



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**“AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL HONGO *ASPERGILLUS NIGER* PARA LA OBTENCIÓN DE ENZIMAS CLARIFICADORAS
APLICABLES EN BIOTECNOLOGÍA DE JUGOS”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

AUTOR:

MÓNICA PIEDAD LOZANO TORRES

DIRECTOR:

ING. CLAUDIO SÁNCHEZ JÁUREGUI

CUENCA – ECUADOR

2011

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de manera especial a mis padres que me dieron la vida y que con esfuerzo alguno me supieron guiar, apoyar y confiar en mí para ser alguien en la vida.

A mis hermanos, esposo e hijos quienes siempre estuvieron conmigo y me apoyaron en todo momento de mi etapa universitaria.

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Ing. Claudio Sánchez, Director de mi trabajo de graduación, por haberme prestado de manera bondadosa parte de su tiempo en la elaboración y culminación de mi tesis. Además agradezco a la Ing. María Fernanda Rosales, quien con paciencia y carisma me supo ayudar en el desarrollo de la misma.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo, fue el de aislar el hongo *Aspergillus niger* a partir de especias que lo contienen como parte de su flora normal, como son las pasas esencialmente, en donde se obtuvo en mayor cantidad. Se elaboraron diferentes medios de cultivo para su desarrollo; utilizándose principalmente: Agar G25N, Agar YMG. Para pruebas de acción pectinolítica y clarificación del jugo, las esporas se mantuvieron congeladas en una suspensión de 1 ml de agua destilada estéril y se aplicaron en un medio que contenía pectina, sacarosa y minerales, en la que se incubó por 5 días a 35 °C y 150 rpm de agitación constante en baño maria. De esta manera se determinó la capacidad clarificante de la cepa y por medio de un diseño experimental se obtuvieron resultados del tiempo de actuación de la misma en el el jugo de manzana.

ABSTRACT

The objective of this study was to isolate the fungus *Aspergillus niger* from species on which it is naturally found, such as raisins, where it is obtained in large quantities. Different cultivation mediums were elaborated for its development; principally Agar G25N and Agar YMG. For pectinolytic and juice clarification tests, the spores were maintained frozen in a 1ml suspensión of sterilized distilled water and were applied to a medium of pectin, saccharose and minerals, incubated for five days at 35°C in a bain-marie and constantly stirred at 150 rpm. The clarification capacity of the batch was thus determined, and through experimental design, the results for the action time with apple juice were obtained.

INDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	..ii
Agradecimiento.....	..iii
Resumen.....	..iv
Abstract.....	.. v
Índice de Contenidos.....	..vi
Índice de Anexos.....	..x

INTRODUCCIÓN.....	1
--------------------------	----------

CAPITULO I: PECTINAS Y PECTINASAS

1.1 GENERALIDADES EN LA INDUSTRIA DE LAS BEBIDAS Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS	3
1.2 PRINCIPALES SUSTANCIAS PECTICAS	5
1.2.1 Clases de Sustancias Pecticas.....	5
1.3 OBTENCIÓN INDUSTRIAL DE PECTINAS	5
1.4 IMPORTANCIA DE LA ENZIMA PECTINASA	6
1.4.1 Las Enzimas.....	7
1.4.2 Actividad Enzimática.....	12
1.4.3 Clasificación y Nomenclatura de las Enzimas.....	12

1.5 USO INDUSTRIAL DE LA PECTINASA.....	16
---	----

CAPITULO II: *ASPERGILLUS NIGER*

2.1 CARACTERISTICAS GENERALES.....	18
------------------------------------	----

2.1.1 Características Macroscópicas.....	18
--	----

2.1.2 Características Microscópicas.....	19
--	----

2.2 OBTENCION, AISLAMIENTO Y PURIFICACION A PARTIR DE SUSTRATOS.....	19
---	----

2.2.1 Obtención del <i>Aspergillus niger</i> a partir de sustratos.....	19
---	----

2.2.2 Aislamiento del hongo <i>Aspergillus niger</i>	20
--	----

2.2.3 Purificación del hongo <i>Aspergillus niger</i>	20
---	----

2.3 MEDIOS DE CULTIVO.....	21
----------------------------	----

2.3.1 Medios de Cultivo utilizados en la obtención, aislamiento y purificación del <i>Aspergillus niger</i>	21
--	----

2.4 IDENTIFICACION Y MANTENIMIENTO DEL HONGO <i>ASPERGILLUS NIGER</i>	22
---	----

2.4.1 Identificación del hongo <i>Aspergillus niger</i>	22
---	----

2.4.2 Mantenimiento del hongo <i>Aspergillus niger</i>	23
--	----

CAPITULO III: ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA.

3.1 MEDIOS Y SUSTRATOS.....	24
3.1.1 Preparación del Medio.....	24
3.1.2 Siembra de esporas en tubos Eppendorf.....	24
3.1.3 Conteo del número de esporas en la Cámara de Neubauer.....	25
3.1.4 Recuento del número de esporas.....	26
3.1.5 Inoculación e incubación de las esporas en el medio de Tutobello y Mill.....	26
3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	27
3.2.1 Materiales y Métodos.....	27
3.2.2 Metodología para la determinación de la actividad enzimática en el jugo manzana.....	27
3.2.2.1 Inoculación de las esporas del <i>Aspergillus niger</i> en el jugo de manzana.....	28
3.2.3 Elaboración del jugo de manzana.....	28
3.3 APLICACIONES EN LA INDUSTRIA DEL ASPERGILLUS NIGER Y PECTINASAS.....	31
3.3.1 Pectinasas Ácidas.....	31
3.3.1.1 Producción de Zumos.....	31
3.3.1.2 Producción de Vinos.....	32
3.3.2 Pectinasas Alcalinas.....	33

CAPITULO IV: DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1 GENERALIDADES DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
4.1.1 Definiciones básicas en el diseño de experimentos.....	35
4.2 FACTORES.....	36
4.2.1 Factores Controlables.....	36
4.2.2 Factores no Controlables.....	36
4.2.3 Factores Estudiados.....	36
4.3 ESCALADO DE LAS VARIABLES.....	37
4.4. TIPOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL	
SCREENING DE LAS VARIABLES.....	37
4.4.1 Diseño Factorial Completo.....	38
4.5 ANALISIS DE DATOS.....	39
4.6 METODOS DE OPTIMIZACION.....	39
4.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
 CONCLUSIONES.....	 45
 BIBLIOGRAFIA.....	 46
 ANEXOS.....	 49

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Composición de cada medio de cultivo en g/1l.....	49
ANEXO 2: Tabla de resultados del recuento del número de esporas en la cámara de neubauer.....	52
ANEXO 3: Copia de Norma INEN 436. Jugo de manzana. Requisitos.....	54
ANEXO 4 : Tabla de resultados del tiempo de actuación de la enzima.....	59
ANEXO 5: Datos iniciales y finales de cada experimento.....	60
ANEXO 6: Cantidades utilizadas en la regulación de cada bebida de acuerdo al experimento.....	61
ANEXO 7: Crecimiento y desarrollo del hongo <i>aspergillus niger</i> en los medios de cultivo: YMG y G25N.....	62
ANEXO 8: <i>Aspergillus niger</i> visto en el microscopio.....	62
ANEXO 9: Recolección de esporas del hongo en tubos eppendorf.....	63
ANEXO 10: Tubos que mantienen las esporas del hongo en congelación.....	63
ANEXO 11: Pruebas de clarificación en el medio de tutobello y mil.....	64
ANEXO 12: Medio clarificado.....	64
ANEXO 13: Sustrato clarificado obtenido después de la filtración.....	65
ANEXO 14: Inoculación del sustrato de la enzima en el jugo de manzana.....	65
ANEXO 15: Jugo de manzana clarificado y pasteurizado.....	66

Lozano Torres Mónica Piedad

Trabajo de Graduación

Ing. Claudio Sánchez Jaúregui

Enero 2011.

**“AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL HONGO *ASPERGILUS NIGER*
PARA LA OBTENCIÓN DE ENZIMAS CLARIFICADORAS APLICABLES EN
BIOTECNOLOGÍA DE JUGOS”**

INTRODUCCIÓN

En este trabajo investigativo se puede ver que las enzimas tienen numerosas aplicaciones en la industria de alimentos y bebidas, ya que se utilizan para transformación y producción de aromas y de productos intermedios. Siendo así que las enzimas pectinolíticas se utilizan en la industria de alimentos para clarificar néctares y obtener más volumen de producción.

Actualmente, existe un gran interés en el estudio de pectinasas provenientes de sistemas microbianos, destacando entre estas el género *Aspergillus*, ya que se sabe que es un hongo filamentoso que está adaptado al crecimiento sobre superficies y que es capaz de hidrolizar la pectina. Estas presentan una extensa aplicación en la industria alimentaria principalmente en la obtención y clarificación de jugos. Por eso la importancia de obtener hongos que contengan esta actividad enzimática y que son de gran ayuda a nivel industrial en los alimentos.

CAPITULO I

PECTINAS Y PECTINASAS

Las pectinas constituyen un grupo de polisacáridos más abundantes e importantes, están en mayor cantidad en los frutos inmaduros y especialmente en algunos tejidos suaves, como en la cáscara de los cítricos (naranja, limón, toronja, lima), en las manzanas, peras, etc. Se encuentran en la lámina media de la pared celular de las plantas y contribuyen en la forma y estructura de las plantas así como en la protección de enfermedades de estas.

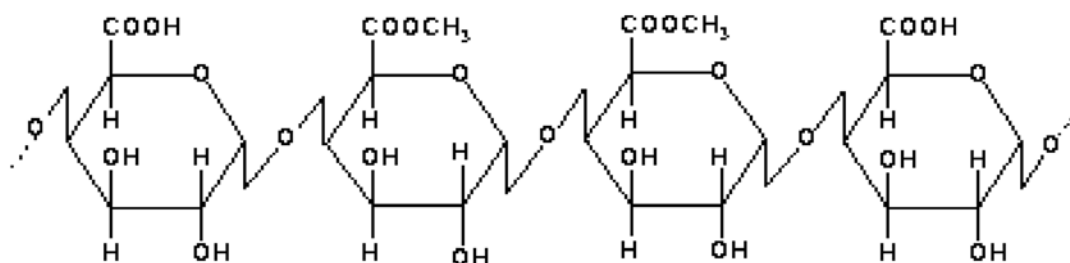
Aun dentro del propio vegetal existe una diferente distribución de las pectinas; las más esterificadas están en la parte más interna, y las menos esterificadas en la periferia. Excepto en algunos productos como la remolacha y la espinaca, cuyas pectinas contienen una pequeña fracción de ácido ferúlico unido a los grupos no reductores y en otras frutas y hortalizas, la mayoría de estos polímeros están constituidos de manera exclusiva por residuos parcialmente esterificados de ácido galacturónico. (Badui, 2006).

Las pectinas son utilizadas ampliamente a nivel industrial, principalmente en la industria de alimentos como agentes hidrocoloides (gomas) gelificantes. Su componente principal es una cadena lineal constituida de unidades de ácido poli- α -D galacturónico unidos por enlaces glucosídicos (1-4). Dependiendo del origen botánico y el proceso de extracción los grupos carboxílicos están parcialmente esterificados con metanol y en ciertas pectinas los grupos hidroxilos están parcialmente acetilados. (Vallejo, et. al., 2004)

La funcionalidad de una pectina, y por ende su posible aplicación, depende de factores intrínsecos como su peso molecular, grado de esterificación y por factores extrínsecos, tales como el pH, las sales disueltas y la presencia de azúcares. La viscosidad de sus dispersiones, al igual que la de otros polisacáridos, se incrementa a medida que aumenta el peso molecular; en el caso de las pectinas, la viscosidad es mayor cuanto más se incrementa el grado de esterificación.

Las pectinas desempeñan un papel muy importante en la industrialización de las frutas, como la elaboración de jaleas, gelatinas o geles similares, sobre todo en lo relacionado con la elaboración de bebidas (Badui, 2006).

Figura 1.1 Estructura de la molécula de pectina. Se representa una cadena de ácido poligalacturónico parcialmente metilesterificado.



Fuente: SORIANO, Margarita. 2004. Análisis de Sistemas Pectinolíticos Bacterianos. Aislamiento y Caracterización de las Pectinasas, PeIA de *Paenibacillus* sp. BP- 23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. Tesis Doctoral. Barcelona, España. (en línea) <http://biblioteca.universia.net/ficha.do?id=232981>

1.1 GENERALIDADES EN LA INDUSTRIA DE LAS BEBIDAS Y APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS

La Biotecnología es, dentro de las ciencias, un campo de rápida expansión con muchas aplicaciones diferentes. Una de estas áreas de aplicación es la de la producción de

nuevas variedades de alimentos y bebidas, tanto por métodos modernos como por técnicas tradicionales.

La Biotecnología “Tradicional” se refiere a las técnicas convencionales que han sido empleadas durante muchos siglos para producir cerveza, vino, queso, pan y otros alimentos. La Biotecnología “Moderna” abarca todos los métodos de modificación genética por ADN recombinante y técnicas de fusión celular, junto con desarrollos modernos de procesos biotecnológicos tradicionales.

Además la biotecnología ha estado estrechamente relacionada con la producción de alimentos, tanto en lo que se refiere al cultivo de plantas y cría de animales seleccionados, como al procesado de los mismos utilizando enzimas microbianas.

(Braun y Bennette, 1994).

Algunas de las aplicaciones de la biotecnología moderna en la fabricación de bebidas son los jugos de fruta ya que las pectinasas son enzimas que degradan la pectina, componente de las paredes de las células vegetales, incrementando el rendimiento del proceso de extracción del jugo de fruta y disminuyendo su turbidez y viscosidad.

Hoy todas las industrias emplean la biotecnología para optimizar sus procesos, obtener mejores productos u ofrecer servicios más eficientes. La industria alimenticia la utiliza en lácteos, como el yogur, leche fermentada y quesos; en aditivos y edulcorantes, como glutamato y el aspartamo; en ácidos orgánicos como el ácido cítrico, para las gaseosas y caramelos. Además enzimas para la fabricación de pan, galletas, jugos, embutidos, etc. (Altamirano,2009).

1.2.- PRINCIPALES SUSTANCIAS PÉCTICAS

Las sustancias pécticas se encuentran como constituyentes de las paredes celulares y en los espacios intracelulares de los vegetales, sirviendo como unión entre las células. Las pectinas son carbohidratos coloidales de polímeros lineales cuya unidad principal es el ácido D-galacturónico. La firmeza del gel (jalea o mermelada) depende del tipo de pectina (peso molecular y grado de metilación) del porcentaje de pectina, porcentaje de azúcar y del pH. (Manual de Prácticas de Análisis de alimentos, 2007).

1.2.1.- Clases de sustancias pécticas

Se pueden distinguir dos clases principales de sustancias pécticas: los ácidos pectínicos, que tienen una pequeña porción de sus ácidos poligalacturónicos como ésteres metílicos, y los ácidos pécticos, que solo contienen moléculas de ácido poligalacturónico libre de esterificación.(Badui, 2006).

1.3.- OBTENCION INDUSTRIAL DE PECTINAS

La obtención industrial de las pectinas se hace a partir de cáscara de los cítricos (limón, naranja) o del bagazo de manzana. Después de extraerle el jugo y el aceite esencial, las cortezas residuales de limón y naranja contienen de 25 a 40% de pectinas en base seca; se calientan a 95 °C para inactivar las enzimas pectinolíticas y evitar futuras degradaciones; se lavan varias veces para eliminar sustancias solubles como azúcares, ácidos, etc., y se deshidratan; luego se precipitan mediante el empleo de etanol o de isopropanol, y finalmente se lavan y se secan.

Una variante de su recuperación consiste en la adición de sulfato de aluminio y amonio, pero este sistema requiere un tratamiento extra con etanol acidificado con ácido clorhídrico para extraer los residuos de aluminio.

Durante las distintas etapas de su fabricación se pueden inducir muchos cambios químicos catalizados por el ácido, la temperatura o las enzimas naturales; principalmente ocurre la hidrólisis de los enlaces éster metoxílico (desmetoxilación) y glucosídico (despolimerización), que traen consigo una reducción de la calidad, puesto que las pectinas se cotizan más cuantas menos degradaciones presenten.(Badui 2006).

1.4 IMPORTANCIA DE LA ENZIMA PECTINASA

La textura de las frutas y las verduras se debe a la presencia de las pectinas que forman parte de la pared celular, por lo que la acción de las pectinasas altera las características de estos alimentos.

Los jugos de tomate, naranja, limón, toronja, deben su viscosidad y turbiedad a las pectinas en suspensión que se liberan de sus tejidos en el proceso de extracción; la acción de las pectinasas causa la hidrólisis, la desesterificación y la desestabilización de los coloides, provocando su precipitación y la consecuente pérdida de sus características.

El consumidor no acepta estos jugos sin su correspondiente turbiedad; por lo tanto, durante su manufactura es necesaria la inactivación enzimática endógena con tratamientos térmicos que dependen del pH: a medida que este disminuye se reduce la intensidad del calentamiento. Además del pH, la concentración de sólidos también influye ya que los sólidos tienen un efecto protector sobre la enzima.

Las preparaciones comerciales de pectinasas son en realidad mezclas de la pectinmetilesterasa, la poligalacturonasa y la pectinoliasa. Se usan en la extracción, clarificación y filtración de diversos jugos de frutas y de vinos, así como en la elaboración de purés y concentrados frutícolas. (Badui,2006).

1.4.1 Las Enzimas

Una enzima es una proteína que actúa como catalizador biológico, llevando a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades, no se consume durante la reacción y en general presenta un elevado grado de especificidad. Todas las células, incluyendo

microorganismos y organismos superiores, producen enzimas. Su acción está estrechamente ligada con las reacciones metabólicas y la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas a las células tardarían mucho en efectuarse o no procederían si no estuvieran presentes las enzimas.

En el sector alimentario, el interés actual de la aplicación de enzimas en procesos-tecnología-enzimática, se enfoca a la conservación de alimentos o de sus componentes (por ejemplo, vitaminas), al uso más eficiente de materias primas y al mejoramiento de la calidad sensorial de los alimentos (textura y sabor). Otros ejemplos de la tecnología enzimática actual se enlistan a continuación:

- El uso de enzimas en medios no acuosos para la producción de compuestos quirales y para la síntesis de polímeros especiales.
- La síntesis de edulcorantes, como el aspartamo, empleando la reacción inversa de una proteasa.
- La producción de ciclodextrinas a partir de almidón.
- La producción a gran escala de enzimas por medio de ingeniería genética.
- La aplicación de enzimas o de células inmovilizadas en la producción de materias primas de aplicación en alimentos, como en la producción de jarabes fructosados, de trehalosa y de iso maltulosa, de ácido fumárico, o de aminoácidos como el ácido aspartámico o la alanina.

Todas las enzimas son proteínas, tienen una estructura tridimensional globular y una disposición óptima de los aminoácidos de su centro activo o sitio catalítico. Debido a su

naturaleza química, a las enzimas les afectan los mismos factores que alteran a las proteínas, por esta razón, para actuar en forma óptima, cada una requiere de ciertas condiciones de temperatura, pH, fuerza iónica, etc. Condiciones en las que la estructura tridimensional es estable y la carga óptima para interactuar con el sustrato.

Muchas enzimas están formadas por una sola cadena polipeptídica, como la lisozima, tripsina y pepsina, sin embargo, muchas otras están compuestas por más de una cadena polipeptídica, por lo que dependen de su estructura cuaternaria para presentar actividad.

(Badui, 2006).

Las enzimas suelen ser muy específicas tanto del tipo de reacción que catalizan como del sustrato involucrado en la reacción. La forma, la carga y las características hidrofílicas/hidrofóbicas de las enzimas y los sustratos son los responsables de dicha especificidad. Las enzimas también pueden mostrar un elevado grado de estereoespecificidad, regioselectividad y quimioselectividad.

Algunas de estas enzimas que muestran una elevada especificidad y precisión en su actividad son aquellas involucradas en la replicación y expresión del genoma. Estas enzimas tienen eficientes sistemas de comprobación y corrección de errores, como en el caso de la ADN polimerasa, que cataliza una reacción de replicación en un primer paso, para comprobar posteriormente si el producto obtenido es el correcto.

Aquellas enzimas que producen metabolitos secundarios son denominadas promiscuas, ya que pueden actuar sobre una gran variedad de sustratos. Por ello, se ha sugerido que

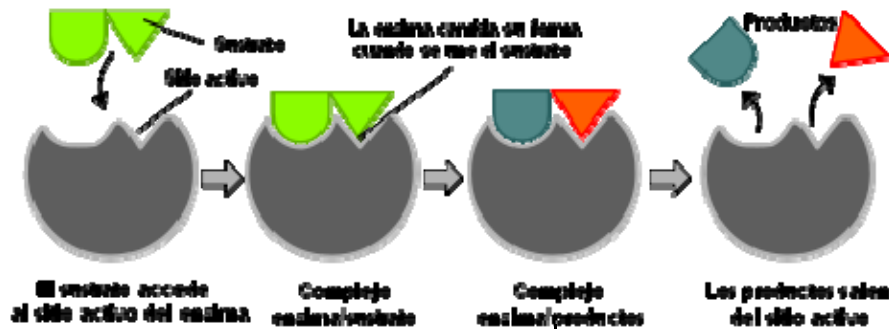
esta amplia especificidad de sustrato podría ser clave en la evolución y diseño de nuevas rutas biosintéticas.

Modelo de la "llave-cerradura"

Las enzimas son muy específicas, como sugirió Emil Fisher en 1894. En base a sus resultados dedujo que ambas moléculas, enzima y sustrato, poseen complementariedad geométrica, es decir, sus estructuras encajan exactamente una en la otra, por lo que ha sido denominado como modelo de la "llave-cerradura", refiriéndose a la enzima como a una especie de cerradura y al sustrato como a una llave que encaja de forma perfecta en dicha cerradura. Sin embargo, si bien este modelo explica la especificidad de las enzimas, falla al intentar explicar la estabilización del estado de transición que logran adquirir las enzimas.

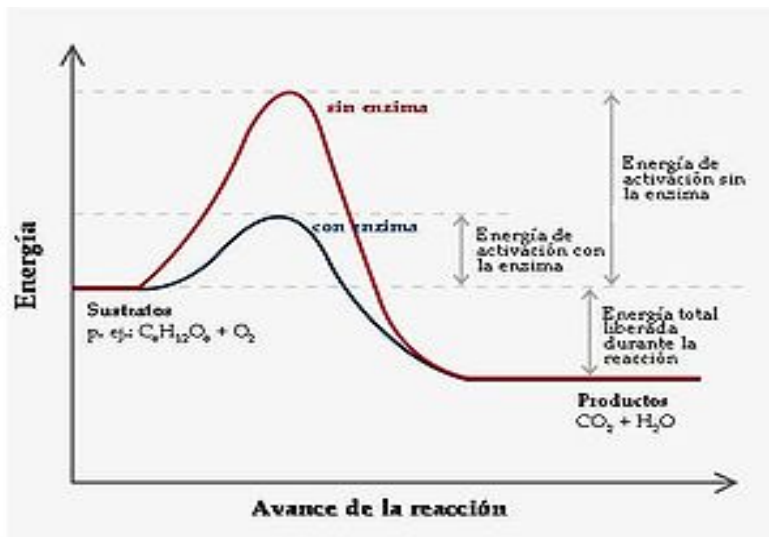
En 1958 Daniel Koshland sugiere una modificación al modelo de la llave-cerradura: las enzimas son estructuras bastante flexibles y así el sitio activo podría cambiar su conformación estructural por la interacción con el sustrato. Como resultado de ello, la cadena aminoacídica que compone el sitio activo es moldeada en posiciones precisas, lo que permite a la enzima llevar a cabo su función catalítica. En algunos casos, como en las glucosidasas, el sustrato cambia ligeramente de forma para entrar en el sitio activo. El sitio activo continúa dicho cambio hasta que el sustrato está completamente unido, momento en el cual queda determinada la forma y la carga final.

Figura 1.2 Modelo del encaje inducido



Fuente: WALES, Jimmy. 2010. Enzimas. USA. (en línea) <http://es.wikipedia.org/wiki/enzima>

Figura 1.3 Gráfica de las energías de las diferentes fases de una reacción química



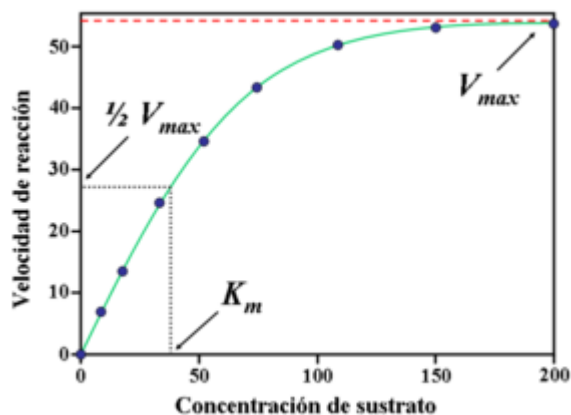
Fuente: WALES, Jimmy. 2010. Enzimas. USA. (en línea) <http://es.wikipedia.org/wiki/enzima>

Los sustratos precisan mucha energía para alcanzar el estado de transición, pero una vez alcanzado, se transforman en productos. La enzima estabiliza el estado de transición, reduciendo la energía necesaria para formar los productos.

Al igual que sucede con todos los catalizadores, las enzimas no alteran el equilibrio químico de la reacción. Generalmente, en presencia de una enzima, la reacción avanza en la misma dirección en la que lo haría en ausencia de enzima, sólo que más rápido. Sin embargo, en ausencia de enzima, podría producirse una reacción espontánea que generase un producto diferente debido a que en esas condiciones, dicho producto diferente se forma más rápidamente.

La mayor contribución de Henri fue la idea de dividir las reacciones enzimáticas en dos etapas. En la primera, el sustrato se une reversiblemente a la enzima, formando el complejo enzima-sustrato (también denominado complejo Michaelis). En la segunda, la enzima cataliza la reacción y libera el producto.

Figura 1.4 Curva de saturación de una reacción enzimática donde se muestra la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de la reacción.



Fuente: WALES, Jimmy. 2010. Enzimas. USA. (en línea) <http://es.wikipedia.org/wiki/enzima>.

Las enzimas pueden catalizar hasta varios millones de reacciones por segundo, las velocidades de las enzimas dependen de las condiciones de la solución y de la concentración de sustrato. Aquellas condiciones que desnaturalizan una proteína, como

temperaturas elevadas, pHs extremos o altas concentraciones de sal, dificultan o impiden la actividad enzimática, mientras que elevadas concentraciones de sustrato tienden a incrementar la actividad.

1.4.2 Actividad enzimática

La sustancia sobre la cual actúa una enzima se llama sustrato. La sacarosa es el sustrato de la sacarasa que actúa rompiéndola en sus componentes. Las enzimas actúan de acuerdo con la siguiente secuencia: La Enzima (E) y el sustrato (S) se combinan para formar un complejo intermedio enzima sustrato (E-S), el cual se descompone formando un producto y regenerando la enzima.

Figura 1.5 Acción de la enzima.



Fuente:

BORSANI, Olga. 2007. Enzimas. Argentina. (en línea) <http://www.scribd.com/doc/3119919/enzimas>.

1.4.3 Clasificación y Nomenclatura de las Enzimas.

El nombre de una enzima suele derivarse del sustrato o de la reacción química que cataliza, con la palabra terminada en **-asa**. Por ejemplo, lactasa proviene de su sustrato lactosa; alcohol deshidrogenasa proviene de la reacción que cataliza que consiste en "deshidrogenar" el alcohol; ADN polimerasa proviene también de la reacción que cataliza que consiste en polimerizar el ADN.

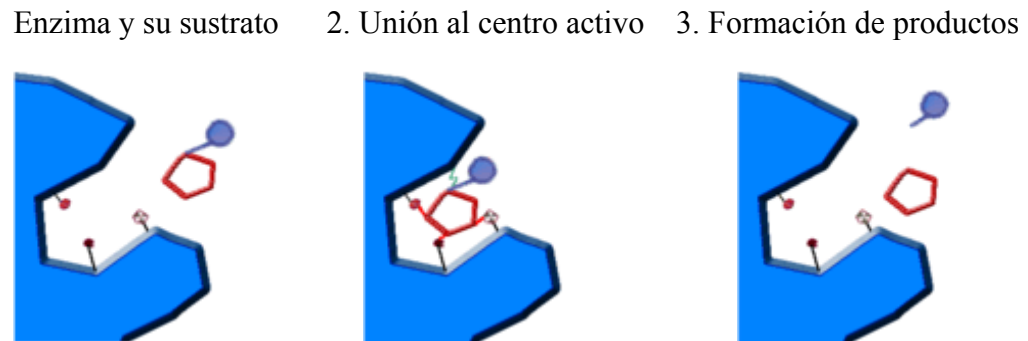
La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular ha desarrollado una nomenclatura para identificar a las enzimas basada en los denominados Números EC.

Clases de enzimas existentes en la actualidad:

- EC1- Oxidorreductasas: catalizan reacciones de oxidorreducción. Precisan la colaboración de las coenzimas de oxidorreducción (NAD^+ , NADP^+ , FAD) que aceptan o ceden los electrones correspondientes. Tras la acción catalítica, estas coenzimas quedan modificadas en su grado de oxidación, por lo que deben ser recicladas antes de volver a efectuar una nueva reacción catalítica. *Ejemplos:* deshidrogenasas, peroxidasas.
- EC2 -Transferasas: transfieren grupos activos (obtenidos de la ruptura de ciertas moléculas) a otras sustancias receptoras. Suelen actuar en procesos de interconversión de monosacáridos, aminoácidos, etc. *Ejemplos:* transaminasas, quinasas.
- EC3 - Hidrolasas: catalizan reacciones de hidrólisis con la consiguiente obtención de monómeros a partir de polímeros. Actúan en la digestión de los alimentos, previamente a otras fases de su degradación. La palabra *hidrólisis* se deriva de *hidro* $\rightarrow$ 'agua' y *lisis* $\rightarrow$ 'disolución'. *Ejemplos:* glucosidasas, lipasas, esterasas.
- EC4- Liasas: catalizan reacciones en las que se eliminan grupos H_2O , CO_2 y NH_3 para formar un doble enlace o añadirse a un doble enlace. *Ejemplos:* descarboxilasas, liasas.
- EC5 Isomerasas: actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de ellas sus isómeros funcionales o de posición, es decir, catalizan la racemización y cambios de posición de un grupo en determinada molécula obteniendo formas isoméricas. Suelen actuar en procesos de interconversión. *Ejemplo:* epimerasas (mutasa).

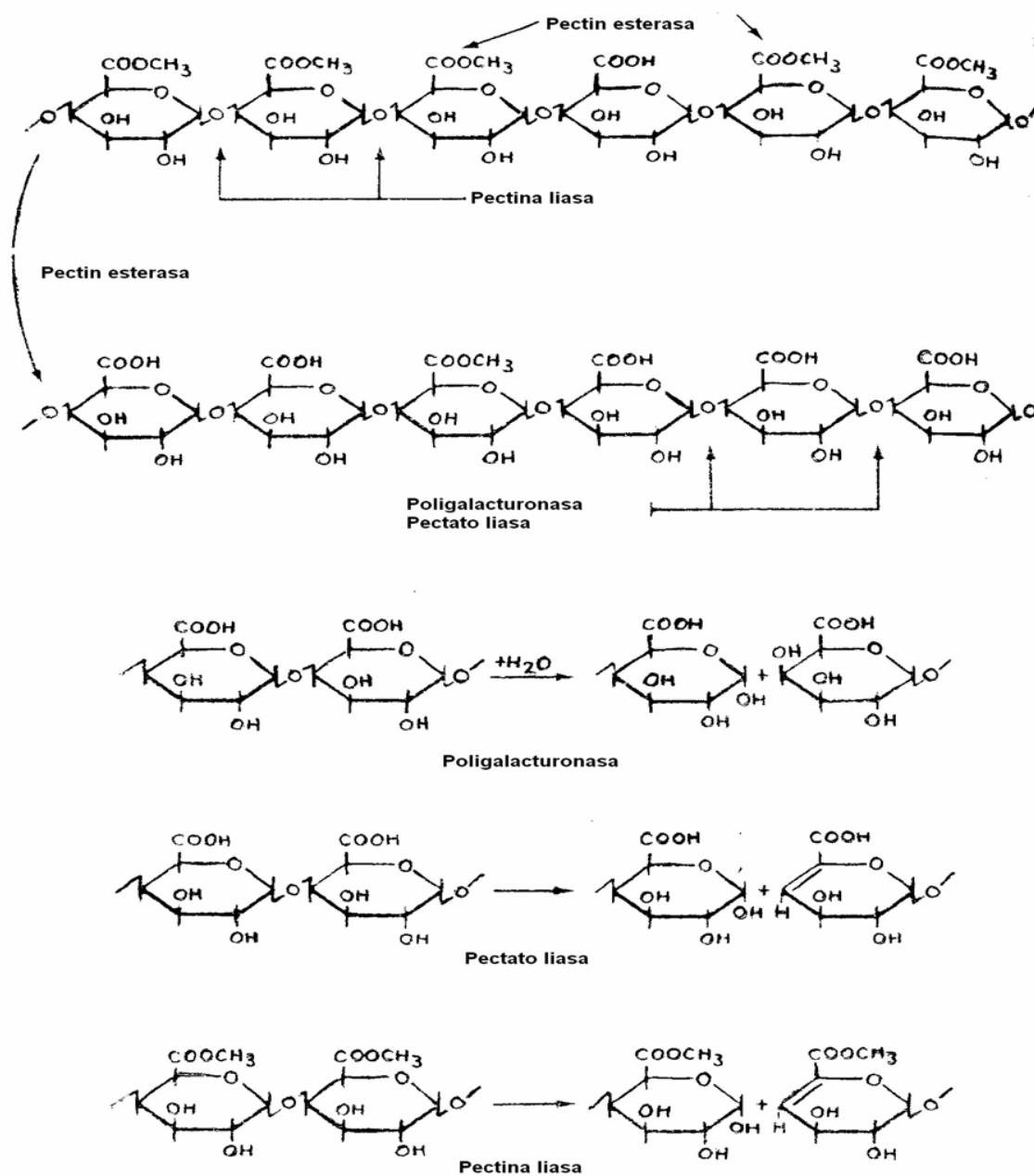
- EC6- Ligasas: catalizan la degradación o síntesis de los enlaces denominados "fuertes" mediante el acoplamiento a moléculas de alto valor energético como el ATP. *Ejemplos:* sintetasas, carboxilasas.

Figura 1.6 Mecanismo de acción de las enzimas.



Fuente: WALES, Jimmy. 2010. Enzimas. USA. (en línea) <http://es.wikipedia.org/wiki/enzima>.

Figura 1.7 Reacciones Enzimáticas que llevan a cabo las Pectinasas sobre las Sustancias Pécicas.



Fuente: WALES, Jimmy. 2010. Enzimas. USA. (en línea) <http://es.wikipedia.org/wiki/enzima>.

1.5 USO INDUSTRIAL DE LA PECTINASA

Las pectinasas desempeñan un papel importante en la industria de alimentos, en la extracción y clarificación de jugos de frutas y vinos, en la maceración de vegetales y frutas, otra aplicación importante de las pectinasas está en la industria textil, específicamente en el tratamiento de fibras naturales como rami y lino.

Las enzimas pectinolíticas se usan en la industria de alimentos para clarificar néctares y obtener más volumen de producción. La enzima endo-PMG cataliza la hidrólisis de los enlaces α 1,4 en polisacáridos de materia prima en producción de jugos, néctares, puré, cocteles y otros. También se emplea en la industria del vino para tratar los mostos y como resultado de la pectólisis se obtiene más volumen de producto con excelente calidad de brillo y mejor aroma. Además se han incluido las enzimas pectinolíticas como aditivo en la preparación de alimentos concentrados para ovejas, cabras, cerdos y aves. (Grebechova y Prieto, 2006).

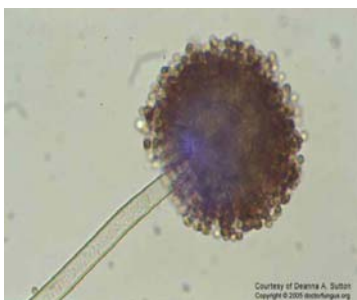
CAPITULO II

ASPERGILLUS NIGER

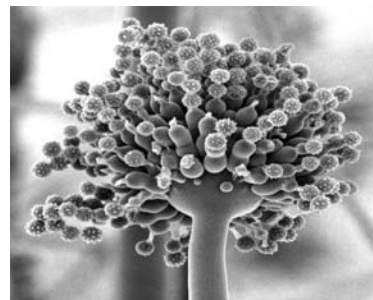
El *aspergillus niger* se encuentra en el grupo de los *Aspergillus* negros, el cual se clasifica dentro del reino fungi, clase Eurotiomycetes, familia moniliaceae, orden moniliales, genero *Aspergillus*, especie *Aspergillus niger*.

Aspergillus niger es un organismo ampliamente utilizado en la producción de una gran variedad de enzimas con un espectro tal que puede lograrse la completa degradación de la celulosa. *Aspergillus* muestra algunas ventajas para la producción industrial de enzimas: tiene un alto nivel de producción, presenta buenas propiedades para el cultivo, lo que posibilita la producción a gran escala, sus productos son considerados como GRAS (generally regarded as safe), lo que permite su aplicación en la industria de alimentos tanto para el hombre como animales. (Villena y Gutiérrez,2003).

Figura 2.1 *Aspergillus Niger*



Fuente: SUTTON, Deanna. 2005. *Aspergillus*.
USA. (en línea)
[http://www.doctorfungus.org/
Imageban/imagenes/Dsutton-0sfeb/
A-niger-1.jpg8imgrefurl](http://www.doctorfungus.org/Imageban/imagenes/Dsutton-0sfeb/A-niger-1.jpg8imgrefurl)



Fuente: READ, Lila. 2007. *Aspergillus niger*.
Mexico. (en línea)
[http://www.Kacato.files.wordpress.com/
asexual-structures-of-aspergillus-niger/jpg](http://www.Kacato.files.wordpress.com/asexual-structures-of-aspergillus-niger/jpg)

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Aspergillus es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originaran las esporas asexuales o conidios.

El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que solo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas. (Abarca, 2000).

2.2.1 Características Macroscópicas:

- Diámetro de las colonias.
- Coloración del anverso y del reverso de las colonias.
- Presencia de esclerocios.
- Presencia de gotas de exudado.
- Presencia de pigmento difusible.
- Textura de las colonias

2.1.2 Características Microscópicas:

- Disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula.
- Longitud y anchura de los estipes.
- Forma y diámetro de las vesículas.
- Longitud y anchura de las métulas y fiálides.
- Forma, diámetro y color de los conidios.
- Forma, diámetro y color de las ascosporas. (Abarca, 2000).

2.2 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN A PARTIR DE SUSTRATOS

2.2.1 Obtención del *Aspergillus niger* a partir de sustratos

Para la obtención del hongo *Aspergillus niger* se sembró en agares específicos muestras de pasas, maíz, maní, anís, clavo de olor y otras especerías; obteniendo mejores resultados con las pasas donde la flora fúngica normal es este tipo de hongo.

Se sembró en diferentes medios de cultivo como: YMG, PDA, CYA, G25N, CY20S y agar Sabouraud (ver composición de cada medio de cultivo en el anexo 1); los cuales según la bibliografía y la parte experimental los más adecuados para el crecimiento y mantenimiento del *Aspergillus niger* son: CYA y G25N.

Se realizó también cámaras húmedas para la observación en microscopio, las cuales consistía en colocar una pequeña muestra del hongo contenido en determinado tipo de agar, para este ser colocado en un portaobjetos, luego se colocó en una caja petri estéril

con un papel filtro embebido de agua destilada, con la finalidad de obtener una cámara húmeda en la cual fue incubada a 25°C, verificando las condiciones de humedad constantemente por cuatro días.

Posteriormente, una vez crecido el hongo se recolectaron las esporas en 1 ml de agua destilada estéril, en un tubo Eppendorf para su mantenimiento en refrigeración.

Estas esporas fueron cuantificadas a través de la cámara de Neubauer, en la que se cuenta el número de esporas en 5 cuadrantes, divide esta cantidad para 0.02 mm^3 , y luego multiplicado por 1000 y se obtiene la cantidad total de esporas en 1 ml. Se cuantificaron aproximadamente 3×10^6 esporas/ml en agar CYA, y 5×10^6 esporas/ml en agar G25N.

2.2.2 Aislamiento del hongo *Aspergillus niger*

El *aspergillus niger* puede ser aislado de varios sustratos como: granos de maíz, trigo, maní, pasas, harina de trigo, harina de maíz, soya, queso, caldos deshidratados, frutas contaminadas, etc. Se aisló el hongo *Aspergillus niger* a partir de especias que lo contienen como parte de su flora normal, como son las pasas esencialmente, en donde se obtuvo en mayor cantidad. (Pitt y Hocking, 1997).

2.2.3 Purificación del hongo *Aspergillus niger*

La purificación del hongo *Aspergillus niger* consistió en eliminar todo microorganismo indeseable que se encontraba en cada caja con el hongo, para lo cual se utilizó un bisturí estéril en la que ayudó a evitar más contaminaciones y a realizar una limpieza total del medio.

2.3 MEDIOS DE CULTIVO

Tres tipos de medios de cultivo se usan para el aislamiento de hongos:

- 1- Medios generales: permiten el crecimiento de la mayoría de los hongos.
- 2- Medios selectivos: permiten el crecimiento de algunos hongos inhibiendo a otros por medio de selección por pH, inhibidores químicos u omisión de nutrientes específicos.
- 3- Medios diferenciales: permiten el aislamiento de grupos de hongos con características particulares. (UNL-INIA, 1998).

2.3.1 Medios de cultivo utilizados en la obtención, aislamiento y purificación del *Aspergillus niger*

Los medios de cultivo utilizados para la obtención, aislamiento y purificación del hongo *aspergillus niger* fueron:

- A. Agar Extracto de Malta, Levadura y Glucosa (YMG)
- B. Agar Extracto de Levadura Czapeck (CYA)
- C. Agar Glicerol Nitrato (G25N)
- D. Agar Czapek Extracto de Levadura Sacarosa 20% (CY20S).
- E. Agar Papa Dextrosa (PDA).
- F. Agar Sabouraud.

2.4 IDENTIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL HONGO *ASPERGILLUS NIGER*

2.4.1 Identificación del hongo *Aspergillus niger*

Para la identificación del hongo *Aspergillus niger* se tomó como referencia las guías prácticas de identificación de hongos productores de micotoxinas contaminantes en alimentos, en donde se detalla algunas características que tiene el *Aspergillus*.

- Colonias: generalmente de rápido crecimiento, blancas, amarillas, marrón a negras o coloreadas de verde consiste principalmente en una felpa densa de conidióforos erectos.
- Conidióforos: estípita no ramificada con un ensanchamiento en el ápice (vesícula).
- Fiálides: formadas a partir de un elemento intercalar o métula que está inserto sobre la vesícula.
- Conidias: se originan desde las fiálides formando cadenas compactas columnares o radiadas; unicelulares, lisas o rugosas, hialinas o pigmentadas.

Las estructuras conidiógenas (métulas y/o fiálides) pueden estar repartidas sobre toda la superficie de la vesícula o solamente en el extremo de ella. El conjunto, o “cabeza” de *Aspergillus* tiene también, según los casos, un aspecto radiado (cadena de esporas divergentes en toda la superficie) o en “columna” (cadena de esporas mas o menos paralelas), en fascículo sobre el extremo apical de la vesícula, el conidióforo presenta, en el punto donde se une al micelio vegetativo, una célula bien diferenciada o célula podal. (UNL-INIA, 1998).

Además, para la identificación del hongo *aspergillus niger* se consideró otras claves: que si las colonias sobre CYA y MEA que exceden los 35 mm de diámetro y son de una coloración gris o negras que crecen a 25°C y a 37°C se trata de la variedad *niger*. Generalmente estos hongos son una mezcla de uni y biseriados con cabeza conidial radiada, de coloración negro o marrón. (UNL-INIA,1998).

Las Colonias en CYA son de 60 mm de diámetro, usualmente cubren toda la caja petri, el micelio es blanco y las cabezas conidiales son negras; al reverso de la caja se diferencia desde un color pálido a amarillo claro. Las colonias en MEA varían desde 30-60 mm de diámetro, usualmente son más pequeñas que en CYA y a menudo son bien separadas en comparación de las otras. Las colonias en G25N son de 18-30 mm de diámetro, son planas, el micelio es visible de color amarillo pálido.(Pitt y Hocking,1997).

2.4.2 Mantenimiento del hongo *Aspergillus niger*

El hongo se mantuvo en refrigeración en cada una de las cajas petri, en los dos medios de cultivo que mayor crecimiento obtuvieron (CYA y G25N) luego se realizó una recolección de esporas del hongo de dichas cajas, para lo cual se esterilizó agua destilada, se utilizó asas y puntas estériles de 1ml. Las esporas se mantuvieron en congelación en tubos ependorff de 1 ml, para luego realizar el conteo del número de esporas por cada ml dispuesto en cada tubo, el conteo del número de esporas se lo realizó en la Cámara de Neubauer, en donde se obtuvieron desde $3 \cdot 10^6$ esporas/ml hasta $9 \cdot 10^6$ esporas/ ml.

CAPITULO III

ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA

3.1 Medios y Sustratos

Para la selección de cepas de *Aspergillus niger* se utilizó el medio líquido de Tuttobello y Mill, modificado y constituido en g/l de: sacarosa 20g, pectina 20 g, agua destilada 500 ml y un medio básico a base de: extracto de levadura 2 g, NH_4NO_3 5g, $(\text{Na})_2\text{SO}_4$ 0,2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0008 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,004 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g y agua destilada 500 ml. La sacarosa con la pectina fueron esterilizadas por separado a 120°C por 20 min y mezcladas a la solución mineral antes de la inoculación.

3.1.1 Preparación del medio.

Para la preparación del medio líquido de Tuttobello y Mill, se esterilizó por separado la sacarosa junto con la pectina en 500 ml de agua destilada a 120°C por 20 minutos, de igual manera se esterilizó el medio básico con 500 ml de agua destilada. Una vez esterilizadas las dos soluciones, se mezclaron en un matraz erlenmeyer de 1000 ml, el medio de cultivo se dosificó en otros matraces de 250 ml.

3.1.2 Siembra de esporas en tubos Eppendorf.

A continuación se detalla los pasos para la siembra de las esporas en los tubos eppendorf:

1. Esterilizar agua destilada.
2. Colocar 1ml de agua destilada en las cajas petri que contienen el hongo.
3. Raspar la superficie con un asa o bisturí estériles.

4. Tomar 1ml del agua con las esporas.
5. Colocar el 1ml en un tubo eppendorf.
6. Codificar los tubos.
7. Guardar los tubos en congelación para su posterior uso, en lo que respecta al recuento del número de esporas/ml y para las pruebas de clarificación en el jugo de manzana.

3.1.3 Conteo del número de esporas en la Cámara de Neubauer.

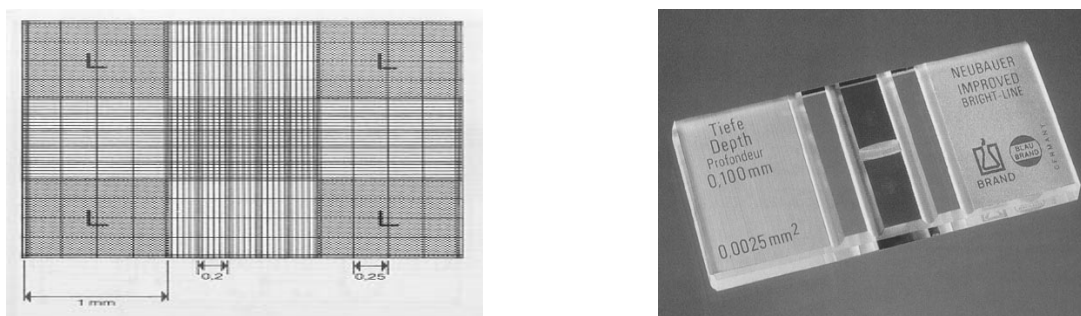
La Cámara de Neubauer es un instrumento utilizado en cultivo celular para realizar conteo de células en un medio de cultivo líquido. Esta cámara de contaje está adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula de dimensiones conocidas. Consta de dos placas de vidrio, entre las cuales se puede alojar un volumen conocido de líquido. Para contar las células de un cultivo líquido, se agrega una gota de este entre estas dos placas y observar al microscopio óptico la cantidad de células presentes en un campo determinado de la grilla. (Reina, 2003).

Conteo: Lleve la cámara al microscopio y enfoque el cuadro de conteo con el ocular de 4X. Las células se cuentan cuadro por cuadro y se hace un total. Se recomienda realizar el conteo siguiendo las flechas para evitar que se cuenten las células dos veces o que no se cuenten. Alrededor de cada cuadrícula se observa que hay tres líneas que delimitan el cuadro, que son fundamentales en el momento del conteo ya que definen cuales células son contables o cuales están fuera del campo de conteo. Las células que no tocan la segunda línea son contables, si la tocan o están encima de ella no se incluyen.

Después de contar las células se procede a calcular el número de células por unidad de volumen, en las cuales estas esporas fueron cuantificadas a través de la cámara Neubauer, en la que se cuenta el número de esporas en 5 cuadrantes, divida esta

cantidad para 0.02 mm^3 , y luego multiplicado por 1000 y se obtiene la cantidad total de esporas en 1 ml. (Reina, 2003).

Figura 3.1 Cámara de Neubauer



Fuente: REINA, Manuel. 2003. Técnicas de conteo celular. México. (en línea)

[http://www.ub.es/biocel/wbc/técnicas/contejo celular.htm](http://www.ub.es/biocel/wbc/técnicas/contejo%20celular.htm).

3.1.4 Recuento del número de esporas

Para el recuento del número de esporas se inicia desde las esporas en congelamiento, para lo cual se las descongela minutos antes de ser colocadas en la Cámara de Neubauer. (Ver resultados de recuento en el Anexo 2).

3.1.5 Inoculación e incubación de las esporas en el medio de Tutobello y Mill

Para la inoculación de esporas se utilizó 125 ml del medio Tutobello y Mill en el cual se inoculó cuatro muestras que contenían 8×10^6 esporas en cada erlenmeyer. La incubación se realizó a 35°C en baño maría por 3 días con una agitación constante automática a una velocidad de 150 rpm.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

3.2.1 Materiales y Métodos

Los materiales utilizados en la determinación de la actividad enzimática se detallan a continuación:

- Matraz Erlenmeyer.
- Tubos Eppendorf.
- Asa Estéril.
- Bisturí Esteril.
- Cámara de Neubauer.
- Estufa.
- Baño maria.
- Embudos.
- Soporte para Embudos.
- Vasos de precipitación: 100ml y 250ml.
- Centrifuga.

3.2.2 Metodología para la Determinación de la Actividad Enzimática en el Jugo de Manzana

Para la determinación de actividad enzimática en el jugo de manzana, se inicio desde la elaboración del jugo de manzana de la variedad flor de mayo, ya que es un tipo de manzana propia para jugos, el mismo que fue elaborado en el laboratorio de alimentos de la universidad del Azuay. Además se elaboró según los requisitos y las especificaciones de acuerdo a la norma INEN para jugos. (Ver norma en Anexo 3).

3.2.2.1 Inoculación de las esporas de *aspergillus niger* en el jugo de manzana

Se realizaron varias pruebas de inoculación para verificar el tiempo de actuación de la enzima en la clarificación del jugo. Para lo cual se inoculó en 100 ml de jugo de manzana 8×10^6 esporas, en la cual fue necesario que se inoculara la enzima a la misma temperatura que la del jugo es decir en este caso a 37°C para tener resultados favorables, se coloca la muestra en la estufa y se la mantiene en constante revisión en cuanto a variación del color y aspecto del jugo, en este caso se obtuvo buenos resultados ya que la muestra clarificó en 120 minutos (2 horas). Luego se procede a filtrar la muestra para ver la clarificación notable de la misma.

Se realizó específicamente 12 pruebas de inoculación con 12 muestras de jugo que generalmente cada uno contenía de 80 ml a 100 ml de jugo de manzana (flor de mayo), el número de muestras realizadas se debe a un diseño experimental que va de acuerdo al número de variables obtenidas en estudio (pH, temperatura, °brix, cantidad de inóculo) y para verificación del tiempo de actuación de la enzima en cada muestra. (Ver tabla de resultados del tiempo de actuación de enzima Anexo 4).

3.2.3 Elaboración del jugo de Manzana

Para la elaboración del jugo de manzana se utilizó la variedad flor de mayo, en la que se realizó una prueba con los siguientes datos: peso inicial de la fruta: 624,8 gr y un peso de agua para escaldado de: 312,4 gr. Se obtuvo en general 700 cc de pulpa de los cuales fueron filtrados en un tamiz fino para retener el residuo de la cascara de manzana, obteniéndose un total de 500 cc de jugo, ya que se tomó 300 cc de pulpa filtrada y 200 cc de agua; siendo esta una cantidad razonable para la preparación del jugo y luego utilizarla en cada uno de los experimentos.

En esta práctica se tomaron datos iniciales de acidez: 0,053 % ; de donde el volumen del titulante es: 0,8; miliequivalente del ácido cítrico: 0,067; normalidad del titulante 0,1; si aplicamos la fórmula para la acidez . % acidez = $\frac{VT \times meq \text{ ácido} \times NT}{x} \times 100$

10

Estos datos se utilizaron en el desarrollo del experimento 1, de donde este requiere un pH de 3,3; brix de 8; a una temperatura de incubación de 23°C. Inicialmente se obtuvo los siguientes valores en el jugo brix: 5,6 ; pH: 4,42 ; acidez 0,053%. Para lo cual se calculó valores de densidad de la bebida, la masa, esto con la finalidad de regular los grados °brix de la bebida y ajustar el pH hasta obtener los valores que requiere la misma, todo esto mediante formulación.

A continuación se describen las fórmulas utilizadas en la regulación de la bebida:

$$f = \frac{267}{(267 - Bf)}$$

De donde:

f = densidad.

267 = constante.

Bf = Brix Final.

$$M = f \times V$$

De donde:

M = masa.

f = densidad.

V = volumen.

$$Y_s = m (A-B)/(100-A).$$

De donde:

Y_s = Para subir ° Brix.

M = masa.

A = ° Brix Final.

B = ° Brix inicial.

100 = constante.

Para ajustar la acidez en la bebida, se toma 1gr de ácido cítrico como referencia y luego poco a poco se coloca el ácido en el jugo y la cantidad que sobra se pesa para ver exactamente la cantidad utilizada, en este caso: $1\text{gr} - 0,94\text{gr} = 0,06\text{gr}$ de ácido utilizados en la regulación de la bebida.

Como son 12 experimentos que se hicieron se realizó una tabla en la que describe los valores iniciales y finales para cada uno de los experimentos.(Ver Anexo 5) y las cantidades de azúcar, ácido, volumen del jugo utilizados para su regulación. (Anexo 6).

Los experimentos 9,10,11,12 son las replicas realizadas de los experimentos, por lo que sus valores en cuanto a resultados no tienen casi variación alguna y en la parte experimental estos son realizados de manera discontinua, es decir no necesariamente se los hace de acuerdo a su numeración exacta sino se los realiza al azar y de allí se toman sus datos.

3.3 APLICACIONES EN LA INDUSTRIA DEL ASPERGILLUS NIGER Y PECTINASAS

Las pectinasas son las enzimas de aplicación industrial más antiguas, se las utilizaban en la fabricación de zumos de frutas, desde entonces su uso ha ido incrementando, siendo

una práctica habitual en la actualidad la utilización de pectinasas en la industria alimentaria de zumos. Desde el punto de vista de su aplicación, las pectinasas pueden clasificarse principalmente en dos grandes tipos: pectinasas ácidas y pectinasas alcalinas.

3.3.1 Pectinasas Ácidas

Son las enzimas pécticas utilizadas en la industria de zumos de fruta y en la fabricación de vinos. Son mayoritariamente poligalacturonasas de origen fúngico, especialmente de *Aspergillus niger*.

3.3.1.1 Producción de zumos

La pectina se encuentra como componente estructural de la fruta y de la verdura, en la fruta verde la pectina ayuda a mantener la dureza de la misma ya que en este estado permanece insoluble. Durante el proceso de maduración la pectina es degradada por pectinasas endógenas de la planta haciendo que la fruta se ablande. En el procesado de frutas para obtener zumos, la adición de pectinasas, así como de mezclas enzimáticas, mejora la extracción del zumo, color, aroma y sabor, suplementando la acción de las enzimas endógenas de la fruta. De esta forma se reduce el tiempo necesario para la filtración y la clarificación del zumo, así como se aumenta el rendimiento en la extracción de éste.

Las principales aplicaciones de las pectinasas en el procesado de frutas y verduras son:

Clarificación de los zumos.- La clarificación consiste en la separación del zumo

de los fragmentos vegetales y partículas insolubles de piel y semillas en suspensión. Las pectinasas rompen la pectina contenida en estas partículas, de modo que disminuye la viscosidad y la floculación de las micelas, mejorando su separación del zumo por sedimentación o filtración. En el caso de zumos espumosos claros (manzana, uva) la aplicación de pectinasas produce una mejora en la clarificación, mientras que en el caso de zumos turbios (cítricos, tomates, néctares) la adición de pectinasas estabiliza la turbidez del zumo.

Extracción de zumos.- La disminución en la viscosidad de las pulpas por el tratamiento con pectinasas aumenta simultáneamente el rendimiento en la extracción de zumo. Este hecho tiene especial relevancia en algunas frutas tales como bayas y manzanas, cuyas pulpas son con frecuencia viscosas y semisólidas tras el prensado, y de difícil extracción de su parte soluble.

Producción de concentrados.- Los zumos de fruta concentrados son importantes comercialmente debido a que tienen un período de conservación más largo ya que presentan costes de almacenamiento y transporte disminuidos. La despolimerización de la pectina evita la gelificación de los zumos durante su concentración o almacenaje.

3.3.1.2 Producción de vinos

De modo similar a la aplicación de pectinasas en la producción de zumos, la utilización de estas enzimas reduce los costes y mejora el proceso de vinificación. La adición de pectinasas puede realizarse en la etapa de prensado de las uvas, facilitando dicho proceso y la extracción del mosto, o sobre el vino, para facilitar su clarificación.

Este proceso puede realizarse por la adición combinada de pectinasas, hemicelulasas y proteinasas, como alternativa a la clarificación natural, que puede durar varios meses y requiere dióxido de azufre. Las pectinasas también pueden potenciar la liberación de antocianinas, de importancia en los vinos tintos.

3.3.2 Pectinasas Alcalinas

Desde hace unos años las pectinasas alcalinas se han introducido en diversos procesos industriales, como el textil, principalmente en el enriado de lino y en el procesado de fibras de plantas. Las enzimas que se utilizan en estos sectores proceden mayoritariamente de bacterias, destacando entre ellos las producidas por *Bacillus*. Con el aumento del conocimiento de los mecanismos de degradación microbiana de la pectina,

las pectinasas alcalinas se están abriendo camino en otros procesos biotecnológicos, como la purificación de virus de plantas, y la fabricación de papel, aunque en la mayoría de los mismos todavía no han sido comercializadas.

(Soriano, 2004).

CAPITULO IV

DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1 GENERALIDADES DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

En el campo de la industria es frecuente hacer experimentos o pruebas con la intención de resolver un problema o comprobar una idea (conjetura, hipótesis); por ejemplo, hacer algunos cambios en los materiales, métodos o condiciones de operación de un proceso, probar varias temperaturas en una máquina hasta encontrar la que da el mejor resultado o crear un nuevo material con la intención de lograr mejoras o eliminar algún problema.

El diseño de experimentos consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas, y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras. Algunos problemas típicos que pueden resolverse con el diseño y el análisis de experimentos son los siguientes:

1. Comparar a dos o más materiales con el fin de elegir al que mejor cumple los requerimientos.
2. Comparar varios instrumentos de medición para verificar si trabajan con la misma precisión y exactitud.
3. Determinar los factores de un proceso que tienen impacto sobre una o más características del producto final.

4. Encontrar las condiciones de operación (temperatura, velocidad, humedad, por ejemplo) donde se reduzcan los defectos o se logre un mejor desempeño del proceso.
5. Reducir el tiempo de ciclo del proceso.
6. Hacer el proceso insensible o robusto a oscilaciones de variables ambientales
7. Apoyar el diseño o rediseño de nuevos productos o procesos.
8. Ayudar a conocer y caracterizar nuevos materiales.

El diseño de experimentos consiste en planear y realizar un conjunto de pruebas con el objetivo de generar datos que al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas por el experimentador sobre determinada situación.

4.1.1 Definiciones básicas en el diseño de experimentos

El diseño de experimentos es la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso, por medio de pruebas planeadas adecuadamente. Esta metodología se ha ido consolidando como un conjunto de técnicas estadísticas y de ingeniería, que permiten entender mejor situaciones complejas de relación causa-efecto.

Experimento.- es un cambio en las condiciones de operación de un sistema o proceso, que se hace con el objetivo de medir el efecto del cambio sobre una o varias propiedades del producto o resultado.

Unidad Experimental.- es la pieza o muestra que se utiliza para generar un valor que sea representativo del resultado del experimento o prueba.

4.2 FACTORES

4.2.1 Factores Controlables.- Son variables de proceso o características de los materiales experimentales que se pueden fijar en un nivel dado. Algunos factores o características que generalmente se controlan son: temperatura, tiempo de residencia, cantidad de cierto reactivo, tipo de reactivo, método de operación, velocidad, presión, etc. A los factores controlables también se les llama variables de entrada, condiciones de proceso, variables de diseño, parámetros del proceso, las x de un proceso o simplemente factores.

4.2.2 Factores no Controlables.- Son variables o características de materiales y métodos que no se pueden controlar durante el experimento o la operación normal del proceso. Algunos factores que suelen ser no controlables son las variables ambientales (luz, humedad, partículas, ruido, etc), el ánimo de los operadores, la calidad del material que se recibe del proveedor.

4.2.3 Factores Estudiados.- Son las variables que se investigan en el experimento, respecto de cómo influyen o afectan a las variables de respuesta. Los factores estudiados pueden ser controlables o no controlables. Para que un factor pueda ser estudiado es necesario que durante el experimento se haya probado en, al menos, dos niveles o condiciones. (Gutierrez y Salazar, 2008).

4.3 ESCALADO DE LAS VARIABLES

EL escalado de las variables permite una mayor facilidad de interpretación de los factores, en cuanto a los coeficientes calculados del modelo son directamente correlacionados a la importancia de los factores.

La información obtenida no es influenciada por las unidades de medida con las cuales son expresadas las diferentes variables. (Todeschini, 2006).

4.4 TIPOS DE DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL SCREENING DE LAS VARIABLES

Existen muchos diseños experimentales para estudiar la gran diversidad de problemas o situaciones que ocurren en la práctica. Esta cantidad de diseños hace necesario saber cómo elegir el más adecuado para una situación dada y por ende, es preciso conocer como es que se clasifican los diseños de acuerdo con su objetivo y su alcance.

Los diseños se pueden clasificar como:

- Diseños para comparar dos o más tratamientos.
 - Diseños para estudiar el efecto de varios factores sobre la respuesta.
 - Diseños para determinar el punto óptimo de operación del proceso.
 - Diseños para la optimización de una mezcla.
 - Diseños para hacer el producto o proceso insensible a factores no controlables.
- (Gutierrez y Salazar, 2008).

Los procesos complejos son comúnmente problemas multivariantes, es decir, influenciados por un elevado número de variables que influyen sobre las respuestas experimentales. Las variables más importantes a controlar para obtener un resultado establecido, la estrategia óptima consiste en variar contemporáneamente todas las variables investigadas. Los experimentos deberían ser definidos de tal modo que las variables resulten decorreladas. Un oportuno modelo de la respuesta es usado para evaluar la importancia de las variables: los parámetros del modelo miden la influencia de las variables correspondientes.

4.4.1 Diseño Factorial Completo

Diseño factorial en el cual hay al menos un experimento para cada combinación de los niveles de los factores. Un diseño factorial completo a k factores (variables) estudiados a r niveles contiene r^k experimentos. (Todeschini, 2006).

Figura 4. Construcción de la matriz del diseño factorial completo.

No Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

4.5 ANALISIS DE DATOS

Deberán usarse métodos estadísticos para analizar los datos a fin de que los resultados y las conclusiones sean objetivos y no de carácter apreciativo. Si el experimento se ha diseñado correctamente y si se ha llevado a cabo de acuerdo con el diseño, los métodos estadísticos necesarios no deben ser complicados. Con frecuencia se encuentra que los métodos gráficos simples desempeñan un papel importante en el análisis e interpretación de los datos. Los métodos estadísticos no pueden demostrar que un factor o factores posee un efecto particular, sólo proporcionan pautas generales en cuanto a la confiabilidad y la validez de los resultados. (Montgomery, 2003).

4.6 METODOS DE OPTIMIZACION

La optimización es la búsqueda sistemática de las condiciones de óptimo de un experimento. Los métodos más empleados son: método de la máxima pendiente, método simplex, método de la superficie de respuesta. (Todeschini, 2006).

La optimización Simplex es una estrategia por etapas. Esto significa que los experimentos se realizan uno por uno.

La excepción es la simple a partir de que todos los experimentos se pueden ejecutar en paralelo. Para maximizar el rendimiento en una síntesis química por ejemplo, el primer paso es ejecutar $k+1$ experimentos para obtener la partida simple. El rendimiento en cada esquina de la simple y se analiza en la esquina que muestra el resultado menos deseable reflejado a través de la geométrica del punto medio de las otras esquinas. De esta manera, se obtiene un nuevo simplex. Cuando el rendimiento determina la peor de las tres esquinas se refleja en la misma forma que antes y se obtiene otro nuevo simplex. De esta manera, la optimización continúa hasta que el simple ha girado y la óptima está rodeada. (Torbjorn et al., 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Para la obtención del hongo *Aspergillus niger* se sembró en agares específicos pasas, maní, maíz, anís, clavo de olor y otras especerías, obteniendo mejores resultados con las pasas, donde la flora fúngica normal es este tipo de hongo.
- Las esporas desarrolladas en agar CYA estaban en una cantidad promedio de 3×10^6 esp./ml., en cuanto a las esporas que se desarrollaron en agar G25N se encontraron en una cantidad de 5×10^6 esp./ml. Las esporas de *Aspergillus niger* se aplicaron en un medio que contenía pectina, sacarosa y minerales, se incubó por 5 días a 35 °C y 150 rpm de agitación constante. De esta manera se determinó la capacidad clarificante de la cepa en este medio, lo cual resultó positivo. Posteriormente este hongo servirá, para un nuevo trabajo en ensayo, para la obtención de enzimas clarificantes de jugos.
- En lo que respecta al diseño experimental se realizó una hoja de Excel, donde se presentan los resultados de los 12 experimentos. La variable respuesta es el tiempo tomado durante la actuación de la enzima en la clarificación del jugo. Los datos se presentan a continuación:

Figura 5. Resultado del diseño experimental.

Exp	I	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3	Tiempo
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	160
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	180
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	135
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	165
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	150
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	172
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	120
8	1	1	1	1	1	1	1	1	128
R1		0	0	0	0	0	0	0	186
R2		0	0	0	0	0	0	0	186
R3		0	0	0	0	0	0	0	190
R4		0	0	0	0	0	0	0	190
Coef	b0	b1	b2	b3	b12	b13	b23	b123	
	151,25	10	-14,25	-8,75	-0,5	-2,5	-4,25	-3	

Los resultados obtenidos en el desarrollo del diseño experimental permiten establecer la ecuación del modelo experimental:

$$Y = 151,25 + 10X_1 - 14,25X_2 - 8,75X_3;$$

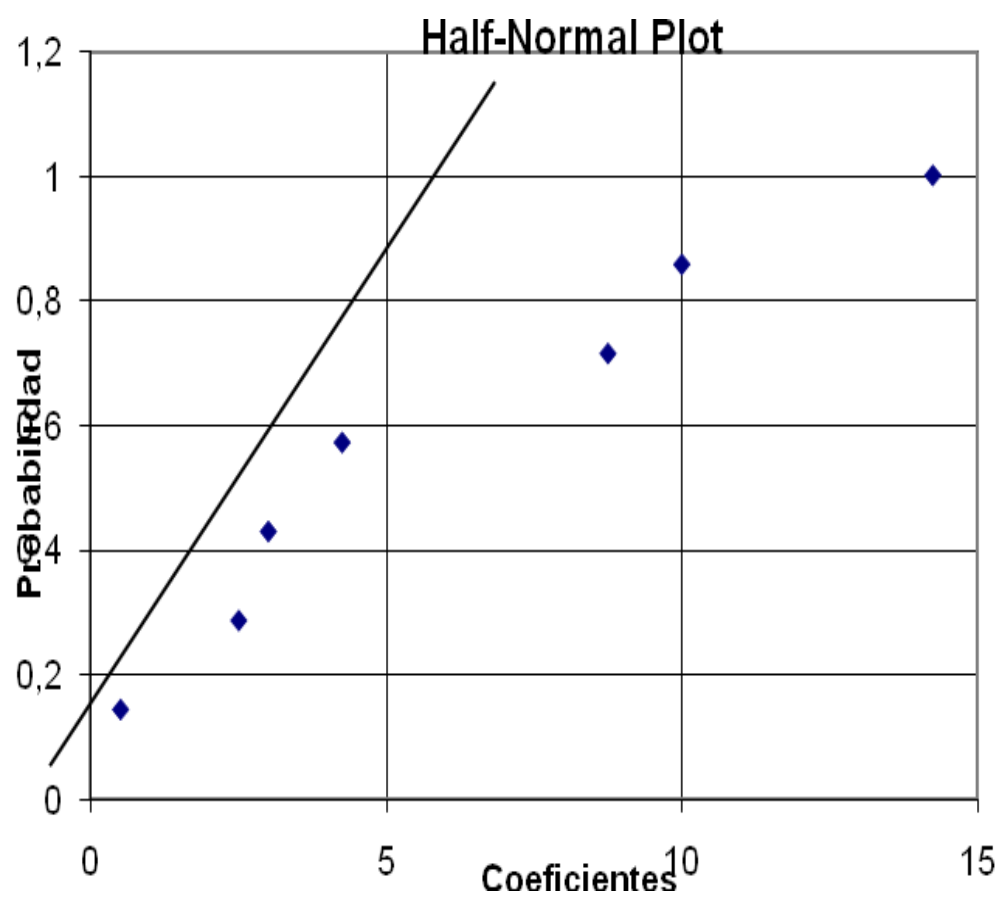
De donde:

$X_1 = \text{pH}$.

$X_2 = \text{Temperatura}$

$X_3 = \text{°Brix}$

Debido a que en el modelo existen coeficientes positivos y negativos, es necesario evaluar el papel probabilístico medio normal (half normal) para tener una mejor perspectiva del efecto de las variables en el modelo. Por este motivo se desarrolló un half-normal plot, cuyos resultados se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Half Normal Plot.

Cuadro 2. Coeficientes y probabilidades

	Coef	Prob
b12	0,5	0,1429
b13	2,5	0,2857
b123	3	0,4286
b23	4,25	0,5714
b3	8,75	0,7143
b1	10	0,8571
b2	14,25	1

Según este cuadro, el efecto que influye mayoritariamente en el modelo es la temperatura, seguido del pH y grados Brix. Una combinación de variables que tiene un efecto significativo es el efecto combinado de temperatura y grados Brix.

Se realizó la Optimización del modelo, mediante el método simplex. Para la optimización con tres variables se partió con un diseño 2^{3-1} . Los resultados obtenidos se presentan en el siguiente cuadro:

# Experimento	pH	Temperatura (°C)	° Brix	Tiempo (minutos)
1	3,3	23	12	141
2	4	23	8	146
3	3,3	37	8	128
4	4	37	12	123

En esta optimización no se obtuvieron tiempos inferiores al valor obtenido en el experimento No 7 (ver anexo 4). En este experimento se obtuvo el tiempo mínimo de clarificación, según las condiciones del diseño experimental original. Al no haber mejorado el tiempo mínimo se considera que las condiciones óptimas para la clarificación son las descritas para el experimento 7.

Se realizó un nuevo simplex, en donde se presentan las condiciones en las que se realizó el experimento y su tiempo tomado; el cual tampoco es un valor inferior al obtenido en el experimento 7.

Nº experimento	pH	Temperatura °C	°Brix	Tiempo (minutos)
1	3,65	30	8	138

De donde se utilizó las siguientes formulas:

Centroide:

$$\frac{X_2+X_3}{2} ; \quad \frac{Y_2+Y_3}{2} ; \quad \frac{Z_2+Z_3}{2}$$

$$\frac{4+3,3}{2} = 3,65 ; \quad \frac{23+37}{2} = 30 ; \quad \frac{8+8}{2} = 8$$

$$\frac{(X_2+X_3)}{2} - X_1 ; \quad \frac{(Y_2+Y_3)}{2} - Y_1 ; \quad \frac{(Z_2+Z_3)}{2} - Z_1.$$

$$3,65 - 3,3 = 0,35 \quad 30 - 23 = 7 \quad 12 - 8 = 4.$$

De donde:

X = pH.

Y = Temperatura.

Z = ° Brix.

CONCLUSIONES

- En el desarrollo de este trabajo investigativo, se logró cumplir con los objetivos planteados, como fue aislar el hongo *Aspergillus niger* a partir de sustratos que lo tienen como parte de su flora normal. Se aisló de pasas, en donde se obtuvo en mayor cantidad.
- Para la obtención del hongo se elaboraron diferentes medios de cultivo para su normal desarrollo; utilizándose principalmente Agar G25N, Agar YMG, Agar MEA y eventualmente Agar PDA y Agar Sabouraud; dentro de los cuales los tres primeros permitieron un mejor desarrollo del hongo.
- Para determinar que se trataba del *Aspergillus niger* se realizó microcultivos del hongo y posteriormente se observó el crecimiento fungal con la ayuda del microscopio y se siguió la técnica de identificación del género *Aspergillus* a través de claves de identificación. En estas guías se identificó al hongo por su forma de crecimiento en el medio, diámetro y color.
- Para la comprobación de la actividad enzimática del hongo, se elaboró un jugo de manzana de la variedad (flor de mayo), en el Laboratorio de Alimentos de la Universidad del Azuay; en el que además se realizó un diseño experimental que dependía de tres variables: pH, temperatura, °brix, y la cantidad de inóculo como un valor constante, obteniendo 12 experimentos que tenían como finalidad encontrar el tiempo más favorable de actuación de la enzima en la clarificación del jugo.
- Se realizó 12 experimentos inoculando las esporas del hongo en el jugo de manzana, de los cuales se obtuvo el mejor y menor tiempo de actuación en el experimento 7 siendo así un tiempo de 120 minutos el cual tenía los siguientes parámetros: pH 3.3, temperatura 37°C, °brix 12 y un inóculo de esporas de 8×10^6 esporas/ml; por lo que se puede concluir que estas son las mejores condiciones para la actuación de la enzima en la clarificación del jugo.

BIBLIOGRAFIA

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- ATLAS, Ronald. 2002. Educación, Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Editorial Pearson. Madrid, España.
- BADUI DERGAL , Salvador. 2006. Química de los Alimentos. Editorial Alhambra Mexicana. S.A. México, México.
- CARLILE, Michael. 2001. The Fungi, United Kingdom. Segunda Edición. Editorial Acribia S.A. España.
- DE VRIES, R and VISSER, J.2001. Aspergillus Enzyme Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Editorial Quilmes. México.
- GUTIRREZ PULIDO, Humberto; SALAZAR, Román de la Vara. 2008. Análisis y Diseño de Experimentos. Segunda Edición. Editorial Síntesis. México, México.
- MONTGOMERY, Robert. 2003. Diseño y Análisis de Experimentos. Segunda Edición. Editorial Limusa S.A .México.
- PARK TALARO, K., TALARO, A. 2002. Foundations in Microbiology. Cuarta Edición. Editorial McGraw-Hill. USA.
- PITT, J., HOCKING, A. 1997. Fungi and Food Spoilage. Second edition. Blackie Academic & Professional. Editorial Blume S.A. London.
- TORBJORN,L ; SEIFERT,E ; ABRAMO,L; THELIN,B; NYSTROM,A; PETTERSEN,J; BERGMAN,R. 1998. Experimental design and optimization. Second Edition. Editorial Limusa S.A. México.

- UNL-INIA. 1998. Guías Prácticas, Hongos Productores de Micotoxinas Contaminantes en Alimentos; Géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Quito.
- VACLAVIK Vickie, A. 1998. Fundamentos de Ciencia de los Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

REFERENCIAS ELECTRONICAS:

- ABARCA, Lourdes. 2000. Taxonomía e Identificación de Especies Implicadas en la Aspergilosis Nosocomial. Departamento de Microbiología. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
(en línea) <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/579584-pdf>.
- BRAUN, Richard, BENNETT, David. 2004. Biotecnología en Alimentos y Bebidas. Federación Europea de Biotecnología, Grupo de Trabajo sobre las Percepciones Públicas de la Biotecnología. Barcelona. (en línea) <http://efbweb.org/ppb>, 2010-04-19.
- CABEZA, M, BACA, F, MUÑOZ, E, MORATA, V. 2007. Microorganismos productores de pectinasas activas a bajas temperaturas para vinificación. Perú.
(en línea) <http://www.enrb.ipn.mx/cibia/TomoIII/Iii-06.pdf> . 2010-01-14.
- DA SILVA, Carlos , et al. 2004. Concentración de Pectinasas por Ultrafiltración con Membranas de Polisulfonas. Revista Iberoamericana de Polímeros. Instituto de Biotecnología. Universidad de Caxias-Brasil. Departamento de Física y Química. (en línea) <http://www.ehu.es/reviberpo/pdf/DIC04/Silva.pdf>. 2009-12-17.
- MONTES, M, Magaña, 2002. Enzimas con Aplicación Industrial. Avance y Perspectiva. Vol. 21. Buenos Aires. (en línea).

<http://www.cinvestav.mx/Portals/O/Publicaciones%20y%20Noticias/Revistas/Avance%20y%20perspectiva/sepoct02/5%20HORCASITAS.pdf>. 2009-11-26.

- ROUSSOS, S, Perraud-Gaime, 2000. Fisiología y Bioquímica de Microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. México. (en línea) <http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins-textes/pleins-textes-6/b-fdi-45-46/010006834.pdf>. 2010-01-16.
- SORIANO, Margarita 2004. Análisis de Sistemas Pectinolíticos Bacterianos. Aislamiento y Caracterización de las Pectinasas, PeIA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. Tesis Doctoral, Barcelona, España. (en línea) <http://biblioteca.universia.net/ficha.do?id=232981>. 2009-12-03.
- VALLEJO, et, al.2003. Purificación y Caracterización Bioquímica de una Pectinasa Alcalina de *Bacillus popilliae*. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Estados Unidos. (en línea) <http://www.slideshare.net/cultivo da bactria-bacillus-megaterium.htm> 2010-01-12.
- VILLENA, Gretty, y GUTIERREZ Marcel. 2003. Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: Algunos aspectos estructurales y fisiológicos. Rev. Peru. (en línea) <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/v10-n1/bio-asper.htm>. 2010-02-24
- YEGRES, Sorana, et, al. 2001. Producción de Enzimas Pécticas. Ensayos Preliminares, Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente- Venezuela. (en línea) <http://bibliotecadigital.udo.edu.ve/revistasaber/PDF/SABER/-VOL13-N-1/PRODUCCION-DE-ENZIMA-13-1.pdf>. 2009-12-09

ANEXOS

ANEXO 1: COMPOSICIÓN DE CADA MEDIO DE CULTIVO EN G/1L

- Agar Extracto de Malta, Levadura y Glucosa (YMG).

Componente	g/1L.
Extracto de Malta	10 g
Glucosa	10 g
Extracto de Levadura	4 g
Agar - Agar	20,6 g
Agua Destilada	1L.

- Agar Extracto de levadura Czapeck (CYA).

Componente	g/1L.
K ₂ PO ₄	1 g
Czapeck Concentrado	10 ml
Trazas de metales (solución)	1 ml
Extracto de Levadura	5 g
Sucrosa o Sacarosa	30 g
Agar - Agar	15 g
Agua Destilada	1 L.

Composición del Czapeck Concentrado

Componente	g/1L.
NaNO ₃	300 g
KCl	50 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	50 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g
Agua Destilada	1 L.

Composición Trazas de Metales

Componente	g/1L.
CuSO ₄ .5H ₂ O	5 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10 g
Agua Destilada	1 L.

➤ Agar Glicerol Nitrato (G25N).

Componente	g/1L.
K ₂ HPO ₄	1 g
Czapeck Concentrado	10 ml.
Extracto de Levadura	4,93 g.
Glicerol	333,3 g
Agar - Agar	16 g
Agua Destilada	1 L

➤ Agar Czapek Extracto de Levadura Sacarosa 20% (CY20S).

Componente	g/1L.
Sacarosa	200 g
Extracto de Levadura	5 g
NaNO ₃	3 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Agar - Agar	20 g
Agua Destilada	1 L.

➤ Agar Papa Dextrosa (PDA).

Componente	g/1L.
PDA	39 g
Agua Destilada	1L.

➤ Agar Sabouraud 4%.

Componente	g/1L
Agar Sabouraud 4%	65 g
Agua Destilada	1 L.

ANEXO 2: TABLA DE RESULTADOS DEL RECuento DEL NÚMERO DE ESPORAS EN LA CÁMARA DE NEUBAUER

Medio de Cultivo	# de Muestra	# de Esporas
G25N	1	8×10^6
G25N	2	7×10^6
YMG	3	6×10^6
G25N	4	9×10^6
CYA	5	3×10^6
G25N	6	5×10^6
CYA	7	7×10^6
CYA	8	8×10^6
G25N	9	8×10^6
CYA	10	7×10^6
CYA	11	5×10^6
CYA	12	7×10^6
G25N	13	6×10^6
G25N	14	5×10^6
G25N	15	1×10^7
CYA	16	1×10^7
CYA	17	8×10^6

G25N	18	7×10^6
CYA	19	9×10^6
CYA	20	8×10^6

ANEXO 3: COPIA DE NORMA INEN 436. JUGO DE MANZANA.**REQUISITOS. (5 hojas).**

INEN		
Norma Ecuatoriana	JUGO DE MANZANA REQUISITOS	AL 02.03-405 INEN 436 1979-07
OBLIGATORIA		
1. OBJETO		
1.1 Esta norma establece los requisitos que debe cumplir el jugo de manzana envasado y conservado.		
2. TERMINOLOGIA		
2.1 <i>Jugo fresco de manzana.</i> Es el producto obtenido de la expresión de manzanas (frutos de <i>Pyrus malus</i>) frescas, sanas y maduras. 2.2 <i>Jugo natural de manzana.</i> Es el jugo fresco de manzana sin fermentar, concentrar ni diluir y que ha sido sometido a un procedimiento tecnológico adecuado, que asegura su conservación en envases herméticos. 2.3 <i>Jugo de manzana.</i> Es el jugo fresco de manzana, con el agregado de aditivos permitidos, que ha sido sometido a un procedimiento tecnológico adecuado, que asegura su conservación en envases herméticos.		
3. DISPOSICIONES GENERALES		
3.1 El jugo debe ser extraído, bajo condiciones sanitarias apropiadas, de manzanas maduras, sanas y frescas, cuidadosamente lavadas y prácticamente exentas de residuos de plaguicidas u otras sustancias tóxicas, de acuerdo a los límites de tolerancia vigentes. 3.2 El jugo podrá llevar en suspensión parte de la pulpa del fruto finamente dividida, pero debe estar exento de fragmentos de cáscara, semillas, sustancias gruesas y duras y partículas negras. 3.3 No se permitirá la adición de colorantes ni de otras sustancias que produzcan deterioro, disminuyan la calidad del producto, modifiquen la naturaleza del jugo o den mayor valor que el real. Se podrá agregar ácido ascórbico, azúcar refinado y ácido cítrico, para ajustar la relación de sólidos solubles y acidez titulable a los límites establecidos en 4.2.3.		
4. REQUISITOS DEL PRODUCTO		
4.1 Requisitos generales. 4.1.1 <i>Aspecto.</i> Debe ser uniforme, pudiendo presentar un ligero sedimento. 4.1.2 <i>Color.</i> Debe ser característico y semejante al del jugo fresco de manzana, pudiendo variar desde un tono claro a uno ligeramente ámbar. 4.1.3 <i>Olor.</i> Debe ser aromático, distintivo y semejante al del jugo fresco de manzana. 4.1.4 <i>Sabor.</i> Debe ser característico, semejante al del jugo fresco de manzana, pudiendo tolerarse una ligera astringencia y no admitiéndose ningún sabor extraño u objetable.		
(Continúa)		

INEN 436

1979-07

4.2 Especificaciones.

4.2.1 El jugo de manzana, ensayado de acuerdo a las normas ecuatorianas correspondientes, debe cumplir con las especificaciones establecidas en la Tabla 1.

TABLA 1. Especificaciones del jugo de manzana.

REQUISITOS	UNIDAD	Mín.	Máx.	METODO DE ENSAYO
Alcohol etílico	°/o V	—	0,4	INEN 379
Sólidos solubles (b)	°/o	11	—	INEN 380
Acidez titulable (a)	g/100 cm ³	0,3	0,7	INEN 381
pH	—	3,3	4,0	INEN 389
Densidad relativa a 20°/20°C	—	1,044	—	INEN 391
Arsénico	mg/kg	—	0,2	INEN 269
Cobre	mg/kg	—	5	INEN 270
Plomo	mg/kg	—	0,3	INEN 271
Estaño	mg/kg	—	150	INEN 385

a) Expresada como ácido málico anhidro
b) En grados Brix a 20°C.

4.2.2 El jugo de manzana debe estar exento de bacterias patógenas, toxinas y de cualquier otro microorganismo causante de la descomposición del producto. Se podrá admitir la presencia de mohos hasta un máximo de 10°/o de campos positivos sobre el total de campos (ver INEN 386).

4.2.3 La relación entre sólidos solubles y acidez titulable debe tener un valor máximo de 40 y mínimo de 15,5.

4.3 Otros requisitos.

4.3.1 Las conservas de jugo de manzana envasadas en recipientes metálicos no deben presentar deformación permanente en los fondos.

4.3.2 El vacío referido a la presión atmosférica normal, medido a 20°C, no debe ser menos de 420 hPa (320 mm Hg) en los envases de vidrio, ni menor de 320 hPa (250 mm Hg) en los envases de hojalata (ver INEN 392).

4.3.3 El espacio libre tendrá como valor máximo el 10°/o de la capacidad total del envase (ver INEN 394).

5. REQUISITOS COMPLEMENTARIOS

5.1 Envasado.

5.1.1 El jugo de manzana debe conservarse en un envase cuyo material sea resistente a la acción del producto y no altere las características del mismo.

(Continúa)

INEN 436

1979-07

5.1.2 El envase debe presentar un aspecto normal, y su forma y dimensiones deben estar de acuerdo con lo establecido en la Norma INEN 190.

5.1.3 En cada envase debe marcarse en forma indeleble un código que identifique al fabricante y el lote y señale la fecha de fabricación.

5.1.4 Los envases deben estar completamente limpios antes del llenado.

5.2 Rotulado.

5.2.1 En todos los envases deben constar, con caracteres legibles e indelebles, las indicaciones siguientes:

- a) nombre y marca del fabricante,
- b) denominación del producto: "Jugo de manzana",
- c) masa neta, en gramos,
- d) condiciones de conservación, si es el caso,
- e) aditivos utilizados,
- f) número de Registro Sanitario,
- g) lugar de fabricación.

5.2.2 No debe tener leyendas de significado ambiguo, ni descripción de características del producto que no puedan ser comprobadas.

6. MUESTREO

6.1 El muestreo debe realizarse de acuerdo con la Norma INEN 378.

(Continúa)

APENDICE Z

Z.1 NORMAS A CONSULTAR

- INEN 378 *Conservas vegetales. Muestreo.*
- INEN 379 *Conservas vegetales. Determinación de alcohol etílico.*
- INEN 380 *Conservas vegetales. Determinación de sólidos solubles.*
- INEN 381 *Conservas vegetales. Determinación de acidez titulable.*
- INEN 269 *Conservas vegetales. Determinación del contenido de arsénico.*
- INEN 384 *Conservas vegetales. Determinación del ácido ascórbico.*
- INEN 386 *Conservas vegetales. Ensayos microbiológicos. Mohos.*
- INEN 270 *Conservas vegetales. Determinación del contenido de cobre.*
- INEN 271 *Conservas vegetales. Determinación del contenido de plomo.*
- INEN 389 *Conservas vegetales. Determinación de la concentración de ion hidrógeno (pH).*
- INEN 391 *Conservas vegetales. Jugos de frutas. Determinación de la densidad relativa.*
- INEN 392 *Conservas vegetales. Determinación del vacío.*
- INEN 394 *Conservas vegetales. Determinación del volumen ocupado por el producto.*
- INEN 190 *Envases metálicos para conservas alimenticias. Requisitos.*

Z.2 NORMAS PUBLICADAS SOBRE EL TEMA

- INEN 432 *Jugo de piña. Requisitos.*
- INEN 433 *Jugo de tomate. Requisitos.*
- INEN 434 *Jugo de toronja. Requisitos.*
- INEN 435 *Jugo de limón. Requisitos.*
- INEN 437 *Jugo de naranja. Requisitos.*
- INEN 382 *Conservas vegetales. Determinación del extracto seco.*
- INEN 383 *Conservas vegetales. Determinación de cloruros.*
- INEN 385 *Conservas vegetales. Determinación del estaño.*
- INEN 387 *Conservas vegetales. Determinación del contenido de aceite esencial.*
- INEN 388 *Conservas vegetales. Determinación de sólidos en suspensión.*
- INEN 390 *Conservas vegetales. Determinación del contenido de sólidos insolubles en agua.*
- INEN 393 *Conservas vegetales. Determinación de la masa neta.*

Z.3 BASES DE ESTUDIO

Proyecto 1C de Recomendación COPANT 7:3-008. *Jugo de manzana*. Comisión Panamericana de Normas Técnicas. Buenos Aires, 1972.

Norma Alimentaria FAO/OMS CAC/RS 48.1972. *Norma Internacional recomendada para el jugo de manzana, conservado por medios físicos exclusivamente*. Programa Conjunto FAO/OMS Sobre normas alimentarias. Roma, 1972.

Norma Centroamericana ICAITI 34 012. *Jugo de manzana*. Instituto Centroamericano de Investigaciones y Tecnología Industrial. Guatemala, 1966.

Norma Española UNE 34 020 h1. *Jugo de manzana natural*. Instituto Nacional de Racionalización del Trabajo. Madrid, 1963.

INEN 436

1979-07

INFORMACION COMPLEMENTARIA

La Norma INEN 436 fue estudiada por el Comité Técnico AL 02.03, *Jugas*, y aprobada por éste en 1975-07-21.

Formaron parte del Comité Técnico las siguientes personas:

INTEGRANTE:

Dr. Felipe Moscoso
Ing. Neptalí Villaciñ
Ing. Juan Serrano
Dra. Elena A. de Cárdenas
Dr. César Troncoso
Sr. Luis Cando
Ing. Manuel Romo-Leroux
Ing. Carlos Guzmán
Ing. Jorge Vera

Ing. Idelfonso Bohórques

Ing. Reinaldo Caamaño

Ing. Eduardo Vega
Dra. Leonor Orozco

ORGANIZACION REPRESENTADA:

LOS ANDES
DIRECCION DE DESARROLLO INDUSTRIAL
CENDES
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE
MINISTERIO DE SALUD
CONSERVERA YUCATAY
UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO
CORPORACION FINANCIERA NACIONAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES TECNOLOGICAS.
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES TECNOLOGICAS.
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA.
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
INEN
INEN

La Norma en referencia fue sometida a Consulta Pública de 1973-10-20 a 1973-12-12 y se tomaron en cuenta todas las observaciones recibidas.

La Norma Técnica INEN 436 fue aprobada por el Consejo Directivo del Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN, en sesión de 1979-07-12.

El Sr. Ministro de Industrias, Comercio e Integración autorizó y oficializó esta Norma con el carácter de OBLIGATORIA, mediante Acuerdo No. 1261 de 1979-11-30, publicado en el Registro Oficial No. 89 de 1979-12-19.

ANEXO 4: TABLA DE RESULTADOS DEL TIEMPO DE ACTUACIÓN DE LA ENZIMA

Experimento	pH	Temperatura (°C)	° Brix	Inóculo	Tiempo (minutos)
1	3,3	23	8	7×10^6	160
2	4	23	8	8×10^6	180
3	3,3	37	8	8×10^6	135
4	4	37	8	7×10^6	165
5	3,3	23	12	7×10^6	150
6	4	23	12	6×10^6	172
7	3,3	37	12	8×10^6	120
8	4	37	12	5×10^6	128
9	3,65	30	10	8×10^6	186
10	3,65	30	10	5×10^6	186
11	3,65	30	10	8×10^6	190
12	3,65	30	10	8×10^6	190

ANEXO 5: DATOS INICIALES Y FINALES DE CADA EXPERIMENTO

Nº Experimento	°Brix Inicial	°Brix Final	pH Inicial	pH Final	Temperatura Incubación °C
1	5,6	8	4,42	3,3	23
2	5,7	8	4,87	4	23
3	5,4	8	4,37	3,3	37
4	5,4	8	4,37	4	37
5	5,4	12	4,37	3,3	23
6	5,6	12	4,40	4	23
7	5,6	12	4,42	3,3	37
8	5,4	12	4,37	4	37
9	5,7	10	4,87	3,65	30
10	5,6	10	4,40	3,65	30
11	5,6	10	4,40	3,65	30
12	5,6	10	4,40	3,65	30

**ANEXO 6: CANTIDADES UTILIZADAS EN LA REGULACIÓN DE CADA
BEBIDA DE ACUERDO AL EXPERIMENTO**

N° experimento	inóculo	Densidad	Masa	Volumen jugo(cc)	Ys azúcar (gr)	Ácido utilizado (gr)
1	7×10^6	1,030	82,4	80	2,14	0,08
2	8×10^6	1,030	103	100	2,57	0,06
3	8×10^6	1,030	103	100	2,83	0,05
4	7×10^6	1,030	103	100	2,83	0,03
5	7×10^6	1,047	104,7	100	7,85	0,04
6	6×10^6	1,047	104,7	100	7,61	0,05
7	8×10^6	1,047	83,76	80	6,09	0,03
8	5×10^6	1,047	104,7	100	7,85	0,04
9	8×10^6	1,038	103,8	100	4,95	0,02
10	5×10^6	1,038	103,8	100	5,07	0,08
11	8×10^6	1,038	103,8	100	5,07	0,08
12	8×10^6	1,038	103,8	100	5,07	0,08

**ANEXO 7: CRECIMIENTO DEL *ASPERGILLUS NIGER* EN LOS MEDIOS:
YMG Y G25N**



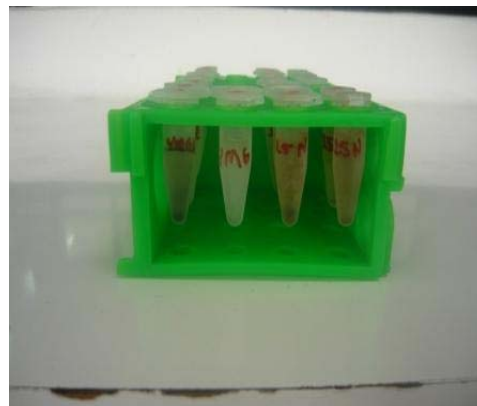
ANEXO 8: *ASPERGILLUS NIGER* VISTO EN EL MICROSCOPIO



ANEXO 9: RECOLECCIÓN DE ESPORAS DEL HONGO EN TUBOS EPENDORF



ANEXO 10: TUBOS QUE MANTIENEN LAS ESPORAS DEL HONGO EN CONGELACION



ANEXO 11: PRUEBAS DE CLARIFICACION EN EL MEDIO DE TUTOBELLO Y MILL



ANEXO 12: MEDIO CLARIFICADO



ANEXO 13: SUSTRATO CLARIFICADO OBTENIDO DESPUÉS DE LA FILTRACIÓN



ANEXO 14: INOCULACIÓN DEL SUSTRATO DE LA ENZIMA EN EL JUGO DE MANZANA



ANEXO 15: JUGO DE MANZANA CLARIFICADO Y PASTEURIZADO

