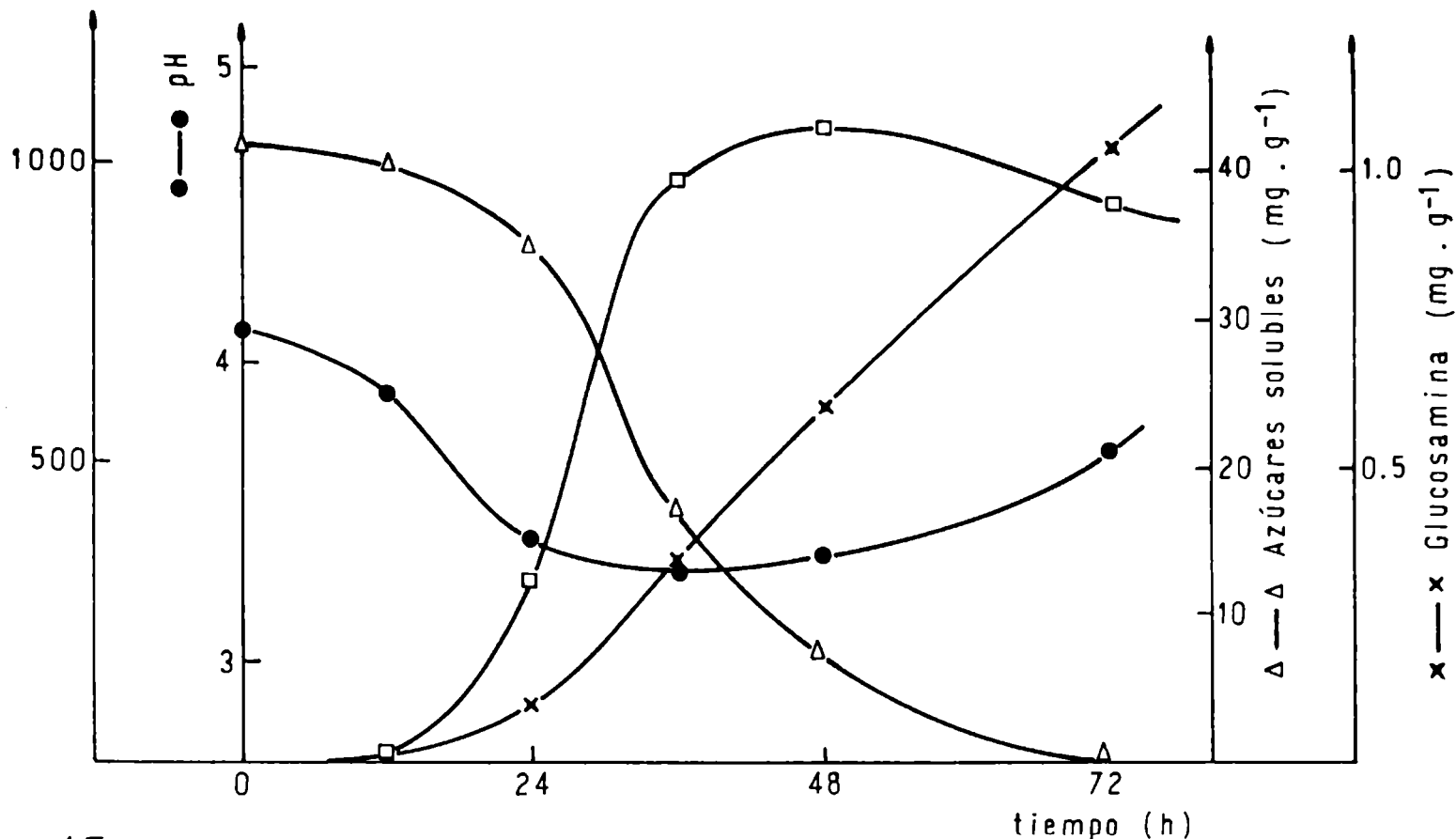


Fig. 4.5. Desarrollo de un proceso típico de producción de pectinasas. Los valores están expresados por gramo inicial de orujo de manzana.

No se puede explicar fácilmente la abrupta disminución en la velocidad de producción enzimática observada después de las 36 h. Una causa puede ser el consumo de un compuesto esencial o la aparición de un inhibidor de la biosíntesis enzimática. Otra posibilidad es que exista una limitación en el aporte de oxígeno debido a que a las 48 h se observa que el cultivo se halla cubierto por una espesa capa de micelio. Es de destacar que una adecuada aereación es esencial para un buen rendimiento en pectinasas, como fue demostrado para *A. niger* en cultivo sumergido (Mukherjee, S.K. and Majumdar, S.K., 1971). Por otra parte y como se dijo en el capítulo 3, uno de los mayores problemas que tienen las fermentaciones sobre sustratos sólidos es, precisamente, un suministro adecuado de oxígeno, sobre todo en etapas avanzadas de proceso cuando la demanda es alta y la cantidad de biomasa presente dificulta los fenómenos de transporte de materia (Zadrazil, F. and

Brunnert, H., 1981).

También es importante mencionar que después de las 48 h comienza la esporulación lo que indica un profundo cambio en el metabolismo del hongo. El incremento en los niveles de glucosamina observado entre las 48 y 72 h puede ser principalmente adjudicado al proceso de esporulación del cual se sabe que requiere una considerable síntesis de pared celular (Smith, J.E. y col., 1977).

#### 4.5.2. Influencia de la fuente de nitrógeno.

Con el fin de estudiar el efecto de algunos cambios en los componentes del medio de cultivo, se ensayaron 6 fuentes distintas de nitrógeno orgánico, tomando siempre al macerado de maíz como testigo, en procesos de 48 h usando orujo de manzana 2 (en todos los casos, el nitrógeno total de los medios fue de 0,3 %). Los valores obtenidos (Tabla 4.8) fueron similares a los del testigo en el caso de los medios conteniendo extracto de levadura o peptona. Sin embargo, sólo un 10-20 % de este valor se obtuvo con los otros suplementos.

Tabla 4.8: Influencia de la fuente de nitrógeno sobre la producción de pectinasas.

Medio	Adición de:		%	pH		Actividad enzimática (U.g <sup>-1</sup> )
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> %	Fuente nitrogenada orgánica		Inicial	Final	
1*	0,2	Macerado maíz	2,0	4,1	3,5	1100
2	0,2	Extracto levadura	1,6	4,0	3,2	1250
3	0,2	Bacto peptona	1,1	4,1	3,2	900
4	0,2	Raíz de malta	7,0	4,1	3,3	250
5	0,2	Afrecho de trigo	6,9	4,3	3,3	230
6	0,2	Germen de trigo	3,7	4,2	3,2	135
7	0,2	Afrecho de arroz	4,0	4,8	3,3	130
8	0,66	Ninguna	-	3,7	2,8	130
9**	0,66	Ninguna	-	3,7	2,8	50

\*Medio basal.

\*\*Suplementado con las siguientes sales (mg %): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200; KCl 50; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 25; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 20; MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,04; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,04 (Mukherjee, S.K. and Majumdar, S.K.; 1971).

Todos los medios contienen orujo 2 con 0,05 % de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El contenido de nitrógeno de los medios incluyendo el aportado por el orujo es de 0,3 %.

Inóculo: 10<sup>8</sup> esporos.g<sup>-1</sup>. Temperatura: 30 °C. Tiempo de proceso: 48 h.

Estos resultados sugieren que la extracción del nitrógeno orgánico durante el autoclavado fue insuficiente y/o que para una buena síntesis enzimática son necesarios altos niveles de fracciones de nitrógeno orgánico como aquellas presentes en forma libre en los suplementos citados primeramente. Además, se puede observar que usando solamente  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  como fuente de nitrógeno se obtiene un bajo rendimiento y a su vez, éste disminuye por la adición de micronutrientes debido probablemente a la presencia de uno o más elementos en concentraciones nocivas para el microorganismo (Meyrath, J. and Volavsek, G., 1975).

#### 4.5.3. Influencia del inóculo.

Es bien conocido el efecto que tiene la variación del tamaño del inóculo sobre el crecimiento de los microorganismos tanto en cultivos sumergidos como en sustrato sólido (Meyrath, J. and Suchanex, G., 1972).

En nuestro caso, se estudió el efecto de variar 1000 veces la concentración del inóculo. Con siembras que van de  $10^3$  a  $10^6$  esporos por gramo de orujo la velocidad de la fermentación se incrementa en las primeras etapas del cultivo con el aumento del inóculo (Tabla 4.9) pero los rendimientos finales son similares y se alcanzan al mismo tiempo. Con el máximo nivel de inóculo ( $10^6$  esporos. $\text{g}^{-1}$ ) se observó alrededor de un 10 % de disminución en la actividad enzimática máxima aunque, en este caso, la productividad a las 24 h de proceso es mayor.

Como se mencionó anteriormente, los valores de glucosamina indican una bastante buena relación entre el crecimiento y la producción enzimática hasta las 36 h de cultivo en la cual del 80 al 90 % de la máxima producción se alcanza independientemente del inóculo empleado. En este momento, la pérdida de peso seco, parámetro íntimamente relacionado con la metabolización de fuente de carbono para la obtención de energía, representa del 27 al 31 % del contenido inicial de azúcares solubles. Después de las

36 h, la velocidad de crecimiento disminuye y los cambios en el contenido de glucosamina y la pérdida de peso seco pueden ser principalmente adjudicados al proceso de esporulación que comienza a ser evidente.

Tabla 4.9. Efecto del inóculo sobre la producción de pectinasas.

Inóculo (esporos por g de orujo)	Tiempo (h)	pH	Contenido de glucosamina (mg.g <sup>-1</sup> )	Pérdida de peso seco (mg.g <sup>-1</sup> )	Actividad pectolítica (U.g <sup>-1</sup> )
10 <sup>3</sup>	0	4,0	0,02	-	0
	12	3,9	0,02	-	0
	24	3,6	0,03	-	45
	36	3,3	0,30	11,0	920
	48	3,2	0,55	16,0	1100
	72	3,7	0,98	43,0	1150
10 <sup>4</sup>	0	4,0	0,02	-	0
	12	3,9	0,02	-	0
	24	3,3	0,06	4,8	220
	36	3,2	0,33	11,9	990
	48	3,2	0,67	19,3	1120
	72	3,6	0,95	40,1	1100
10 <sup>5</sup>	0	4,0	0,02	-	0
	12	3,8	0,03	-	0
	24	3,4	0,09	6,4	300
	36	3,3	0,36	12,8	990
	48	3,4	0,75	21,0	1070
	72	3,7	1,03	43,0	980
10 <sup>6</sup>	0	4,0	Sin datos	-	0
	12	3,8	"	-	0
	24	3,2	"	9,0	800
	36	3,1	"	14,7	930
	48	3,2	"	25,7	900
	72	3,4	"	40,1	940

Los procesos se realizaron con orujo de manzana tipo 2 en el medio basal a 30 °C.

El hecho de que dentro del gran rango de inóculos estudiado no se observen diferencias sustanciales puede considerarse como muy importante ya que permite un amplio margen de error en la siembra de los procesos y también posibilita disminuir las necesidades de preparación de un gran número de esporos, con las dificultades que ello implica sobre todo en escala industrial.

Los anteriores resultados son diferentes a los descriptos para *A. niger* en cultivo sumergido, donde la cantidad de inóculo ejerce una gran influencia sobre el rendimiento de la fermentación

(Tuttobello, R. and Mill, P.J., 1961 a).

#### 4.5.4. Influencia de la temperatura.

Como puede ser visto en la Tabla 4.10, la temperatura óptima para la producción enzimática es de 30 °C a diferencia de los resultados obtenidos para *A. niger* en cultivo sumergido donde este valor es de 37 °C (Tuttobello, R., 1978)

A 25 °C la velocidad de fermentación es menor y los rendimientos enzimáticos a las 48 h son de alrededor del 50 % de los obtenidos a 30 °C. A 35 °C el crecimiento tiene lugar como se desprende de los valores de glucosamina y de pérdida de peso seco, pero la síntesis de pectinasas está marcadamente reducida.

Tabla 4.10. Efecto de la temperatura sobre la producción de pectinasas.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	pH	Contenido de glucosamina (mg.g <sup>-1</sup> )	Pérdida de peso seco (mg.g <sup>-1</sup> )	Actividad pectolítica (U.g <sup>-1</sup> )
25	24	3,8	0,039	-	7
	36	3,4	0,106	3,3	207
	48	3,2	0,29	9,6	615
30	24	3,6	0,07	4,0	217
	36	3,3	0,32	11,4	980
	48	3,4	0,70	19,6	1140
35	24	3,6	0,16	4,8	81
	36	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
	48	3,0	0,79	24,1	93

Los procesos se realizaron con orujo tipo 2 en el medio basal. Inóculo: 10<sup>4</sup> esporos.g<sup>-1</sup>.

#### 4.5.5. Influencia del tipo de orujo de manzana.

Los resultado obtenidos con diferentes tipos de orujo de manzana se muestran en la Tabla 4.11. Empleando un orujo de alto contenido de azúcares (tipos 3a y 4a) la producción enzimática a las 48 h de proceso es de alrededor del 30 % de los valores obtenidos en el medio testigo con orujo tipo 2. Además, los valores de glucosamina y de pérdida de peso seco son también menores lo que indican una modificación en el metabolismo y el crecimiento fúngico usando este tipo de orujo. Por otra parte, la actividad enzimática no se



incrementa en períodos más prolongados de cultivo. En orujos de bajo contenido de azúcares (tipos 3b y 4b) se obtienen bajos rendimientos enzimáticos, aunque en este caso se observan valores mayores en las muestras más ácidas.

Tabla 4.11. Efecto del tipo de orujo de manzana sobre la producción enzimática.

Tipo de orujo	Valores iniciales		Tiempo (h)	pH	Contenido de glucosamina (mg.g <sup>-1</sup> )	Pérdida de peso seco (mg.g <sup>-1</sup> )	Actividad pectolítica (U.g <sup>-1</sup> )
	Azúcares solubles (mg.g <sup>-1</sup> )	pH					
2	41	4,0	48	3,4	0,70	22,0	1190
3a	91	4,1	48	3,0	0,53	14,4	360
			72	3,5	0,95	44,0	320
3b	20	4,0	48	3,5	0,49	-	162
4a	91	3,3	48	2,9	0,55	17,3	380
			72	3,3	1,27	49,8	360
4a*	91	4,1	48	3,2	0,53	19,5	312
4b	15	3,3	48	3,1	0,45	20,4	290
3a (29%) + + 3b (71%)	40	4,1	48	3,3	-	-	750
4a (34%) + + 4b (66%)	41	3,3	48	3,1	0,75	22,0	1100
4a (34%) + + 4b (66%)*	41	4,1	48	3,5	0,72	21,6	900

\* El pH inicial se ajustó por adición de solución de NaOH.  
Los procesos se realizaron en el medio basal, a 30 °C.  
Inóculo: 10<sup>4</sup> esporos.g<sup>-1</sup>.

Cuando se mezclan orujos del mismo tipo de manzana a los efectos de alcanzar niveles de azúcares del 4 % la producción enzimática se incrementa y en el caso de manzanas Granny Smith (4a + 4b), la actividad obtenida es comparable con la del medio testigo (orujo 2). Con la mezcla de orujos de manzanas Red Delicious (3a + 3b) se alcanzan valores de actividad enzimática menores que con el testigo (orujo 2). En ambos casos tanto el tipo de manzana como el contenido de azúcares es el mismo. La única diferencia entre ellos es la

época de procesamiento de la fruta, que en el caso del orujo 2 corresponde al mes de abril y en las 3 al de noviembre. De ello se podría concluir que durante el almacenamiento las frutas pierden algún componente que estimula la producción enzimática y que, por lo tanto, se halla en menor proporción en el último caso.

El efecto del pH inicial del cultivo se estudió con orujos 4a y con la mezcla 4a + 4b en la que el pH se llevó al valor de 4.1, similar al de los orujos de manzanas Red Delicious. En ambos casos se produjo una menor actividad enzimática.

Estos resultados indican que además de otros factores, debemos considerar a la concentración de azúcares del orujo como el más importante ya que controla los rendimientos de la fermentación bajo las condiciones de cultivo empleadas. Por lo tanto, se puede suponer que con la muestra 4b, el crecimiento microbiano y la producción enzimática están limitadas por el contenido de azúcares. En cambio, con muestras 3a y 4a con una concentración de azúcares del 9 %, los resultados deben ser atribuidos a efectos negativos sobre el metabolismo fúngico originados en factores ambientales desfavorables, como por ejemplo una alta presión osmótica del medio de cultivo.

En la Tabla 4.12 se muestra una cinética típica utilizando una mezcla de orujos de manzanas ácidas. En este caso, la producción enzimática y la velocidad de la fermentación son mayores en tanto que la productividad se incrementa en un 30 % en relación al cultivo testigo. La biomasa fúngica a las 36 h puede ser estimada en 6,1 mg de micelio seco por gramo de orujo de manzana. De acuerdo a estos valores, los rendimientos de pectinasa son de alrededor de 200 unidades por mg de micelio seco.

Tabla 4.12: Cinética de producción de pectinasas empleando una mezcla de orujos de manzanas ácidas (4a 34 % + 4b 66 %).

Tiempo de proceso (h)	pH	Contenido de glucosamina (mg.g <sup>-1</sup> )	Actividad pectolítica (U.g <sup>-1</sup> )
0	3,3	0,037	0
12	3,3	0,039	0
24	3,3	0,096	280
36	3,1	0,430	1280
48	3,3	0,760	1060

Los procesos fueron llevados a cabo con el medio basal, a 30 °C con un inóculo de 10<sup>4</sup> esporos por g.

#### 4.5.6. Influencia de la composición del medio de cultivo.

En el ítem anterior se ha descrito el profundo efecto que el tipo de orujo de manzana empleado, fundamentalmente en cuanto a su contenido en azúcares, tiene sobre la producción de pectinasas. A modo de confirmación, se diseñaron una serie de experiencias en caja de petri en las cuales se reemplazó al orujo de manzana por un medio sintético que simulara su la composición. Además, se agregó un inerte (pulpa de papel) en lugar de sus componentes insolubles para que presentara una textura similar. En estos casos, tanto el desarrollo de los procesos como el procesamiento de las muestras fue idéntico a los descriptos precedentemente. En la Tabla 4.13 se detalla la composición de los medios de cultivo empleados.

Tabla 4.13: Composición de los medios de cultivo sintéticos.

Medio de cultivo	Azúcares (%) (1)	Pectina (%) (2)
A	0	0
B	2	0
C	4	0
D	6	0
E	10	0
F	2	2
G	4	2
H	0	2
I	Jugo de orujo (3)	2

(1) En todos los casos corresponde a un 67 % de fructosa, 23 % de glucosa y 10 % de sacarosa.

(2) Se trata de la misma pectina usada en la valoración viscosimétrica de la actividad enzimática.

(3) Se diluyó hasta un valor del 4 % de azúcares totales.

En todos los casos, se adicionaron los mismos suplementos del medio de cultivo base (sales y macerado de maíz) y también un 3 %

de pulpa de papel.

En la Tabla 4.14 se detallan los resultados obtenidos con los medios de cultivo anteriores (en todos los casos son promedios de triplicados).

Tabla 4.14: Resultados obtenidos con los medios de cultivos sintéticos.

Medio de cultivo	Tiempo de proceso (h)	pH	Actividad enzimática (U.g <sup>-1</sup> )	Contenido de azúcares (g.L <sup>-1</sup> )
A	24	4,7	1	0,7
	48	7,2	1	0,5
	72	7,8	0	0,4
B	24	3,7	179	21,2
	48	4,2	38	1,8
	72	6,7	33	0,6
C	24	3,7	205	39,4
	48	3,8	469	16,1
	72	4,8	646	1,8
D	24	3,5	169	56,4
	48	3,6	387	32,8
	72	4,0	366	7,2
E	24	3,8	90	91,1
	48	3,6	190	60,6
	72	3,9	173	28,3
F	24	3,5	130	21,2
	48	3,8	209	8,0
	72	5,6	193	1,6
G	24	3,2	361	40,8
	48	3,7	906	25,3
	72	4,0	895	5,5
H	24	3,7	8	2,1
	48	5,4	33	1,3
	72	7,2	8	0,9
I	24	3,3	356	39,5
	48	3,8	890	28,3
	72	4,0	883	9,5

Como se puede apreciar, los mayores rendimientos se obtienen en el medio de cultivo G que es el que simula la composición del orujo de manzana 2 y de las mezclas en las que se producen las más altas actividades enzimáticas. Sin embargo, estas últimas actividades no son alcanzadas a pesar de que tanto los azúcares como la pectina son

los mismos y se encuentran en las mismas proporciones. De ello se concluye que el orujo puede contener otros factores estimulantes de la producción enzimática que probablemente puedan ser los mismos que ya se han mencionado cuando se discutió la menor actividad obtenida con los provenientes de manzanas almacenadas antes de procesar. Además, estos factores no pasan al jugo de orujo (medio I) ya que los valores obtenidos son similares a los del medio G.

Por otra parte, es evidente el efecto de la pectina. Si bien esta no es esencial para la producción de las enzimas, su presencia aparentemente favorecería su liberación y/o estabilización en el medio de cultivo.

En los demás casos se observa que con niveles por encima o por debajo del 4 % de azúcares se disminuye la producción enzimática de un modo similar al encontrado con los orujos. Por otra parte, empleando solamente pectina (medio H) se logran actividades muy bajas, menores aún que con la misma cantidad de azúcares (medio B).

#### 4.5.7. Influencia del sistema de cultivo.

En el capítulo 3 se mencionaron algunas de las características de los cultivos en medios sólidos y, entre ellas, la posibilidad de aumentar notablemente el rendimiento de una determinada fermentación. Un ejemplo de lo anterior lo encontramos al efectuar procesos en el medio de cultivo I descrito en el ítem 4.5.6. al que no se le agregó la pasta de papel y se lo incubó en erlenmeyers agitados como un cultivo líquido convencional. Estas fueron las mismas condiciones empleadas en la producción de micelio para la medida del contenido de glucosamina de la biomasa (ítem 4.4.4.2.). En la Tabla 4.15 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.15: Resultados obtenidos en procesos con el medio de cultivo I sin pasta de papel en erlenmeyers agitados.

Tiempo de proceso (h)	pH	Peso seco (1) (g.L <sup>-1</sup> )	Actividad enzimática (U.g <sup>-1</sup> )	Azúcares solubles (g.L <sup>-1</sup> )
0	4,1	1,4	0	39,8
12	3,9	1,8	0	37,7
24	3,4	6,0	456	27,8
36	3,2	11,0	335	16,1
48	3,7	17,5	314	3,0
72	6,5	18,5	152	1,1

(1) Se determinó por filtración del contenido total del erlenmeyer por papel de filtro, lavado del micelio y secado hasta peso constante a 105 °C.

Como se puede observar, tanto la cinética de crecimiento del microorganismo como la de producción enzimática son más rápidas que en los medios sólidos con orujo. Por otra parte, es notable que los rendimientos finales de pectinasa sean menores que los obtenidos con el mismo medio de cultivo solidificado por el agregado de pasta de papel. Este comportamiento se puede interpretar postulando que en un medio sólido los nutrientes tienen una cierta velocidad de difusión mediante un gradiente de concentración hacia la biomasa. En cambio, en un medio líquido la totalidad de los nutrientes es igualmente accesible al microorganismo por lo que, en este aspecto, no existe limitación para el crecimiento. En un medio sólido este comportamiento podría compararse con el que tiene lugar en un cultivo líquido con alimentación de sustrato, en este caso de un modo natural ya que es la difusión a través del medio la que controla la velocidad de alimentación. Esta limitación favorecería la producción enzimática y la prolongaría en el tiempo ya que en los medios sólidos se produce una menor velocidad tanto de crecimiento como de consumo de azúcares.

#### 4.5.8. Influencia del secado del orujo de manzana.

La época de procesamiento de la manzana tiene gran importancia en el rendimiento de la fermentación, como lo muestran los resultados descritos en el ítem 4.5.5. Es por ello que se pensó en

la posibilidad de emplear el orujo con el que se obtuvieron los mejores resultados previo secado debido a que éste es el método más sencillo de conservación y al que recurriría una industria en el caso de realizar procesos fermentativos durante un período de tiempo mayor al de producción del citado orujo.

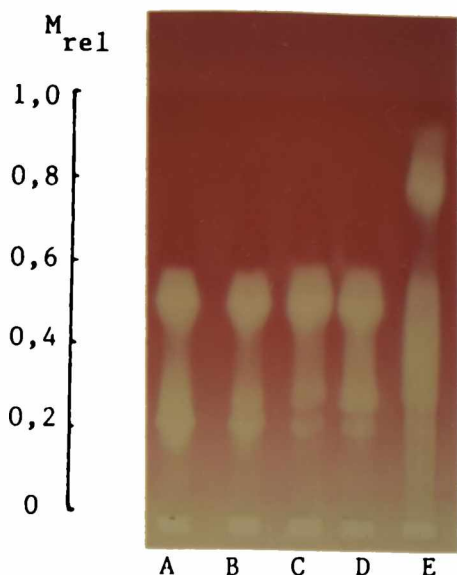
A tal efecto se realizaron ensayos con el medio de cultivo base, en el cual se utilizó al orujo 2 que había sido secado hasta peso constante en una estufa con circulación forzada de aire a 50 °C y posteriormente rehúmedado hasta su humedad original. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias con los descritos anteriormente, por lo que se puede concluir que un secado en las citadas condiciones no afecta al orujo.

#### 4.5.9. Caracterización del pool enzimático.

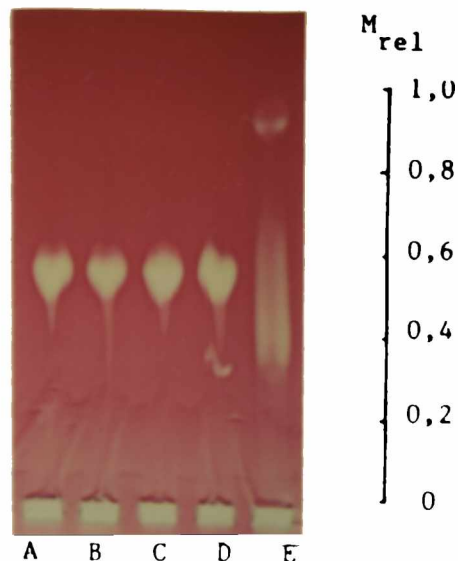
A fin de conocer los distintos tipos de enzimas producidas por nuestra cepa bajo las condiciones de cultivo empleadas se efectuaron corridas electroforéticas con muestras tomadas a las 24, 36, 48 y 72 h de un proceso testigo típico. Como comparación se corrió también una muestra comercial que presentaba una muy buena capacidad de clarificación de jugo de manzana.

Para las electroforesis se adaptó una metodología de bibliografía en la cual a los geles de poliacrilamida se le adicionan los sustratos específicos de cada enzima a ser ensayada. El desarrollo del cromatograma se hace de manera horizontal en un buffer de pH: 8,7, que es inapropiado para la actividad enzimática. Esta tiene lugar después de que la corrida ha finalizado ya que los geles se sumergen en solución de ácido málico que difunde hacia su interior y cuando el sustrato pasa por la zona de pH apropiado se hidroliza originando productos característicos para cada enzima. El revelado se hace por coloración con rojo ruténio dando tonalidades específicas para cada uno de ellos. Mediante esta técnica se pueden distinguir actividades de PE, PG y PMGL ya que en el primero de los casos el gel toma un color rojo más oscuro, en el segundo un

tono claro y en el tercero vira hacia el amarillo.



Fot. 1



Fot. 2

Electroforesis de pectinasas en geles de poliacrilamida con la adición de pectina (Fot. 1) o de polipectato de sodio (Fot. 2).

Las muestras A, B, C, y D fueron tomadas a las 24, 36, 48 y 72 h de cultivo, en tanto que la E corresponde a un preparado comercial.

$M_{rel}$ : movilidad relativa al frente del solvente de corrida.

El gel conteniendo pectina (fotografía 1) revela la presencia de una zona roja más oscura correspondiente a una PE de bajo punto isoeléctrico y al menos otros dos grupos de pectinasas en las zonas claras. El gel con polipectato de sodio (fotografía 2) muestra una sola zona clara la cual indica la presencia de la clásica actividad de PG. Tomando en consideración que la movilidad relativa observada es similar a la de la zona de bajo punto isoeléctrico encontrada en el gel con pectina, se puede concluir que ambas corresponden al mismo tipo de enzima.

A pesar de que se observa una sola zona de hidrólisis, no es posible determinar si esta actividad de PG corresponde a una única enzima o no, ya que como se mencionó anteriormente existen múltiples formas moleculares de endo-PG o bien puede estar presente una exo-PG. Las medidas cuantitativas indicaron una actividad de



endo-PG en el medio de cultivo a las 48 h de proceso de 410 U por gramo de orujo de manzana.

Por otra parte, es evidente que el otro grupo de enzimas hidrolíticas presente en el gel con pectina no ataca polipectato de sodio. Esta actividad enzimática puede ser atribuida a una endo-PMGL, la cual es usualmente producida por cepas de *Aspergillus*. Esto se confirmó midiendo el incremento de absorbancia a 235 nm en presencia de pectina (0,32 unidades de absorbancia en 30 min para 14 unidades viscosimétricas por mL de mezcla de reacción). Además se confirmó la especificidad de sustrato debido a que no presentó actividad usando polipectato de sodio (Fig. 4.6.).

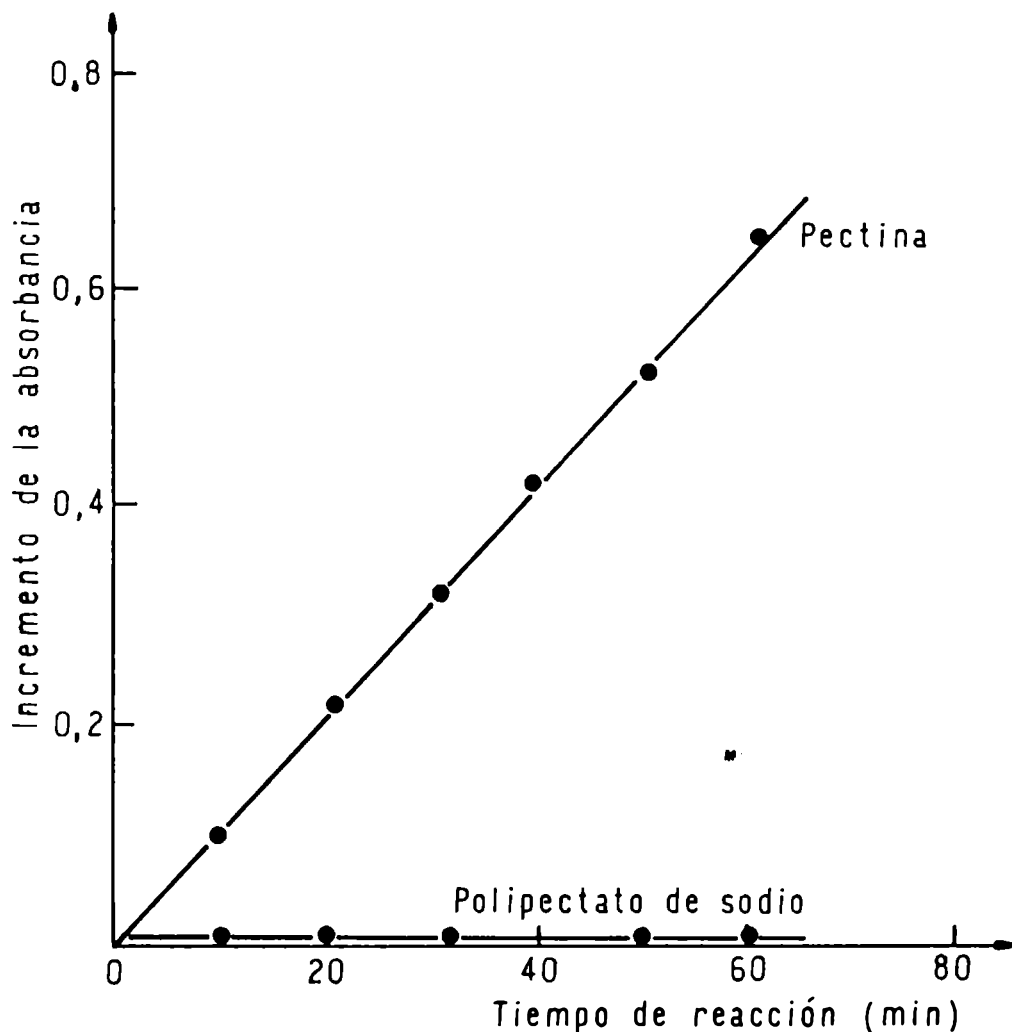


Fig. 4.6. Actividad de polimetilgalacturonato liasa. Cinética de formación de productos insaturados a 30 °C, en buffer acetato 0,1 M, pH: 4,0 y 0,5 % del sustrato específico.

Aunque la corrida electroforética de la muestra comercial no es totalmente clara, se puede inferir la presencia del mismo grupo de enzimas mencionadas precedentemente y además una zona de actividad de PG de muy bajo punto isoeléctrico. Esta diferencia se puede atribuir al posible uso de otra cepa productora y/o a una mezcla de enzimas de diferentes orígenes.

No se observan diferencias entre las corridas de las muestras correspondientes a los distintos tiempos de proceso. Por lo tanto, se puede suponer que en nuestro caso las pectinasas son producidas al mismo tiempo y probablemente en la misma proporción durante la fermentación. Este resultado es diferente a los obtenidos con otros microorganismos como *Diploidea gossypina* (Wang, S.C. and Pinckard, J.A., 1971), *Fusarium solani* (Bateman, D.F., 1966), *Aspergillus fonsecaeus* (Edstrom, R.D. and Phaff, H.J., 1964) y *Clostridium felsineum* (Osman, H.G. y col., 1969), todos ellos cultivados en medios líquidos, en los cuales al final de la fermentación se producen importantes cambios en el tipo de enzimas producidas.

El pool de pectinasas obtenido fue a su vez caracterizado en cuanto a sus propiedades con respecto al efecto de la temperatura y el pH sobre su actividad enzimática. Debido a que la actividad de las PE puede ser afectada por la concentración de sodio, los estudios sobre el pH se llevaron a cabo a 30 °C en buffer acetato 0,1 M con una adición apropiada de NaCl de modo de tener en todos los casos una concentración final de sodio de 0,064 M. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.7. Como conclusión podemos decir que los rangos de pH y temperatura óptimos pueden considerarse apropiados para las aplicaciones comerciales en la obtención de jugos de frutas (Neubeck, C.E., 1975).

Con respecto a las enzimas no pectolíticas, se demostró la presencia de amilasas, celulasas y hemicelulasas que son generalmente consideradas como beneficiosas en productos enzimáticos usados en clarificación de jugos, en tanto que no se detectaron lipasas.

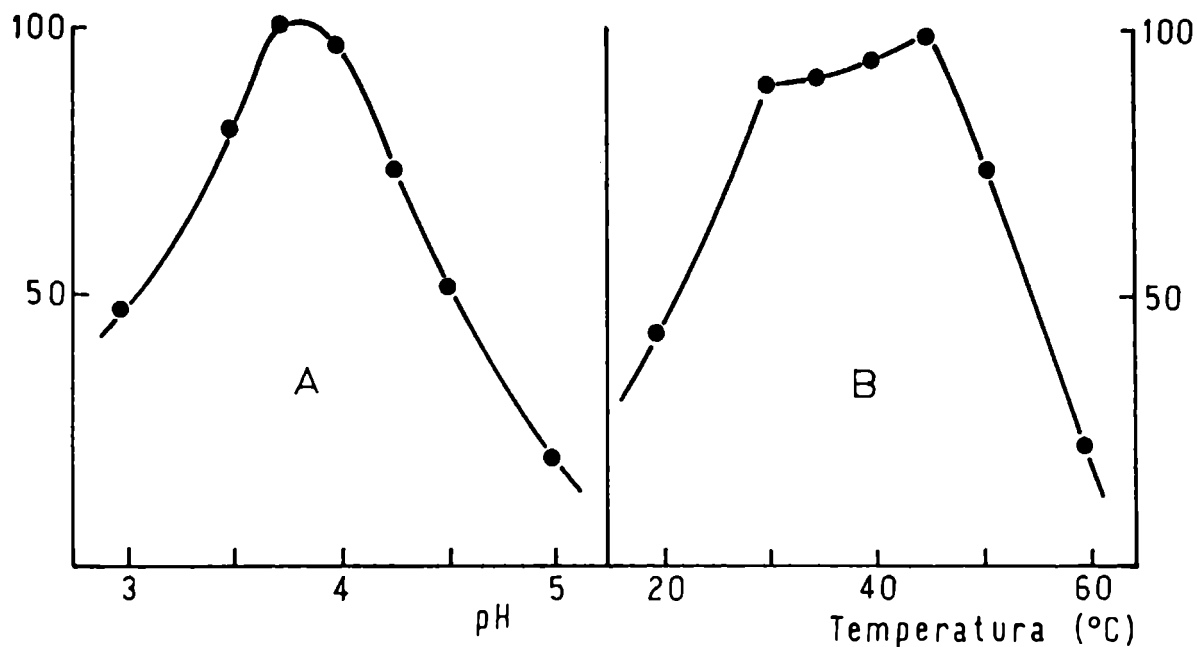


Fig. 4.7. Efecto del pH (A) y de la temperatura (B) sobre la actividad pectolítica. En todos los casos se usó 2 U.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.5.10. Ensayos de clarificación.

Se ensayó la capacidad del pool de pectinasas para la clarificación de jugos de manzana usando un extracto crudo obtenido de un cultivo de 36 h usando la mezcla de orujos de manzanas Granny Smith con 4 % de azúcares. En la Tabla 4.16 se muestra la evolución de las clarificaciones en función del tiempo con varios niveles de pectinasas y con los distintos jugos.

El jugo de manzanas Granny Smith fue rápidamente clarificado, requiriendo solo 1 h de tratamiento con 1000 U.L<sup>-1</sup>. En este tiempo se observa un abundante flóculo y el test de alcohol es negativo. En el caso del jugo de manzanas Golden Delicious con el mismo nivel de adición de enzima, se necesitan 2 h de incubación para obtener una clarificación apropiada y un test de alcohol negativo. En ambos casos, no es necesario realizar el test de iodo ya que estas variedades de manzanas no poseen almidón.

La situación es diferente en cuanto al jugo de manzanas Red Delicious debido a que no se alcanzó una clarificación total. En este caso usando 2000 U.L<sup>-1</sup> durante 3 h el jugo presentaba

todavía cierta turbidez aun cuando a las 2 h de tratamiento ya daban negativos los tests de iodo y de alcohol.

Tabla 4.16. Evolución del % de transmitancia a 660 nm durante la clarificación de tres tipos de jugo de manzana.

Jugo de manzana Granny Smith, pH: 3,3.

	Tiempo (min)	0	30	60	120	180
Pectinasa adicionada (U.L <sup>-1</sup> )						
0		45	42	48	42	42
500		45	-	-	-	-
1000		43	62	92	93	93
2000		40	87	92	92	93
Control *		40	-	41	45	43
Muestra comercial **		40	79	95	95	96

Jugo de manzana Golden Delicious, pH: 3,6.

	Tiempo (min)	0	30	60	120	180
Pectinasa adicionada (U.L <sup>-1</sup> )						
0		34	40	40	37	37
500		32	49	50	68	73
1000		34	53	56	75	81
2000		34	53	66	85	90
Control *		34	38	40	37	37
Muestra comercial **		34	75	83	90	90

Jugo de manzana Red Delicious, pH: 4,0.

	Tiempo (min)	0	30	60	120	180	240
Pectinasa adicionada (U.L <sup>-1</sup> )							
0		18	-	19	22	17	21
500		18	30	36	50	54	-
1000		18	43	45	59	66	65
2000		18	43	50	64	68	66
Control *		18	-	-	21	17	18
Muestra comercial **		18	46	56	67	63	73

\* Jugo solo.

\*\* Bioconcentrada plus (Biocon Ltd., Irlanda), 1000 U.L<sup>-1</sup>.

Todas las muestras contienen la adición de amiloglucosidasa comercial (30 mg.L<sup>-1</sup>) y gelatina (50 mg.L<sup>-1</sup>).

#### 4.6. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos mediante el empleo del orujo de manzana para la producción de enzimas pectolíticas en sustrato sólido se demuestra la factibilidad técnica de este proceso, al menos en escala de laboratorio. Por esta razón, es necesario estudiar su escalamiento para determinar el verdadero valor industrial del mismo. A tal efecto se pueden hacer los siguientes cálculos: considerando que son necesarias unas  $2000 \text{ U.L}^{-1}$  de jugo de manzana para una buena clarificación y teniendo en cuenta que anualmente se producen unos  $2 \times 10^9 \text{ L}$ , se necesitan unas  $4 \times 10^{11} \text{ U}$  enzimáticas por año. En un proceso típico se obtienen por cada gramo de orujo de manzana unas 1200 U enzimáticas, por lo que se haría necesario el uso de unas 330 Ton de orujo en los medios de cultivo para producir aquel número de unidades. Además, las cajas de petri empleadas tienen una superficie de  $56,74 \times 10^{-4} \text{ m}^2$  en las que se colocaban 25 g de orujo, por lo tanto habría que utilizar una superficie total de  $74.897 \text{ m}^2$  para satisfacer las necesidades de producción si esta se completara en un solo proceso. Suponiendo que cada fermentación dure en total 2 días se podrían realizar unos 100 procesos al año con lo que serían necesarios  $750 \text{ m}^2$  por proceso lo que implica el uso de unas 190 bandejas cuadradas de 2 m de lado. Estos cálculos tienen en cuenta la relación de masa de medio de cultivo por unidad de superficie empleada en nuestras experiencias, por lo que si ésta se pudiera aumentar (este es un punto a estudiar) se disminuiría el tamaño del fermentador. A todas estas cifras habría que agregarles las relativas a la maceración de la fruta debido a que como no se ensayó el comportamiento de las enzimas producidas en tal proceso no se puede calcular la cantidad de unidades enzimáticas necesarias.

Considerando que la cepa empleada provino de un cepario internacional y que no posee características de hiperproductora, los rendimientos alcanzados pueden considerarse aceptables como así

también su comportamiento en los ensayos de clarificación. Sin embargo, es interesante un estudio con otras cepas, particularmente las productoras de pectinasas de alta estabilidad térmica que presentan ventajas en los procesos de clarificación.

Otro aspecto a estudiar es el uso del residuo de la fermentación para alimentación animal, en el caso de que las enzimas producidas deban ser extraídas para su uso. Es muy probable que los restos de biomasa y del medio de cultivo sean apropiados para su inclusión en raciones para animales con lo que se completaría el aprovechamiento integral del orujo.

Finalmente resta decir que se hace necesaria la continuación de estos estudios, particularmente en lo que se refiere al cambio de escala y al uso de distintos tipos de reactores para sustratos sólidos.

#### 4.7. REFERENCIAS

- Aidoo, K.E.; Hendry, R. and Wood, B.J.B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12, 6-9.
- Albersheim, P. and Killias, U. (1962). Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. Arch. Biochem. Biophys. 97, 107-115.
- Albersheim, P.; Neukom, H. and Deuel, H. (1960). Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. Arch. Biochem. Biophys. 90, 46-51.
- Almengor-Hecht, M.L. and Bull, A.T. (1978). Arch. Microbiol. 119, 163.
- Atallah, M.T. and Nagel, C.W. (1977). The role of calcium ions in the activity of an endo-pectic acid lyase on oligogalacturonides. J. Food Biochem. 1, 2, 185-206.
- Barret, A.J. and Northcote, D.H. (1965). Apple fruit pectic substances. Biochem. J. 94, 617-627.
- Bartley, I.M. (1978). Exo-poligalacturonase of apple. Phytochem. 17,

213-216.

- Bartolome, L.G. and Hoff, J.J. (1972). Gas chromatographic methods for the assay of pectin methylesterase, free methanol and methoxy groups in plant tissues. *Agric. Food Chem.* 20, 262-266.
- Bateman, D.F. (1966). *Phytopatol.* 56, 238.
- Bauchwitz, E. (1966). Experiencia sobre el uso de un enzima pectolítico en la elaboración de sidra. *Vinos, viñas y frutas*, agosto, 371.
- Bauman, J.W. (1981). Applications of Enzymes in Fruit Juice Technology. *Enzymes Food Process, Ind. Univ. Co-op. Symp.* 1980, 129-147.
- Braconnot, H. (1825). Recherches sur un nouvel acide universellement rependu dans tous les végétaux. *Ann. Chim. Phys. Ser. II*, 28, 173-178.
- Brooks, J. and Reid, W.W. (1955). The complex nature of polygalacturonase from *Aspergillus foetidus* Thom-Raper. *Chem. and Ind. March*, 325-326.
- Calesnick, E.J.; Hills, C.H. and Willaman, J.J.. (1950). Properties of a commercial fungal pectase preparation. *Arch. Biochem.* 29, 432-440.
- Cantarelli, C. (1984). Enzimi per l'industria alimentare. *Industria alimentari* 23, 223, 845-852.
- Committee for the Revision of the Nomenclature of Pectic Substances (1944). *Chem. Eng. News.* 22, 105-106.
- Courtois, J.E., Percheron, F. and Foglietti, M.J. (1968). Isolement et étude du mode d'action d'une polygalacturonase d'insecte (*Pyrrhocoris apterus*). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Série D* 266, 164-166.
- Cruess, W.V. and Besone, J. (1941). *Fruit Prod. J.* 20, 365.
- Cruickshank, R.H. and Wade, G.C. (1980). Detection of pectic enzymes in pectin acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 107, 177-181.
- Deuel, H. and Stutz, E. (1958). Pectic substances and pectic enzymes. *Adv. Enzymol.* 20, 341-382.
- Dingle, J.; Reid, W.W. and Solomons, G.L. (1953). The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. II: Application of

- the lup-plate assay to the estimation of enzymes. *J. Sci. Food Agric.* 4, 149-155.
- Doesburg, J.J. (1965). Pectic substances in fresh and preserved fruits and vegetables. I.B.V.T. Communication N° 25. Wageningen, The Netherlands.
  - Edstrom, R.D. and Phaff, H.J. (1964). Purification and certain properties of pectin trans-eliminase from *Aspergillus fonsecaus*. *J. Biol. Chem.* 239, 8, 2403-2408.
  - Endo, A. and Miura, Y. (1961). Pectolitic enzymes of molds. I: Survey of enzyme producing microorganisms by fruit juice clarification. *Agric. Biol. Chem.* 25, 382-388.
  - English, P.D., Maglothin, A., Keegstra, K. and Albersheim, P. (1972). *Plant Physiol.* 49, 293.
  - Enzyme Nomenclature (1973). International Union of Pure and Applied Chemistry. International Union of Biochemistry Commission on Enzyme Nomenclature. En: *Comprehensive Biochemistry* 3, 3rd edit. Florin, M. and Stotz, E.H. (eds.). Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
  - Fogarty, W.M. and Ward, O.P. (1972). Pectic substances and pectinolytic enzymes. *Proc. Biochem.*, August, 13-17.
  - Glicksman, M. (1969). Pectins. En: *Gum technology in the food industry*, 159-190. Academic Press, New York-London.
  - Hatanaka, C. and Imamura, T. (1974). *Agric. Biol. Chem.* 38, 2267.
  - Hatanaka, C. and Ozawa, J. (1973). Pectolitic enzymes of exo-types. II: Exopeptic acid transeliminase of an *Erwinia*. *Agric. Biol. Chem.* 36, 13, 2307-2313.
  - Heinrichová, K. and Rexová-Benková, L. (1976). Purification and characterization of an extracellular exo-D-galacturonase of *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta* 422, 2, 349-356.
  - Heri, W.; Neukom, H. and Deuel, H. (1961). Chromatographie von pektinen mit verschiedener verteilung der methylester-gruppen auf den fadenmolekeln. *Helvetica Chimica Acta* 44, 1945-1949.
  - Holden, M. (1945). Acid-producing mechanisms in minced leaves. *Biochem. J.* 39, 172-178.



- Ishii, S. and Yokotsuka, T. (1972). Clarification of fruit juice by pectin trans eliminase. *J. Agr. Food Chem.* 20, 4, 787-791.
- Joslyn, M.A. (1961). Utilization and disposal of processing wastes. En: *Fruit and vegetable juice processing technology*, chapter 13, 371-409. Donald, K. y col. (eds.). The Avi Publishing Company Inc., Westport, Connecticut.
- Kamimiya, S., Izaki, K. and Takahashi, H. (1972). *Agric. Biol. Chem.* 36, 2367.
- Katz, J. y Bercovich, N. (1987). Enzimas: Adaptación local y aprendizaje de tecnología. *Argentina Tecnológica* 2, 7, 14-26. Banco de la Provincia de Buenos Aires.
- Kertesz, Z.I. (1951). *The pectic substances*. Interscience Publishers Inc., New York.
- Kertesz, Z.I. (1960). Enzymes of polysaccharide synthesis and degradation. En: *Food Enzymes*, 49-63. Schultz, H.W. (ed.). Avi Publ. Co. Westport, Connecticut.
- Kiermeier, F. (1948). Zur manometrischen bestimmungsmethode der pektase. *Liebigs Ann.* 561, 232-238.
- Kilara, A. (1982). Enzymes and their uses in the processed apple industry: A review. *Process Biochem.*, July/August, 35-41.
- Kilbuck, J.H.; Nusserbaum, F. and Cruess, W.V. (1951). *Proc. Am. Soc. Enol.* 59.
- Kimura, H. and Mizushima, S. (1973). *Agric. Biol. Chem.* 37, 2589.
- Kohn, R.; Furda, I. and Kopeć, Z. (1968). Binding of calcium ions to acetyl derivatives of pectin. *Collect. Czechoslovak Chem. Communicat.* 33, 7, 2217-2225.
- Koller, A. and Neukom, H. (1969). Untersuchungen über den abbaumechanismus einer gereinigten polygalakturonase aus *Aspergillus niger*. *European J. Biochem.* 7, 485-489.
- Lee, M. and Macmillan, J.D. (1970). Mode of action of pectic enzymes. III: Site of initial action of tomato pectinesterase on highly esterified pectin. *Biochem.* 9, 1930-1934.
- Lineweaver, H. and Ballou, G.A. (1945). *Arch. Biochem.* 6, 373.

- Mac Donnell, L.R.; Jansen, E.F. and Lineweaver, H. (1945). Arch. Biochem. 6, 389.
- Macmillan, J.D. and Phaff, H.J. (1966). Exopolygalacturonate lyase from *Clostridium multifementans*. Methods in Enzymol. 8, 632-635.
- Marteau, G. (1959). Ann. Technol. Agr. 12, 155.
- McColloch, R.J. and Kertesz, Z.I. (1947). A comparison of fungal pectin metil esterase with that of higher plants, especially tomatoes. Arch. Biochem. 13, 2, 217-230.
- McCready, R.M. and Seegmiller, C.G. (1954). Action of pectic enzymes on oligogalacturonic acid and some of their derivates. Arch. Biochem. Biophys. 50, 440-450.
- Meyrath, J. and Suchanex, G. (1972). Inoculation techniques: Effect due to quality and quantity of inoculum. En: Methods in Microbiology 7B, 159-210. Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (eds.). Academic Press, London.
- Meyrath, J. and Volavsek, G. (1975). Production of microbial enzymes. En: Enzymes in Food Processing, 2nd. edit., 255-300. Reed, G. (ed.). Academic Press, London.
- Milner, Y. and Avigad, G. (1967). Copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. Carbohydrate Res. 4, 4, 359-361.
- Mukherjee, S.K. and Majumdar, S.K. (1971). Fermentative production of pectinases by fungi: screening of organisms and production of enzymes by *Aspergillus niger*. J. Ferment. Technol. 49, 9, 759-770.
- Nagel, C.W. and Wilson, T.M. (1970). Pectic acid lyases of *Bacillus polymyxa*. Appl. Microb. 20, 3, 374-383.
- Neubeck, C.E. (1975). Fruits, fruit products and wines. En: Enzymes in Food Processing, 2nd edit., 397-442. Reed, G. (ed.). Academic Press, London.
- Nicholas, D.D. and Thomas, R.J. (1968). J. Amer. Wood Pres. Ass. 58, 73.
- Nyiri, L. (1968). Manufacture of pectinases. Proc. Biochem. 3, 8, 27-30.

- Dhuchi, A. and Tominaga, T. (1974). *Ann. Phytopat. Soc. Jap.* 40, 22.
- Osman, H.G.; Abdel-Fattah, A.F. and Abdel-Samie, M. (1969). *J. Chem. V.A.R.* 12, 4, 543.
- Owens, H.S.; Lotzkar, H.; Schultz, T.H. and MacClay, W.D. (1946).  
Shape and size of pectinic acid molecules deduced from viscosimetric measurements. *J. Amer. Chem. Soc.* 68, 1628-1632.
- Patel, D.S. and Phaff, H.J. (1960). *Food Res.* 25, 37.
- Pedersen, J.K. (1980). Pectins. En: *Handbook of water soluble gums and resins*, chapter 15. Davidson, R.L. (ed.). Mc Graw-Hill Book Company.
- Peñaloza, W.; Molina, M.; Gomez Brenes, R. and Bressani, R. (1985).  
Solid state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Appl. Envir. Microb.* 49, 2, 388-393.
- Phaff, H.J. (1966). Alfa-1,4-polygalacturonide glycanohydrolase (Endopolygalacturonase) from *Saccharomyces fragilis*. *Methods in Enzymol.* 8, 636-641.
- Pigman, W. and Rizvi, S. (1959). *Biochem. Biophys.* 1, 39.
- Pilnik, W. and Voragen, A.G. (1970). *Biochemistry of Fruits and their Products* 1, 53. Hulme, A.C. (ed.). Academic Press, London.
- Pollard, A. and Kieser, M.E. (1959). Pectin changes in cider fermentations. *J. Sc. Food Agr.* 10, 253-260.
- Pressey, R. and Avants, J.K. (1975 a). Modes of action of carrot and peach exopolygalacturonases. *Phytochem.* 14, 4, 957-961.
- Pressey, R. and Avants, J.K. (1975 b). Cucumber polygalacturonase. *J. Food. Sci.* 40, 5, 937-939.
- Pressey, R. and Avants, J.K. (1976). Pear polygalacturonases. *Phytochem.* 15, 9, 1349-1351.
- Pressey, R. and Avants, J.K. (1977). *Plant Physiol.* 60, 548.
- Rexová-Benková, L. (1973). The size of the substrate binding site of an *Aspergillus niger* extracellular endopolygalacturonase. *European J. Biochem.* 39, 109-115.
- Rexová-Benková, L. and Markovic, O. (1976). En: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 33, 323. Tipson, R.S. and Horton, D. (eds.). Academic Press, New York.

- Rexová-Benková, L.; Mracková, M.; Luknár, O. and Kohn, R. (1977). Collect. of Czechoslovak Chem. Communic. 42, 3204.
- Rexová-Benková, L. and Slezárik, A. (1970). Role of histidine in the active center of endopolygalacturonase of *Aspergillus niger*. Collect. Czechoslovak Chem. Communic. 35, 4, 1255-1260.
- Ride, J.P. and Drysdale, R.B. (1972). A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiol. Plant Pathol.* 2, 7-15.
- Riov, J. (1975). Polygalacturonase activity in citrus fruit. *J. Food Sci.* 40, 201-202.
- Riviere, J. (1977). Products of microbial metabolism. En: *Industrial applications of microbiology*, chapter 5, 151-196. John Wiley and Sons, New York.
- Robyt, J.F. and French, D. (1967). Multiple attack hypothesis of alfa-amylase action: action of porcine pancreatic, human salivary and *Aspergillus oryzae* alfa-amylases. *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 8-16.
- Rombouts, F.M. and Pilnik, W. (1972). *Chemical Rubber Company Critical Reviews in Food Technology* 3, 1.
- Rombouts, F.M. and Pilnik, W. (1980). Pectic enzymes. En: *Economic Microbiology* 5, *Microbial enzymes and bioconversions*, 227-282. Rose, A.H. (ed.). Academic Press, London.
- Saverborn, S. (1947). *Uppsala Chem. Abstr.* 41, 396.
- Scott, J.E. (1965). Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. En: *Methods in Carbohydrate Chemistry* 5, 38-44. Whistlery, R.L. (ed.). Academic Press, London and New York.
- Sheiman, M.I.; Macmillan, J.D.; Miller, L. and Chase, T. (1976). Coordinated action of pectin esterase and polygalacturonate lyase complex of *Clostridium multiferaentans*. *European J. Biochem.* 64, 2, 565-572.
- Smith, J.E.; Deans, S.G.; Anderson, J.G. and Davis, B. (1977). The nature of fungal sporulation. En: *Biotechnology and fungal differentiation*, 17-41. Meyrath, J. and Bu'lock, J.D. (eds.). Academic

- Press Inc. London.
- Smythe, C.V. et al. (1952). U.S. Patent 2.599.531.
  - Solms, J. and Deuel, H. (1955). Über den mechanismus der enzymatischen verseifung von pektinstoffen. *Helvetica Chimica Acta* 38, 321-329.
  - Spiro, R.G. (1966). Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods in Enzymol.* 8, 3-26.
  - Szajer, I. and Szajer, C. (1982). Clarification of apple juices by pectin lyase from *Penicillium paxilli*. *Biotech. Lett.* 4, 9, 553-556.
  - The American Type Culture Collection (1978). *Catalogue of Strains I*, 13th. edit., pág. 437.
  - Tuttobello, R. (1978). Effeto delle temperature nella produzione di enzimi pectici con *Aspergillus niger* in fermentatori. *Bolletino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale* LIV, 18, 1697-1703.
  - Tuttobello, R. and Mill, P.J. (1961 a). The pectic enzymes of *Aspergillus niger* 1: The production of active mixtures of pectic enzymes. *Biochem. J.* 79, 51-57.
  - Tuttobello, R. and Mill, P.J. (1961 b). The pectic enzymes of *Aspergillus niger* 2: Endopolygalacturonase. *Biochem. J.* 79, 57-64.
  - Urlaub, R. (1978). Pectinol D in the wine industry. *Proces Biochem.* August, 14-28.
  - Vanbelle, M.; Meurens, M. and Crichton, R. (1983). Enzymes in Foods and Feeds. *Revue des Fermentations et des Industries Alimentaries* 37, 4, 124-135.
  - Van Houdenhoven, F.E.A. (1975). Ph.D. Thesis, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
  - Wang, S.C. and Pinckard, J.A. (1971). *Phytopatol.* 61, 1118.
  - Whistler, R.L. and Smart, C.L. (1953). Pectic substances. En: *Polysaccharide Chemistry*, chapter 7, 161-197. Academic Press, New York.
  - Zadrazil, F. and Brunnert, H. (1981). Investigation of physical paramenters important for the solid state fermentation of straw by white rot fungi. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11, 183-188.

- Zetelaki, K. (1976). Optimal carbon source concentration for the pectolytic enzyme formation of *Aspergilli*. *Process Biochem.* July-August, 11-18.