

IV. RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS pH, TEMPERATURA Y AIREACIÓN-AGITACIÓN EN UN MEDIO SINTÉTICO, PARA LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS.

4.1.1. DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO

FIGURA 1. EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO

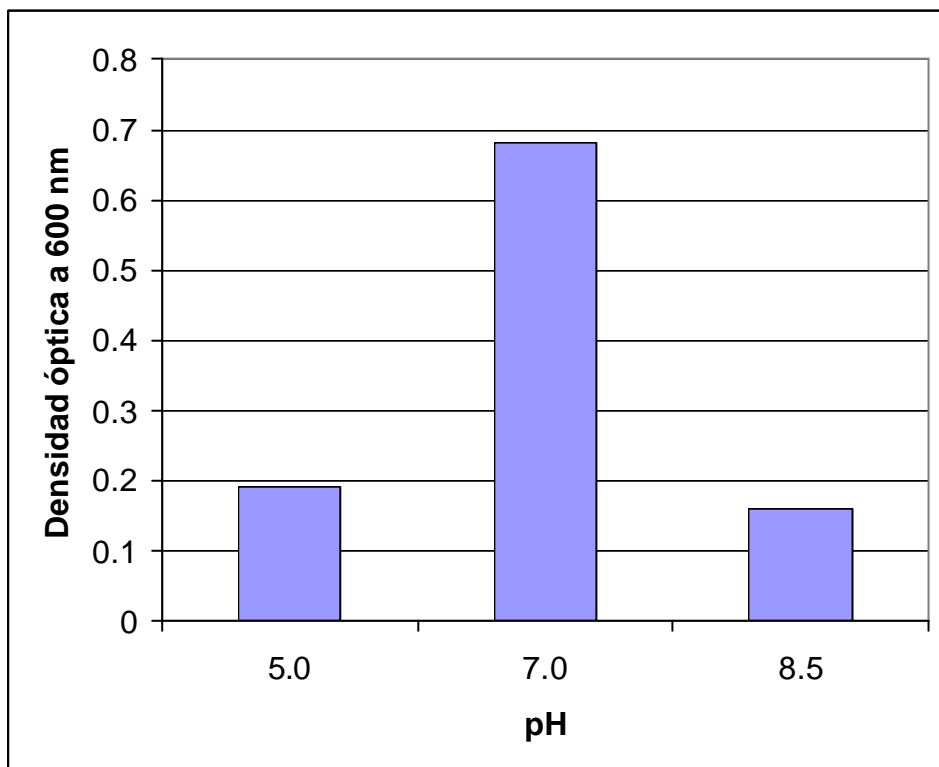


FIGURA 2. CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO A DIFERENTES pH

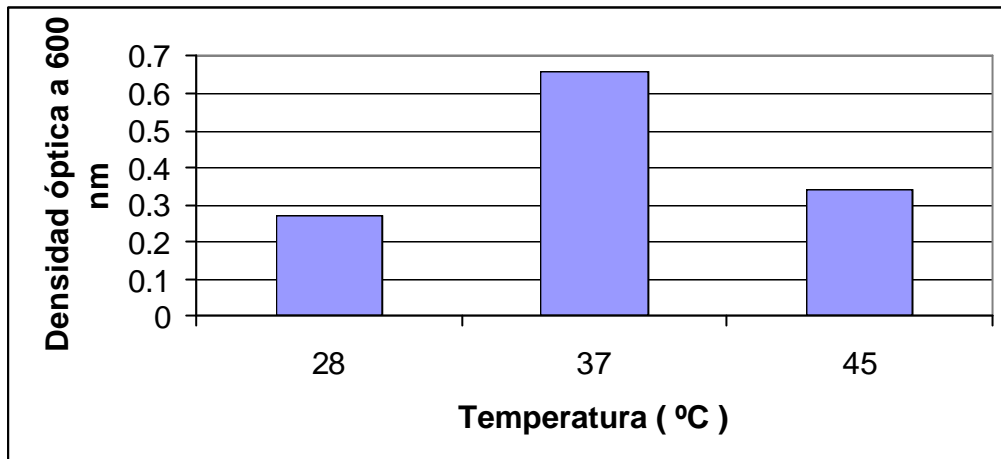


Tubo # (1 2 3) (4 5 6) (7 8 9 10)
pH = 7.0 pH = 8.5 pH = 5.0

4.1.2. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA

La evaluación del crecimiento del microorganismo vs. temperatura en caldo TSB, determinó que la temperatura óptima fue de 37 °C, luego de 72 horas de incubación (Figura 3).

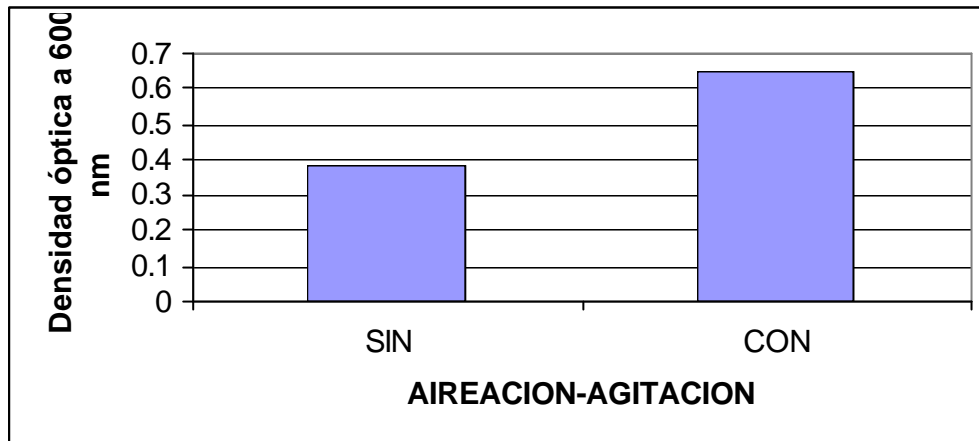
FIGURA 3. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO



4.1.3. DETERMINACIÓN DE LA AIREACIÓN-AGITACIÓN

En experimentos previos se determinó que la mayor concentración de biomasa (D.O. 0.65) se obtuvo en un medio control con aireación-agitación a 300 rpm. Estos resultados, presentaron la necesidad de fijar valores de agitación 300 rpm y aireación 0.5 vvm, para el proceso de biotransformación sobre medio natural. (Figura 4).

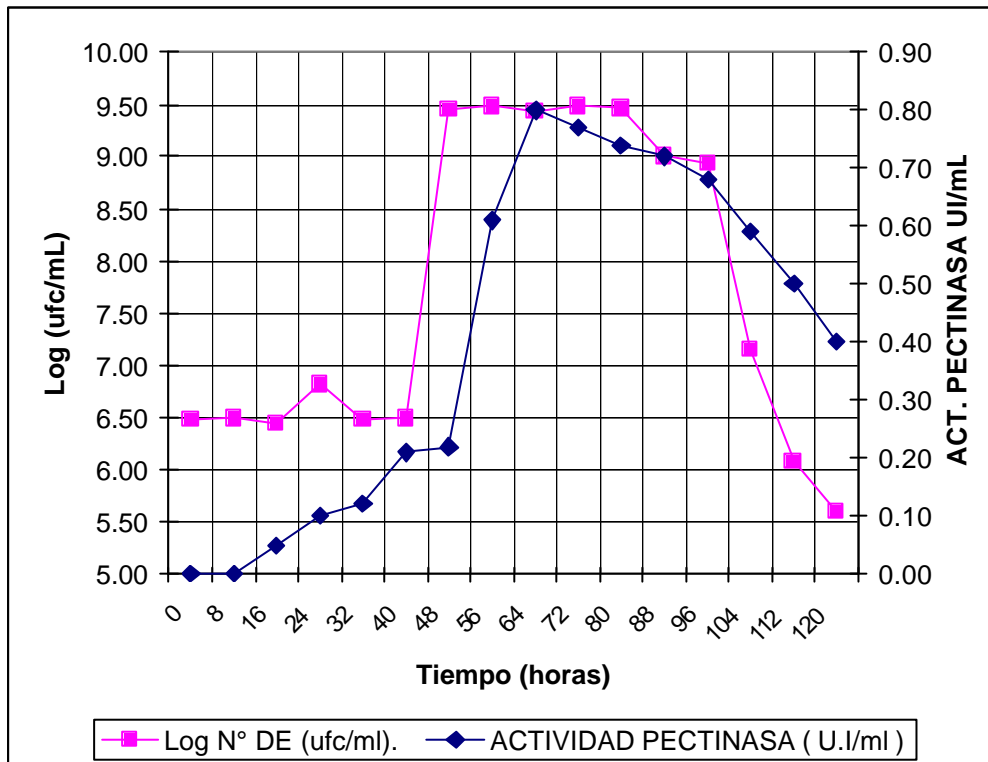
FIGURA 4. EFECTO DE LA AIREACIÓN-AGITACIÓN EN EL CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO



4.2. CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO Y PRODUCCIÓN DE PECTINASAS.

En la Figura 5, se observa que la máxima producción de pectinasas es alcanzada en la etapa estacionaria del crecimiento microbiano, es decir, a las 64 horas.

FIGURA 5. CURVA DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO Y PRODUCCIÓN DE PECTINASAS EN MEDIO TS- PECTINA 1%



4.3. PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN

4.3.1. ANÁLISIS Y SELECCIÓN DE NUTRIENTES MÁS INFLUYENTES EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PECTINASAS.

El análisis del diseño de Plackett Burman demostró que los nutrientes que más influyeron sobre la producción de pectinasas fueron: Cáscara de naranja, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, seleccionándose éstos, para un análisis posterior de optimización (ANEXO K).

4.3.2.OPTIMIZACIÓN DE LOS 3 NUTRIENTES SELECCIONADOS EN LA ETAPA ANTERIOR.

Mediante la optimización de los 3 nutrientes más influyentes, utilizando el diseño de Box Benhken, obtuvimos los siguientes resultados:

Cáscara de naranja (16.7 g/ L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 g/ L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.013 g/ L) y una producción máxima predictiva de pectinasas de **0.71 U.I./mL** (ANEXOS L, L.1 y L.2).

4.3.3. BIOTRANSFORMACIÓN FINAL EN BIORREACTOR

La cinética microbiana, llevada a cabo con los resultados obtenidos del diseño de Box Benhken, maximizó la respuesta entre las 60 y 80 horas, tiempo en el que se logró una producción de 0.65 U.I./mL de la enzima.

CUADRO 6.
CONCENTRACIONES ÓPTIMAS A TRABAJAR EN BIORREACTOR

	VARIABLES	CONCENTRACIÓN (g / L)
VALORES	$X_1 =$ Cáscara de naranja	16.700
ÓPTIMOS	$x_2 = (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	5.000
	$X_4 = \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.013
VALORES	$X_3 = (\text{NH}_2)_2\text{CO}$	2.850
MEDIOS	$X_5 = \text{CaCl}_2$	0.051
	$X_6 = \text{NaCl}$	3.000
	$X_7 = \text{MgSO}_4$	0.600
	$X_8 = \text{Na}_2\text{CO}_3$	2.400

Volumen del medio experimental	: 1000 mL
Concentración celular del inóculo	: 3×10^9 u.f.c / mL
Tiempo de biotransformación	: 120 horas
Volumen de inóculo	: 100 mL
Temperatura	: 37 °C
Aireación	: 0.5 vvm.
Agitación	: 300 rpm.
pH	: 7.0

En el resultado del crecimiento de la población microbiana que se muestra en la Figura 6, podemos notar que éste obtuvo un máximo valor entre las 60 y 80 horas de transcurrido el proceso de biotransformación.

En la misma figura, se muestra la producción de pectinasas, durante el proceso de biotransformación, registrándose una alta producción de **0.65 U.I./mL** a las 72 horas, valor muy cercano a lo pronosticado en las Curvas de Superficie Respuesta **0.71 U.I./mL** (ANEXO L.2).

FIGURA 6. CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE PECTINASAS POR *Actinomyces naeslundii* EN UN BIORREACTOR DE 1 LITRO

