

II. MARCO TEÓRICO.

2.1. LOS ACTINOMYCETOS:

Los actinomicetos han despertado un gran interés para biotecnólogos, genetistas y ecologistas, por su habilidad para producir metabolitos secundarios.

Muchos actinomicetos pueden crecer en los medios comunes usados en los laboratorios tales como agar nutricio, agar tripticasa soya, agar sangre y también en agar infusión cerebro corazón.

Los actinomicetos crecerán en caldos, pero necesitan ser cultivadas bajo condiciones especiales. El crecimiento en un tubo con caldo sin movimiento se da en la superficie, dejando el resto del caldo intacto. Los cultivos líquidos requieren considerable agitación y aireación. La agitación puede estar entre 200 – 250 rpm. para dar la adecuada aireación y homogenización del medio. De necesitar mayor mezclado, se puede colocar baffles en la parte interior del recipiente. Conforme avanza el tiempo de cultivo, el microorganismo crecerá en forma de pellet (Cross, 1980).

Los actinomicetos son un grupo de bacterias filamentosas , GRAM (+) , las células que se van a formar son denominadas conidias, además las encontramos participando en la degradación de desechos orgánicos en los suelos como el compostaje.

Vistos al microscopio tiene la forma de un hongo pequeño de tamaño bacteriano; la pared celular está constituida por una serie de ácidos murámicos y diaminopiméricos, careciendo de pectidoglucanos, característica que ayuda a reconocer a las bacterias. La composición de la membrana ayudó a excluir a los actinomicetos de la denominación hongo, por encontrar esteroides en la membrana. En cuanto al citoplasma, se ha clasificado como microorganismo procarionte debido a que no posee un núcleo y que su cromatina se encuentra libre en el citoplasma. Su información genética posee una inestabilidad muy

alta. Los actinomicetos generan metabolitos secundarios al final de la fase logarítmica. En la naturaleza son los mayores productores de antibióticos, seguidos por los hongos. Tienen la capacidad de degradar pesticidas y derivados de petróleo. Se han encontrado actinomicetos termófilos que interviene en el proceso de compostaje, produciendo una serie de enzimas como las celulasas y amilasas. Los actinomicetos son considerados como los médicos del suelo.

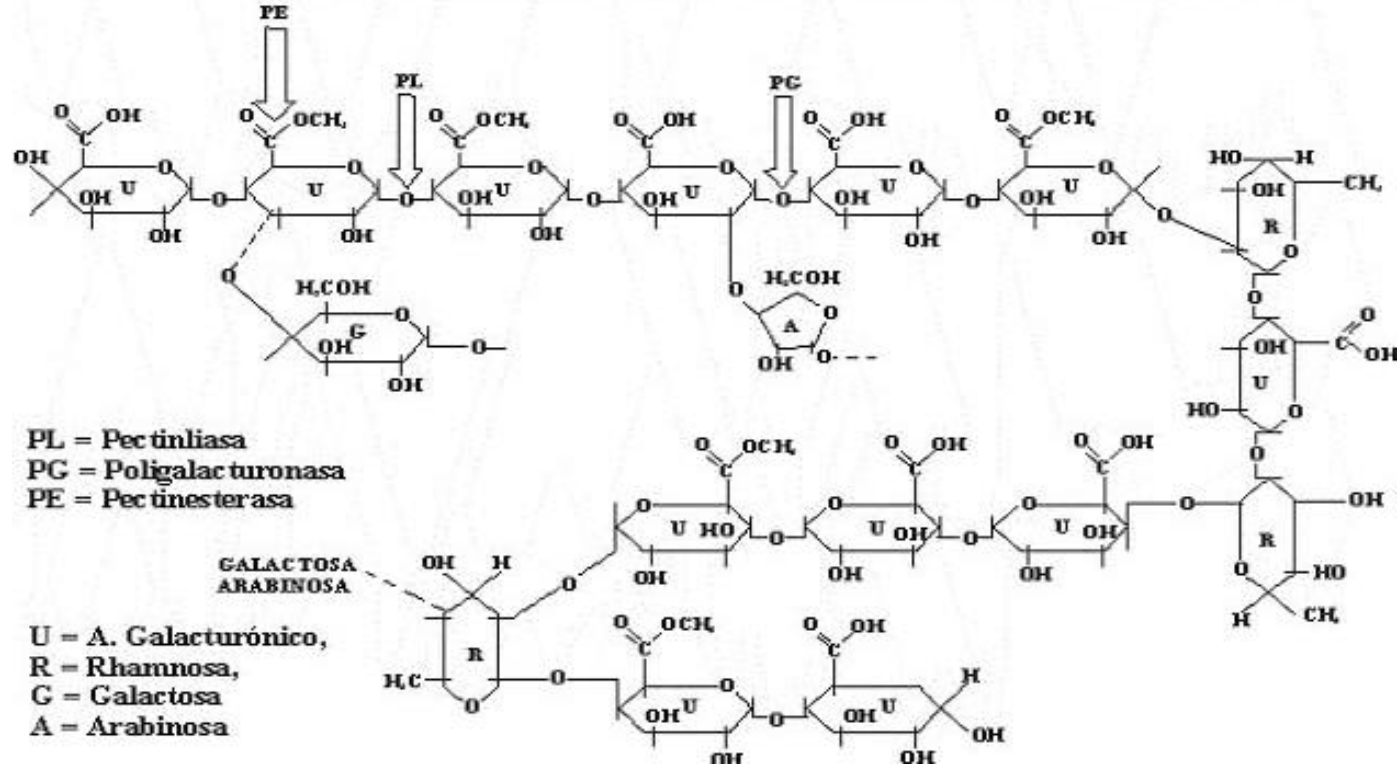
En los actinomicetos podemos ver actualmente el gran potencial que tienen en el campo agrícola, biomédico, en la salud y en la biorremediación (Franco, 2001).

2.2. PECTINAS

Las pectinas o sustancias pécticas son polisacáridos que se componen principalmente de ácidos poligalacturónicos coloides (poliuronidos derivados del ácido galacturónico $\text{CHO}(\text{CHOH})_4\text{COOH}$). Se hallan en los tejidos de las plantas. Las pectinas son útiles por su capacidad para formar geles o jaleas con compuestos polihidroxilados, como los azúcares o con cantidades diminutas de iones polivalentes. En el presente estudio. El vocablo “jalea” se usará para designar al muy conocido producto semisólido formado por pectina, azúcar y ácido en condiciones determinadas.

La sustancia que se había supuesto era la causa de que los jugos de fruta se convirtieran en jalea, fue aislada por Braconnot en 1824, quien la denominó pectina. Las extensas investigaciones realizadas en los cien años siguientes esclarecieron las propiedades de las sustancias pécticas, pero poco hicieron para aclarar su naturaleza química. Entre 1920 y 1940 quedó establecida la producción de pectinas en escala comercial en cierto número de naciones y aquéllas llegaron a formar parte importante en el comercio internacional (Kirk, 1961).

ESQUEMA N 1
ESTRUCTURA DE LA MOLECULA DE PECTINA (CAMPOS. D., 2001)



2.3. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL SUSTRATO (CÁSCARA DE NARANJA).

CUADRO 1.
COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CÁSCARA DE NARANJA
(Demain A. Y Solomon N., 1986).

Componentes principales (%)	materia seca	90.00
	proteína	6.00
	carbohidratos	62.70
	Grasas	3.40
	fibra	13.00
	cenizas	6.90
Minerales (%)	calcio	2.00
	magnesio	0.16
	Fósforo	0.10
	Potasio	0.62
	Azufre	0.06
Vitaminas (mg/Kg)	colina	770.00
	Niacina	22.00
	ac. Pantoténico	14.96
	riboflavina	22.20
Aminoácidos (%)	arginina	0.28
	Cistina	0.11
	lisina	0.20
	metionina	0.11
	triptofano	0.06

2.4. INVESTIGACIONES REFERENTES A LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS.

En la Fermentación en Sustrato Sólido (FSS), la concentración del sustrato es mayor que en la Fermentación en Cultivo Sumergido (FCS), debido a que contiene entre 1 a 10% de agua.(Laukevics, 1988).

En otra investigación, (Solís-Pereira & col., 1996), demostraron que en una concentración de 5 g/L de glucosa en una FCS la producción de pectinasas por *Aspergillus niger* fue reprimida, igualmente como la producción de otras enzimas hidrolíticas, tales como poligalacturonasas, pectinesterasas y celulasas; pero en una FSS con concentración de glucosa de 5 g/L la síntesis de pectinasas no es afectada.

En la FCS el medio es completamente simple, consistiendo en un producto de la agricultura no refinado, el cual contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano. Los sustratos más empleados en FSS son productos agrícolas (soya, arroz, trigo, maíz, etc), o subproductos agro industriales (salvado de trigo, bagazo de caña, residuos de remolacha, bagazo de cítricos, bagazo de manzana, cáscaras de diversos vegetales, etc.). Éstos, generalmente, empleados en combinación y/o, complementados con fuentes de carbono y energía fácilmente metabolizables (almidón, maltodextrinas, melazas, etc.) y otros nutrientes (úrea, calcio, fosfatos, etc) (Agosin, 1995).

Estos sustratos son colocados en agua, aunque pueden requerir de algún pretratamiento. El pretratamiento de estos sustratos (térmico principalmente) tiene un doble propósito; esterilización del sustrato y cambios en las propiedades fisicoquímicas del sustrato (gelatinización del almidón, aumento de la porosidad, etc.), que influye favorablemente en la degradabilidad y accesibilidad de los componentes poliméricos (polisacáridos y proteínas) y estructurales del sustrato (Milstein y Flowers, 1986).

Una producción de pectinasa usando cáscara de limón con diferentes pretratamientos, fue realizada determinándose pectin esterasa y poligalacturonasa. Los resultados menos favorables fueron obtenidos usando cáscara de limón seca; usando cáscara de limón lavada y no lavada los resultados fueron similares para la poligalacturonasa, en tanto que el nivel de pectin esterasa fue particularmente alto con cáscara de limón no lavada. Los bajos niveles de actividad fueron obtenidos cuando las cáscaras se secaron a una temperatura final de 120 °C, lo cual indica claramente la importancia de este tratamiento con las cáscaras, cuando es usado para la producción de pectinasas (Maldonado, 1986).

Por otro lado, se ha probado sulfato de amonio para suplir la fuente de nitrógeno, debido al menor costo que el fosfato de amonio. El ensayo dio lugar a una reducción del 20% de actividad pectinasa (Saval y Huitron, 1983).

El pH óptimo de la enzima poligalacturonasa fue probada usando buffer acetato para pH 2.5 - 4.5 obteniéndose una actividad pectinolítica máxima a un pH de 3.5 (El Sayed, 1994).

Las bacterias anaeróbicas productoras de pectinasas presentan un buen crecimiento a pH 7.0 y una temperatura de 45 °C. La máxima actividad poligalacturonasa fue de 4.7 U.I./mL hallada en un caldo de fermentación (Shivakuman, 1995).

En otra investigación (Abdel - Fattah y Ismail, 1996) trabajaron sobre el efecto de las reacciones al variar valores de pH y Temperatura de las preparaciones enzimáticas, hallando valores óptimos de 4.5 y 50 °C, respectivamente.

La producción de pectinasa extracelular es inducida por sustancias pécticas o por desechos agroindustriales tales como pulpa de limón o naranja, los cuales tienen apreciables cantidades de pectina ,(Aguilar y Huitron, 1986).

Pectina y glucosa fueron usadas como comparación de fuente de carbono, los resultados obtenidos con glucosa fueron pobres, considerando la naturaleza inducible de las enzimas pectinolíticas (Kilara, 1982).

(Sincere, 1989), seleccionaron tres cepas productoras de enzimas pécticas (*Talaromyces flavus*, *Penicillium charlessi* y *Tubercularia vulgaris*), utilizando pellets de pulpa de cítricos se obtuvieron actividades pectinolíticas más altas que las producidas por *Aspergillus niger*.

En otro estudio de producción de pectinasas bacterianas, utilizando pulpa de café como sustrato, se encontró 0.76 U (unidades de actividad enzimática) para pulpa de café húmedo (Cabello y col.,1982).

La presencia de pectina en la composición del medio de cultivo es un factor importante, ya que influye sobre la diversidad y cantidad de enzimas pécticas, sabiendo además que la producción de enzimas pectinasas es inducible y no constitutivo (Trejo y col., 1991).

Moreno y col.,(1995) reportan un estudio de producción de pectinasa a partir de fermentación en sustrato sólido utilizando cáscara de yuca y limón con *Aspergillus niger* ATCC 10864 obteniéndose una productividad volumétrica de 434.4 U.I./ $(L \cdot h)$, mayor que otros autores, 39 U.I./ $(L \cdot h)$ (Abdel-Fattah y col., 1977)

Con respecto a las desventajas que pueden haber en una FSS tenemos que es un proceso más lento que una FCS, debido a la gruesa barrera de sólido; también presenta problemas de disipación de calor limitado por la transferencia de masa intrapartícula (Trejo y col.,1991).

2.5. BIORREACTORES.

El cultivo de bacterias, levaduras y hongos en un cultivo sumergido es una práctica universal en la industria de fermentaciones, desde la década de los 40's. La aplicación de energía a los sistemas de fermentación hace que los

procesos de transporte convectivos sean órdenes de magnitud más rápidos que los procesos difusionales que controlan el transporte en el cultivo sólido. Esto ha permitido el desarrollo de procesos de alta productividad que han hecho del cultivo sumergido la técnica de más uso en la industria de las fermentaciones. Aunque la agitación mecánica sigue siendo la forma más usada de aplicar energía.

Independientemente del tipo de cultivo, existen tres consideraciones, además de la homogenización y la transferencia de oxígeno, que son de importancia en el diseño de biorreactores: La primera tiene que ver con la esterilidad. Llevar a cabo un proceso en ausencia de contaminación es un requisito fundamental. El diseño de tomas de muestras y sellos mecánicos, el acabado de la superficie del tanque, así como de la conexión de válvulas y aditamentos, juega un rol importante en un diseño exitoso. Un segundo aspecto de importancia es la remoción de calor. En vista de que las temperaturas de fermentación son moderadas (25 a 40 °C) y que el cultivo de células es un proceso exotérmico, el control de la temperatura en un biorreactor requiere de la remoción de cantidades importantes de calor. Un tercer punto de fundamental importancia son los aspectos mecánicos, la selección de reductores de velocidad y el diseño de la flecha de agitación (Miranda y col., 1996).

2.6. ENZIMAS PECTINASAS COMERCIALES.

La moderna tecnología de los zumos de frutas exige una degradación rápida e intensa de la pectina, con el fin de que el prensado, la clarificación y la filtración puedan realizarse de una manera segura y económica.

PECTINEX es una preparación purificada, producida por una cepa de *Aspergillus niger*. El producto contiene principalmente pectin-transeliminasa, poligalacturonasa, pectinesterasa y hemicelulasas, siendo capaz de romper sustancias pécticas vegetales.

PECTINEX y ULTRAZYM son productos que han sido obtenidos como resultado de una investigación y un desarrollo de varios años. Por su amplio espectro de acción, satisfacen de manera ideal las diversas exigencias que se imponen a su sistema óptimo de enzima en cada una de las etapas individuales de producción. Por lo tanto, PECTINEX y ULTRAZYM permiten asegurar buenos resultados en todo el mundo, bajo las más diversas condiciones tecnológicas.

VENTAJAS:

La utilización de PECTINEX y de ULTRAZYM garantizan:

-Durante la acción de la enzima sobre la pulpa:

La mejora en la extracción del zumo, aumentando con ello el rendimiento global del zumo.

La reducción de los tiempos de prensado, con incremento subsiguiente de la producción.

La liberación de componentes fundamentales como color, aroma, etc., por descomposición específica de la pulpa.

- Durante el tratamiento enzimático de los zumos:

El desdoblamiento rápido y completo de la pectina.

La floculación rápida y la sedimentación compacta de las sustancias enturbadoras, con un mínimo de clarificantes.

La filtración óptima, con menor gasto de material filtrante.

La estabilidad segura de los zumos completamente claros, de sus concentrados y de sus diluidos. (Andersen, 1991).

2.7. SITUACIÓN DEL MERCADO INTERNACIONAL DE LAS ENZIMAS.

En el cuadro 2, se muestra la situación del mercado internacional, de acuerdo con los datos publicados por (Eveleigh y col.,1990). Es impactante, por un lado, el hecho de que más de 2000 enzimas registradas sólo 60 sean

producidas comercialmente y de éstas sólo cinco cubren más del 80% del mercado (García y col., 1993).

Es innegable que la expansión del mercado de enzimas observado en los últimos años en los países de latinoamericana, es un aliciente para la creación de nuevas empresas nacionales o mixtas que produzcan enzimas a nivel nacional o subregional (Illanes, 1994).

Cuadro 2.

PRODUCCIÓN MUNDIAL DE ENZIMAS (García y col.,1993)

Enzima	Ton / año	% del total
Proteasa fungal	13	0.95
Pectinasa	25	1.83
Amilasa fungal	25	1.83
Cuajo microbiano	25	1.83
Glucosa isomerasa	75	5.50
Amilasa bacteriana	325	23.85
Amiloglucosidasa	350	25.70
Proteasa bacteriana	525	38.51
TOTAL	1363	100.00