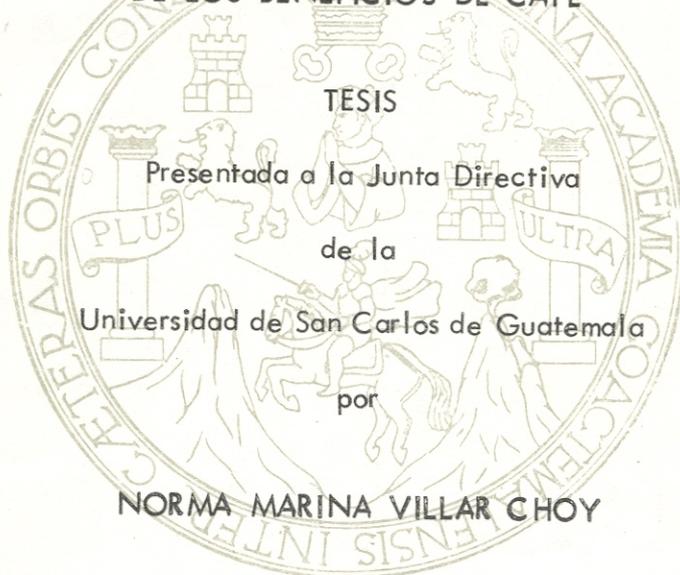


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE INGENIERIA

GUATEMALA, CENTRO AMERICA

RECUPERACION DE LAS ENZIMAS PECTINOLITICAS  
PRESENTES EN LAS AGUAS DE DESHECHO  
DE LOS BENEFICIOS DE CAFE



TESIS

Presentada a la Junta Directiva

de la

Universidad de San Carlos de Guatemala

por

NORMA MARINA VILLAR CHOY

Al conferirsele el título de:

INGENIERO QUIMICO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Biblioteca Central

Guatemala, Noviembre de 1974

BIBLIOTECA CENTRAL-USAC  
DEPOSITO LEGAL  
PROHIBIDO EL PRESTAMO EXTERNO

08  
T(7)

JUNTA DIRECTIVA  
DE LA  
FACULTAD DE INGENIERIA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Decano: Ing. Hugo Quan Má  
Vocal Primero: Ing. Marco Tulio Samayoa B.  
Vocal Segundo: Ing. Rodolfo González M.  
Vocal Tercero: Ing. Leonel Aguilar  
Vocal Cuarto: Br. Jaime E. Klussmann F.  
Vocal Quinto: Br. Edgar de León  
Secretario: Ing. José Luis Terrón C.

TRIBUNAL QUE PRACTICO EL EXAMEN  
GENERAL PRIVADO

Decano: Ing. Hugo Quan Má  
Examinador: Ing. Roberto Barrjos  
Examinador: Ing. Enrique Boppel  
Examinador: Ing. Julio Rivera  
Secretario: Ing. José Luis Terrón C.

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR:

Cumpliendo con lo establecido por la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración mi trabajo de tesis titulado:

RECUPERACION DE LAS ENZIMAS PECTINOLITICAS  
PRESENTES EN LAS AGUAS DE DESHECHO  
DE LOS BENEFICIOS DE CAFE

Tema que me fuera asignado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Ingeniería.

**DEDICATORIA:**

A Dios

A Mis Padres

A Mi Familia y Amigos

**TESIS DE REFERENCIA**  
**NO**  
**SE PUEDE SACAR DE LA BIBLIOTECA**  
**BIBLIOTECA CENTRAL - USAC.**

## RECONOCIMIENTO

Agradezco al Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI) por la ayuda prestada a la realización del presente trabajo, es especial a los Ings. Químicos Enrique Boppel y Juan Francisco Menchú, y a todas las personas que hicieron posible la conclusión del mismo.

## INDICE

	Pag.
1. Sumario	1
2. Introducción	3
2.1 Consideraciones Generales	3
2.2 Fermentación del despulpado	4
2.3 El por qué de utilizar las aguas de deshecho	5
2.4 Clasificación de las sustancias pécticas	5
2.5 Enzimas pectinolíticas	7
2.6 Producción comercial	8
2.7 Clarificación de jugos de frutas	9
3. Métodos de Trabajo	13
4. Resultados y su Discusión	17
4.1 Determinación de las corrientes de deshecho en las que están presentes las enzimas	17
4.2 Purificación de las enzimas	21
4.2.1 Procedimiento general de precipitación	21
4.2.1.1 Centrifugación de las aguas de café a varias velocidades	22
4.2.1.2 Filtración con filtros bacteriológicos Millipore	25
4.2.1.3 Precipitación de las proteínas	26
4.2.1.4 Comparación de las aguas de café de costa y de altura	28
4.2.2 Filtración en gel	33
5. Conclusiones	35
6. Bibliografía	37

## SUMARIO

Se determinó la existencia de las enzimas pectinolíticas: Pectin-esterasa (PE), Poligalacturonasa (PG), Pectin Trans-eliminasa (PTE) en las aguas de deshecho de los beneficios de café.

Se recuperaron y purificaron las enzimas presentes usando métodos a nivel de laboratorio, estableciendo además técnicas de análisis confiables para determinar la actividad de las enzimas encontradas.

## INTRODUCCION

### 2-1 CONSIDERACIONES GENERALES

Las sustancias pécticas están distribuidas universalmente en los tejidos de las plantas<sup>(17)</sup> dónde actúan como materiales de unión entre las células, particularmente en los tejidos de las frutas.

Constituyen, debido a su viscosidad y a que forman un grupo de polisacáridos heterogéneos en los espacios intercelulares de las plantas, un impedimento considerable en la extracción y filtrado de jugos y mostos.

Las enzimas pécticas son sistemas de enzimas no sintetizados por células animales cuya acción principal es la hidrólisis de las sustancias pécticas. Mediante esta acción hidrolítica se transforma a las sustancias pécticas en moléculas más simples y solubles, dando una mejor extracción de materias colorantes y aromáticas y aumentando el volumen total del jugo extraído.

Debido a ello las enzimas pectinolíticas tienen una gran variedad de usos comerciales incluyendo: procesamiento de frutas, clarificación de jugos y vinos; actualmente se investigan nuevas aplicaciones tales como la suavización y preservación de la madera.

Un incremento en la información sobre estas sustancias, podría resolver posteriormente muchos problemas en la

tecnología de alimentos, por lo que uno de los propósitos de este estudio es proveer de una orientación más específica de métodos usados a nivel de laboratorio para la extracción, purificación y análisis de las enzimas pectinolíticas que se encontraron en las aguas de deshecho de la fermentación del café.

Por otro lado con el aprovechamiento comercial de las aguas de deshecho de los beneficios de café, se lograría evitar la contaminación que éstas ocasionan en los ríos e n los cuales desaguan.

## 2-2 FERMENTACION DEL DESPULPADO

La fermentación del café empieza poco tiempo después de cortado el fruto (7) y está afectado por varios factores, como por ejemplo: La incidencia de la luz solar, el volumen de la masa de café y la temperatura. Además mientras mayor cantidad de pulpa por unidad de café despulpado llegue a los tanques de fermentación, llega mayor cantidad de microorganismos, y probablemente mayor proporción de enzimas (21).

El proceso de fermentación empieza por la degradación de la pectina y protopectina, debido a la acción combinada de las enzimas pécticas producidas por microorganismos que se desarrollan en los frutos (5,8) así las levaduras atacan a los azúcares produciendo alcohol etílico, después las bacterias forman ácido acético, láctico, butírico y propiónico, en la parte final de la fermentación.

Algunos autores (24) atribuyen a las enzimas presentes la descomposición de la protopectina y a los microorganismos

mos la degradación de los azúcares del mucílago.

El mucílago es una capa delgada adherida al grano - que constituye un hidrogel (sistema coloidal sólido-líquido) que químicamente se compone de protopectina, pectina, - azúcares y ácidos orgánicos.

### 2-3 EL PORQUE DE UTILIZAR LAS AGUAS DE DESHECHO

El problema de la utilización de los desechos agrícolas ha despertado el interés de muchos investigadores<sup>(23)</sup>, - en las últimas décadas se ha tratado de incrementar la industrialización de los desechos agrícolas e industriales buscando nuevos usos y aplicaciones, para lograr menores - costos en los procesos y evitar la contaminación que éstos pudiesen ocasionar.

Siendo las aguas del lavado del café un deshecho que lleva diluido el mucílago degradado, microorganismos, y probablemente las enzimas causantes de la descomposición de la protopectina, podría ser una fuente de éstas últimas para su posterior utilización industrial.

### 2-4 CLASIFICACION DE LAS SUSTANCIAS PECTICAS

Para una mejor interpretación, en cuanto a la nomenclatura de las sustancias pécticas, ya que existe una gran confusión de términos, nos regiremos por las definiciones dadas por la American Chemical Society<sup>(14)</sup> las cuales se dan a continuación:

## SUSTANCIAS PECTICAS

Se designa así a los carbohidratos, o más exactamente, derivados de los carbohidratos de naturaleza coloidal formados por cadenas de moléculas de ácido galacturónico, unidas por enlaces glucosídicos.

### PROTOPECTINA

Es el nombre dado a las sustancias insolubles en agua que se encuentran en las plantas, las cuáles bajo hidrólisis producen ácidos pectínicos. Algunas teorías exponen que la protopectina consiste en un número de cadenas metilpoligalacturónicas unidas unas a otras y aun más largas que la pectina.

### ACIDOS PECTINICOS

Se designan así a los ácidos poligalacturónicos coloidales que tienen una pequeña proporción de grupos metil éster. Los ácidos pectínicos bajo condiciones aprovechables son capaces de formar geles con azúcares o con ciertos iones.

### PECTINA

Designa a los ácidos pectínicos solubles en agua, de variado contenido de grupos metil éster y variado grado de neutralización, que son capaces de formar geles con azúcares y ácidos.

### ACIDO PECTICO

Se aplica a las sustancias pecticas compuestas es en -

cialmente de grupos metil éster.

## 2-5 ENZIMAS PECTINOLITICAS

La clasificación siguiente reportada por la Comisión Internacional de Nomenclatura de Enzimas<sup>(9)</sup> de acuerdo a cómo afectan a las sustancias sobre las cuales actúan, esto es, si las saponifican o depolimerizan.

### 1) ENZIMAS SAPONIFICANTES

Son Pectín-metil esterases, las cuáles dividen el grupo metil éster del ácido poligalacturónico y se le llaman comúnmente Pectín-Esterasa y se abrevia (PE) de acuerdo a la Comisión Internacional de Nomenclatura de enzimas la PE es Pectín-Pectilhidrolasa cuyo número es 3.1.1.11

### 2) ENZIMAS DEPOLIMERIZANTES

Son glicosidasas con actividades específicas que compete al grado de esterificación del sustrato. Se dividen en:

A) Enzimas que actúan en su mayor parte sobre la pectina

Polimetilgalacturonasa (PMG)

1. Endo PMG 3.2.1.1.4.1

2. Exo PTE

Pectín-trans-eliminasa (PTE)

3. Endo PTE 4.2.2.3

4. Exo PTE

B) Enzimas pécticas que actúan en su mayor parte sobre los ácidos pécticos

## Poligalacturonasas (PG)

5. Endo PG 3.2.1.15

6. Exo PG 3.2.1.40

## Pectin ácido trans-eliminasa (PATE)

7. Endo PATE 4.2.2.1

8. Exo PATE 4.2.2.2

## 2-6 PRODUCCION COMERCIAL

Información relativa a la producción comercial de las enzimas pectinolíticas es bastante escasa, sin embargo, se reportan más frecuentemente enzimas producidas por hongos, que son las que se usan generalmente, como por ejemplo las producidas por los hongos del género *Aspergillus*, reportadas por Reid<sup>(20)</sup>, por Koller<sup>(15)</sup>, Ishin<sup>(12)</sup>, Nyri<sup>(19)</sup>, también las producidas por el *Bussochamys Nivea* reportadas por Yates<sup>(25)</sup> y por el *P. Italium* reportadas por Busch<sup>(3)</sup>. Cada cepa da diferentes preparaciones enzimáticas. Las enzimas así producidas son aprovechadas particularmente para usarse en procesamiento de frutas debido a que actúan a un pH bajo.

Es conveniente, según Fogarty<sup>(11)</sup> incrementar la producción y extracción de diferentes preparaciones enzimáticas e.g. mezclas de pectinesterasas y poligalacturonasas.

Las cantidades relativas de las respectivas enzimas producidas pueden variar considerablemente debido a varios factores tales como: la cepa usada, la composición de los nutrientes, pH, etc. Además es importante que la preparación enzimática pueda utilizarse a temperaturas relativamente altas (entre los 50 y 65°C).

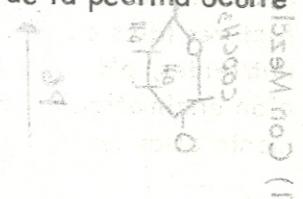
## 2-7 CLARIFICACION DE JUGOS DE FRUTAS

Las enzimas pécticas o pectinolíticas se usan, como se mencionó anteriormente, para desintegrar las pulpas de las frutas y clarificar jugos. Esta práctica fue introducida en Alemania y U.S. (11) en 1930.

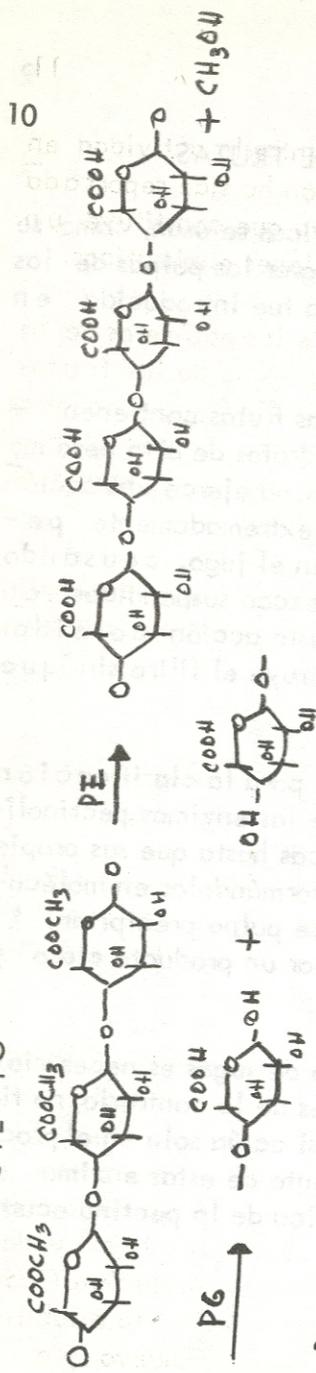
Se mencionó además que todas las frutas contienen pectina, encontrándose como carbohidratos de alto peso molecular. En los jugos de frutas la pectina ejerce una acción coloidal protectora en las partículas extremadamente pequeñas de pulpa, también presentes en el jugo, causando con ello que éstas partículas permanezcan suspendidas en una mezcla turbia. Tan efectiva es ésta acción coloidal que con una filtración normal se obstruye el filtro sin que clarifique el jugo.

La base de la teoría enzimática para la clarificación de los jugos de frutas, estriba en que las enzimas pectinolíticas hidrolizan las sustancias pécticas hasta que sus propiedades coloidales son perdidas, transformándolas en moléculas más simples y así las partículas de pulpa precipitan. El jugo puede entonces filtrarse para dar un producto claro y transparente.

Para una clarificación efectiva de jugos es necesario (10) agregar una mezcla de PE y PG pues de lo contrario, no tiene efecto la clarificación. La PTE si actúa sola en el proceso de clarificación, el comportamiento de estas enzimas se debe a que la degradación enzimática de la pectina ocurre de la siguiente manera:

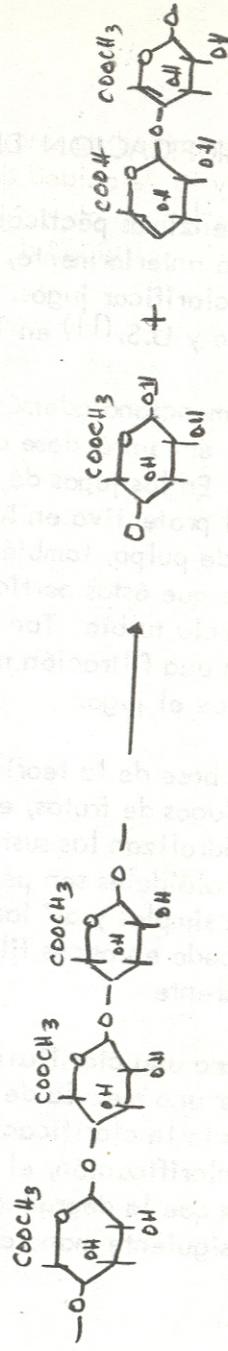


1) Con Mezcla de PE + PG



PECTINA PE → METANOL + ACIDO Poligalactónico PG → ACIDO GALACTURÓNICO

2) Clarificación con Pectintranseliminasa (PTE)



La necesidad de una correlación entre la actividad enzimática y la velocidad de clarificación ha sido reportada por Joslyn<sup>(13)</sup> et. al. y Neubeck<sup>(17)</sup> ya que constituye un índice de la actividad de las preparaciones enzimáticas.

En muchos casos la degradación de los polímeros de la pectina es necesaria antes del procesamiento de las frutas para lograr producir una buena cantidad de jugo, y en otros casos se usan las preparaciones enzimáticas después de haber extraído el jugo, produciendo únicamente una buena clarificación.

Industrialmente se emplean las preparaciones enzimáticas en la producción de jugos de frutas tales como manzana, papaya, piña, uvas y vinos.

## 2-8 BASES TEORICAS DE LA PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO

Se utilizaron varios métodos para la extracción y purificación de las enzimas encontradas en las aguas de deshecho del café, entre estos está la precipitación de las enzimas, mediante la adición de sulfato de amonio.

Este método está basado en los efectos que tiene la adición de sales neutras sobre la solubilidad de las proteínas. A bajas concentraciones de sal se incrementa la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que se conoce como "Salting-in". Es independiente de la naturaleza de la sal neutra, pero es función de la concentración de la sal y del número de cargas de cada especie iónica en solución. Cuando la concentración de las sales se incrementa, la solubilidad de las proteínas comienza a decrecer de nuevo, y a

muy altas concentraciones de sal, la proteína puede ser completamente precipitada, y el efecto es llamado "Salting out".

Alden y Hughes<sup>(2)</sup> explican este comportamiento diciendo que los iones en pequeñas cantidades actúan produciendo en las moléculas de proteína interacciones entre las cargas opuestas e incrementan la solubilidad; sin embargo con altas concentraciones de sal decrece la solubilidad, debido a la deshidratación de la molécula de proteína.

### 3. METODOS DE TRABAJO

Para determinar la actividad de las enzimas presentes en las aguas de café se experimentó con varios métodos dados por la literatura<sup>(1,18)</sup>, entre los cuales se escogieron los siguientes:

#### METODO A

Determinación de la actividad enzimática, basada en la reducción de la viscosidad del sustrato, debida a la acción de la enzima, éste método fue reportado por Barrios<sup>(4)</sup>. Se hicieron modificaciones según conveniencia.

Las condiciones del análisis son:

- a) Mezcla para incubar: 2 ml de muestra enzimática (a)  
50 ml de polipectato de Na 1%  
(El control se hace inactivando la enzima con 1 ml de NaOH 1N).
- b) Incubación: 48 horas a 30°C con agitación (b)
- c) Fin de la reacción: agregar 1 ml de NaOH 1N
- d) La viscosidad se midió con un viscosímetro de Ostwald a 30°C. La relación encontrada se presenta así:

$$1 - \frac{\text{Viscosidad (tiempo) muestra}}{\text{Viscosidad (tiempo) control}}$$

METODO

### METODO B

Este método es una modificación hecha al método A para usarse cuando se ha logrado concentrar la enzima por lo que el tiempo de incubación es menor, ya que la enzima por estar concentrada es más activa y actúa más rápido.

En un tubo de ensayo colocar:

- a) 5.0 ml de polipeptato de Na 1% + 2 ml de una solución amortiguadora con el pH deseado; se incuba esta mezcla durante 5 - 10 minutos para que alcance la temperatura a la que se hará la determinación.
- b) Luego se agregan 0.2-1.0 ml de la preparación enzimática, y después de agitar vigorosamente se transvasa la mezcla a un viscosímetro de Ostwald, se mide la viscosidad durante intervalos separados, hasta llegar 30-60 minutos del inicio de la reacción enzimática.
- c) El control se hace usando una fracción de la muestra, que se ha hervido durante 5 minutos, en baño de María, para inactivar la enzima.
- d) La actividad enzimática se puede expresar:
  - 1) De la misma manera que el método A
  - 2) Como el tiempo necesario para reducir la viscosidad inicial de la mezcla, en reacción, hasta un 50 % de la viscosidad del control.

### METODO C

Para la determinación de las proteínas totales se usó el

método de Kjeldahl descrito en Methods in Enzimology<sup>(18)</sup>.

#### METODO D

Se usó también el método de Lowry para la determinación de proteínas. Es un método más rápido que el Kjeldahl, pero no es aplicable con preparaciones que contengan más del 0.15% de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , por lo que no se puede usar con los precipitados y sobrenadantes obtenidos al tratar las aguas de café con dicha sal<sup>(16, 18)</sup>.

#### METODO E

Determinación de sólidos totales. Para ésta determinación se utilizó un horno a  $105^\circ\text{C}$ , presentándose los resultados como porcentaje en peso.

#### 4. RESULTADOS Y SU DISCUSION

##### 4.1 DETERMINACION DE LAS CORRIENTES DE DESHECHO EN LAS QUE ESTAN PRESENTES LAS ENZIMAS

Para ello se estudió la actividad de las enzimas pécticas en las aguas de despulpado y en las que provienen de los tanques de fermentación del despulpado, en cuanto a la existencia de esas enzimas en las diferentes corrientes de desecho, así como los cambios que ocurren en su actividad, después del muestreo.

a) Se eligieron las siguientes corrientes:

1. agua de los pulperos
2. tanque de fermentación, 1 día después de despulpar
3. tanque de fermentación, 3 días después de despulpar
4. pila de pulpa de café.

En estas corrientes se analizó: nitrógeno total (micro Kjeldahl, Método C) y actividad reductora de viscosidad - (Método A), durante un período de 8 días a 4°C. Los resultados aparecen en el Cuadro N° 1.

CUADRO N° 1

Muestra	Proteína(1)	Actividad(2)			
	mg/ml	2º día	4º día	6º día	8º día
1	0.19	0.246	0.054	0.257	0.000
2	2.50	0.755	0.823	0.169	0.455
3	1.50	0.634	0.227	0.056	0.305
4	0.80	0.325	0.173	0.140	0.418

b) Se eligió la corriente 2 para el siguiente ensayo, se tomaron 2 fracciones, así:

2.1 Almacenada a 4°C

2.2 Almacenada a 25°C

La cantidad de proteína, carbohidratos y la actividad se midieron el 1er. día después del muestreo y luego 20 días más tarde. (Ver cuadro 2)

---

(1) Proteína en mg/ml obtenida de multiplicar el Nitrógeno total x 6.25

(2) Los valores de actividad presentados corresponde a la relación:

$$1 - \frac{\text{Viscosidad (tiempo) muestra}}{\text{Viscosidad (tiempo) control}}$$

CUADRO N° 2

Muestra	Días	Proteína <sup>(1)</sup>	Carbohidratos <sup>(2)</sup>	Actividad <sup>(3)</sup>
2.1	1	2.20	1.76%	0.267
2.1	20	2.20	0.98	0.360
2.2	1	2.20	1.36	0.312
2.2	20	2.20	0.11	0.822

- c) Al terminar el ensayo anterior, la temperatura de almacenamiento de la muestra 2.1 se cambió a 25°C y se mantuvo en observación durante 9 días, los resultados aparecen en el Cuadro N° 3.

---

(1) Proteína en mg/ml

(2) Como % de sacarosa, base muestra líquida

(3) Condiciones similares a las del Cuadro N° 1

CUADRO N° 3

Día	Sólidos Tot.	Proteína <sup>(1)</sup>	Carbohidratos	Actividad (2)
0	3.5%	4.9	0.96	0.360
2	3.5	5.2	0.71	0.748
5	2.9	5.8	0.29	0.802
7	2.9	6.0	0.27	0.824
9	3.0	6.0	0.21	0.834

### DISCUSION

a) En el cuadro N° 1 se observa que todas las corrientes muestreadas presentan actividad enzimática, siendo mayor en los tanques de fermentación. Sin embargo no se encuentra una tendencia definida en el cambio de actividad de las muestras en el período estudiado. Notamos además que la mayor actividad se encontró en la corriente del tanque de fermentación de 1 día así como el contenido de proteínas en este tanque es considerablemente mayor.

b) En el cuadro 2 se observa:

1. Un aumento en la actividad de ambas fracciones,

---

(1) Proteína en mg/ml

(2) El tiempo de incubación fue de 48 horas, las condiciones restantes fueron las mismas que las anteriores.

siendo mucho mayor en la muestra que se mantuvo a 25°C

2. Una reducción en la proporción de carbohidratos, que es mayor en la fracción 2.2

Evidentemente las enzimas actuaron con mayor actividad a la temperatura más alta, como era de esperarse. A temperatura baja se mantiene activa pero sin aumentar considerablemente su actividad.

c) Los resultados del cuadro 3 indican que además de lo observado en la sección anterior, hay una producción de proteínas. Esto nos sugiere que hay un desarrollo de algún microorganismo que para su crecimiento consume los sustratos disponibles en las aguas de desecho, con la ayuda de las enzimas pécticas producidas por él mismo. Hecho que también se confirma con la disminución de carbohidratos que se observan en el cuadro 2.

#### 4.2 PURIFICACION DE LAS ENZIMAS

Habiendo determinado la existencia de las enzimas en las aguas de desecho de los beneficios de café se procedió a su extracción y purificación, para ello se utilizaron los siguientes métodos:

1. Precipitación con sulfato de amonio
2. Filtración en gel.

##### 4.2.1 Procedimiento general de precipitación:

Antes de intentar la precipitación de las proteínas, las

aguas se filtraron en vacío en papel Whatman N° 5; algunas fracciones se centrifugaron a diferentes velocidades, y otras se filtraron al vacío con filtros Milliporo (tamaño del poro 0.22  $\mu$ ). Se hicieron recuentos bacteriológicos de las fracciones recolectadas y determinaciones de proteína, sólidos totales y actividad pectinolítica (Ver métodos sección 5).

A las fracciones filtradas con Milliporo se les agregó  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  en solución saturada (Ver base de la teoría de precipitación de proteínas en inciso 2.8) a una temperatura de 20°C. Las saturaciones de sulfato de amonio se variaron entre 30 y 100%. La preparación proteica saturada con la sal se centrifugó a diferentes velocidades y a diferentes tiempos. El sobrenadante se recuperó para una nueva saturación; el precipitado se disolvió con una cantidad mínima de agua destilada y algunas veces se dializó durante 24 horas a temperatura ambiente con una solución amortiguadora de citrato-fosfato pH 5.0 o con agua destilada. Con la preparación resultante de la dialisis se determinó la actividad enzimática por el método B, así como el contenido de proteína cuando la cantidad de la muestra permitió hacerlo. En algunos casos se determinó la actividad sin dializar la muestra. Se repitieron los ensayos usando café de altura y café costa para comparación. A continuación se dan los resultados de las variaciones que se hizo para cada ensayo.

#### 4.2.1.1 Centrifugación de las aguas de café a varias velocidades.

Las muestras se centrifugaron a 25°C durante 10 minutos usando muestras recolectadas durante el mes de marzo en el beneficio de café San Lázaro de Antigua Guatemala.

CUADRO N° 4

<u>RPM. (25°)(1)</u>	<u>x g</u>	<u>Recuento microbiológico por ml</u>
muestra original		28.0 x 10 <sup>5</sup>
4000	1 800	3.0 x 10 <sup>5</sup>
5500	3 400	2.5 x 10 <sup>5</sup>
7000	5 500	3.0 x 10 <sup>5</sup>
9000	9 000	2.0 x 10 <sup>5</sup>

Con nuevas muestras que se recogieron en los desagües de los tanques de fermentación del mismo beneficio de café recolectadas entre las 12 y 24 horas después de que el café había sido despulpado, durante el mes de octubre de 1973, se ensayaron mayores velocidades de centrifugación y una temperatura más baja. Los resultados se presentan en el cuadro N° 5.

---

(1) Café de altura.

CUADRO N<sup>o</sup> 5

<u>RPM 4°C<sup>(1)</sup></u>	<u>x g</u>	<u>Recuento microbiológico por ml</u>
6700	5000	$1.3 \times 10^5$
9500	10000	$8.7 \times 10^5$
11500	15000	$6.2 \times 10^5$
13500	21000	$3.8 \times 10^5$
17000	32000	$1.6 \times 10^5$
Muestra original		$230.0 \times 10^5$

De los datos del cuadro 4 notamos que a velocidades de centrifugación comprendidas en el rango de 4000 a 9000 RPM, la reducción en el recuento microbiológico es del 10 %  $\pm$  sobre la contaminación original, sin importar la velocidad de centrifugación.

Sin embargo en el cuadro N<sup>o</sup> 5 notamos que a velocidades mayores de 9000, la relación entre la contaminación y la velocidad es más directa, pues a medida que aumenta la velocidad disminuye el recuento microbiológico.

Otro hecho notable es que la presencia de microorganismos afecta las mediciones de la actividad enzimática, es to se demuestra con los resultados expuestos en el siguiente

---

(1) El café beneficiado era de costa.

cuadro:

CUADRO Nº 6

<u>Recuento por ml</u>	<u>Actividad (1)(2)</u>
13 x 10 <sup>5</sup>	0.555
8.7 x 10 <sup>5</sup>	0.530
6.2 x 10 <sup>5</sup>	0.414
3.8 x 10 <sup>5</sup>	0.252

#### 4.2.1.2 Filtración de las aguas de fermentación de café - con filtros Millipore.

Como se mencionó en el procedimiento general de pre cipitación las aguas de café recolectadas se filtraron por Millipore antes de proceder a la precipitación. Las muestras recién recolectadas se filtraron primeramente al vacío usando papel Whatman Nº 5, luego se filtraron por Millipo re usando filtros con poros 0.22 u. Los resultados se encuen tran en el cuadro 7.

---

(1) Se usó método B para determinación de actividad a pH 5.0

(2) A cada porción centrifugada se le determinó tanto ac tividad como recuento microbiológico (datos en cu adros 5 y 6).

CUADRO N° 7

<u>Muestra(1)</u>	<u>Recuento microbiológico por ml</u>	<u>proteína mg/ml</u>
Original	$30.0 \times 10^5$	1.12
Centrifugado(2)	$30.0 \times 10^5$	1.15
Filtrado con Millipore	$1.0 \times 10^2$	1.09

Se observa una reducción bien definida de la contaminación microbiológica en la muestra filtrada con Millipore, así como una cierta reducción en el contenido de proteína, al compararla con las aguas sin tratamiento o centrifugadas. Por el contrario, la centrifugación prolongada sólo dio por resultado una contaminación similar a la de la muestra original, causada probablemente por la multiplicación de los microorganismos, como también lo sugiere el contenido de proteína.

#### 4.2.1.3 Precipitación de las proteínas (enzimas) con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Las aguas de lavado de café recolectadas durante el mes de marzo del beneficio San Lázaro, se filtraron con papel Whatman N° 5 al vacío, y luego en filtros bacteriológicos

---

(1) Muestra captada durante el mes de marzo

(2) Centrifugado a 2000 g, 1 hora y 25°C.

cos Millipore (ver sección anterior). Luego se efectuó la precipitación agregando sulfato de amonio en diferentes saturaciones, que variaron de 30 a 100% de saturación. Para poder comparar la actividad de las enzimas precipitadas de las aguas de lavado de café, se hizo la precipitación con las mismas saturaciones usando las enzimas comerciales Pectinol 41-P y Spark-L los resultados se presentan en las gráficas del 1 al 4.

### Discusión de los resultados

En las gráficas 1 y 2 se observa la forma cómo disminuye la viscosidad con el tiempo de incubación (método B) de 1 ml de muestra con el sustrato polipectato de Na. 1% + solución amortiguadora de acetato pH 4.5, al precipitar las proteínas de las preparaciones Spark-L y Pectinol 41-P (1 mg/ml).

En la gráfica 1 se nota una diferencia marcada en la actividad de las precipitaciones de las saturaciones a 30% y 50%, notamos que a la saturación de 70% la tendencia de la curva y la actividad del precipitado es muy semejante a la saturación de 50%, esto nos sugiere que hay una saturación óptima (a determinadas condiciones de temperatura, clase de proteína presentes, etc.) dónde precipita la mayor cantidad de proteína pasada la cual, la precipitación continúa casi constante.

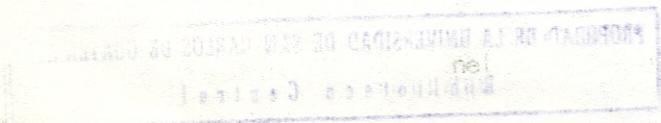
En la precipitación del Pectinol 41-P (graf. 2) esta diferencia es menor lo que nos sugiere que existe otra saturación arriba de 50% dónde la precipitación es óptima.

En las gráficas 3 y 4 se observa cómo aumenta la acti-

vidad del precipitado de las aguas de café al aumentar la saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Es importante notar que a partir de una saturación del 75%, la actividad de los precipitados obtenidos se mantiene dentro de un cierto intervalo común sin importar la cantidad de Sulfato que se haya agregado.

#### 4.2.1.4 Comparación de las aguas de café de costa y altura

Se trabajó con aguas de café de costa y altura para poder establecer comparación entre ambas, centrifugándose y filtrando luego en filtros bacteriológicos Millipore (ver cuadros 5 y 6). Se repitió también con estas muestras el efecto de la fermentación natural con el tiempo sobre la actividad enzimática.



CUADRO N° 8

<u>Día</u>	<u>Sólidos totales</u> %	<u>Proteína<sup>(1)</sup></u> ug/ml	<u>Actividad<sup>(2)</sup></u>
0	0.581	546	0.276
1	0.579	495	0.345
2	0.565	400	0.365
3	0.515	436	0.449
5	0.410	396	-
6	0.380	404	-
7	0.350	-	-
8	-	470	0.380
9	-	525	0.311
10	-	-	0.706 <sup>(3)</sup>
12	-	445	-

(1) Analizada por el método de Lowry

(2) Incubación de 24 horas a 30°C

1 ml de muestra + 5 ml de polipectato de sodio pH 5.0

La actividad se expresa como:  $\frac{\text{Viscosidad muestra activa}}{\text{Viscosidad control}}$

(3) La incubación fue de 48 horas a 30°C.

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Se observa que en 10 días se alcanzó el nivel de actividad de las pruebas hechas anteriormente con café de altura. Otro hecho importante es la reducción del contenido de sólidos totales en la muestra; la variación en el contenido de proteína no resulta significativa dado el elevado error del método de análisis.

Por lo tanto el efecto de la fermentación natural con el tiempo sobre la actividad enzimática es semejante en el café de costa así como en el de altura.

Se hizo otro ensayo similar al anterior con nuevas muestras, usando aguas de café de costa y altura, captadas el mismo día. Los resultados se muestran a continuación.

CUADRO N° 9

Día	Proteína <sup>(1)</sup>		Actividad <sup>(2)</sup>	
	A mg/ml	C mg/ml	A	C
0	1.423	1.276	0.438	0.371
2	1.399	1.262	0.505	0.300
6	1.019	1.019	0.376	-
8	0.894	0.851	-	-
14	0.819	0.769	0.620	0.610

(1) Analizado por el método de Kjeldahl

(2) La actividad fue analizada de igual manera que las muestras del cuadro 8.

Se nota una disminución en las proteínas del 0 al 14 día, mientras que la actividad se muestra una tendencia de finida los primeros días pero si aumenta en los últimos 14 días, no hay diferencia notable entre el café de costa y altura.

Las muestras anteriores se separaron en tres fracciones cada una así:

1. a temperatura ambiente en recipiente abierto
2. a temperatura ambiente, en recipiente herméticamente cerrado
3. en refrigeración (4-6°C)

A los 14 días del muestreo, se obtuvo los siguientes resultados.

CUADRO N° 10

Muestra	Proteína mg/ml	Actividad
A - 1	0.819	0.620
A - 2	1.131	Nula
A - 3	1.431	0.420
C - 1	0.769	0.610
C - 2	1.231	Nula
C - 3	1.272	0.392

Se nota tanto en el café de costa como en el café de altura un aumento en la actividad cuando la muestra se mantuvo en recipiente abierto y a la temperatura ambiente, no así, las muestras que se mantuvieron en refrigeración cuya actividad se mantuvo constante (ver cuadro 9). Es importante observar que la muestra que se mantuvo en recipiente herméticamente cerrado a pesar de estar a temperatura ambiente no presentó ninguna actividad, lo que hace suponer que los microorganismos productores de las enzimas son aerobios.

Con las aguas de café anteriores (muestra dejada a temperatura ambiente), se ensayó además la precipitación de proteína con sulfato de amonio. Los resultados pueden observarse en el cuadro siguiente.

CUADRO N° 11

Saturación, %(1)	Actividad precipitado(2)	Actividad(3) Sobrenadante
40	0.640 <sup>(4)</sup>	0.322 <sup>(4)</sup>
50 <sup>(3)</sup>	0.234 <sup>(4)</sup>	0.170
60	0.378	0.105
70	0.308	0.036

(1) Se usó una solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

(2) La actividad se determinó como en las muestras anteriores (métodos B, sección 5).

(3) Desde esta precipitación (50%) se usó el sobrenadante de las precipitaciones anteriores.

(4) Promedio de determinaciones de actividad por duplicado en cada una de las muestras saturadas por separado.

(5) Promedio de dos determinaciones de actividad de una muestra

## DISCUSION:

La precipitación a una saturación de 40% presentó la mayor actividad; sin embargo, las siguientes precipitaciones aún estaban activas, lo que nos sugiere que no toda la proteína precipitó en la primera saturación. Además, el sobrenadante de cada precipitación aún presentaba actividad hasta llegar al sobrenadante de la saturación al 70% en el que disminuyó considerablemente dicha actividad.

### 4.2.2 FILTRACION EN GEL

Se empacó una columna cromatográfica de 1" de diámetro con Sephadex G-25 (Pharmacia fine Chemicals). Se aplicaron muestras de aguas de fermentación del café y soluciones acuosas de una preparación enzimática comercial (Pectino 41 P), usando como medio de elución un amortiguador de citrato-fosfato (pH 5.0 de fuerza iónica 0.027).

El líquido se fraccionó según su absorbancia a 280 m $\mu$ , con un recolector de fracciones modelo 563 (Instrumentation Specialities Co.) acoplado con un analizador ultravioleta modelo UA-2 (ID). Las fracciones se recolectaron para determinar su actividad enzimática con el Método B. Los resultados se observan en la gráfica No. 5.

Debido a la dilución que ocurre en el proceso, no muestran actividad enzimática apreciable las distintas muestras ensayadas; sin embargo, las variaciones de absorbancia de las muestras eluidas sugieren la existencia de proteínas de varios pesos moleculares en las aguas de fermentación del café.

## CONCLUSIONES:

- 1) La mayor actividad enzimática se encontró en las corrientes que fluyen de los tanques de fermentación del café, dos días después de la operación de despulpada.
- 2) La marcada y continuada actividad enzimática en las muestras almacenadas a la temperatura del ambiente sugiere la marcada importancia de los microorganismos en la formación de estas enzimas.
- 3) Las enzimas pueden recuperarse por un proceso de precipitación con sales como el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . El procesamiento incluiría una preparación de las aguas de café con filtros bacteriológicos, la precipitación propiamente dicha, luego la centrifugación del precipitado y finalmente secado del mismo.

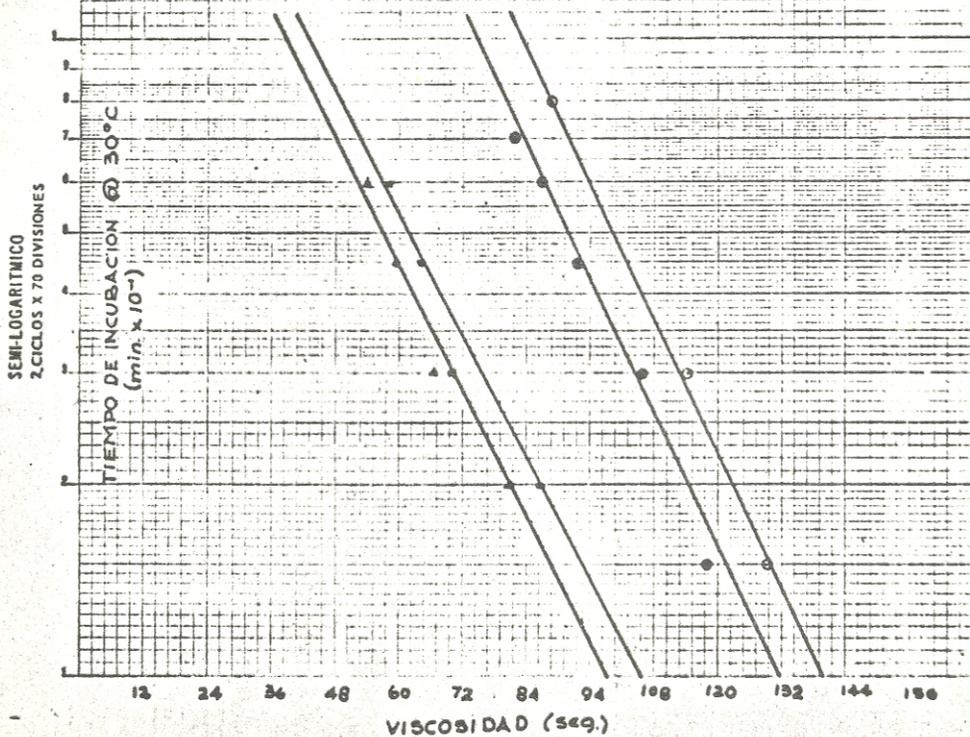
GRAFICA No 1

PRECIPITACION DE SPARK-L 5% CON  $(NH_4)_2SO_4$   
EN SOLUCION SATURADA

PRECIPITADOS {  
 ○ ● - Saturación al 30%  
 ■ - Saturación al 50%  
 ▲ - Saturación al 70%

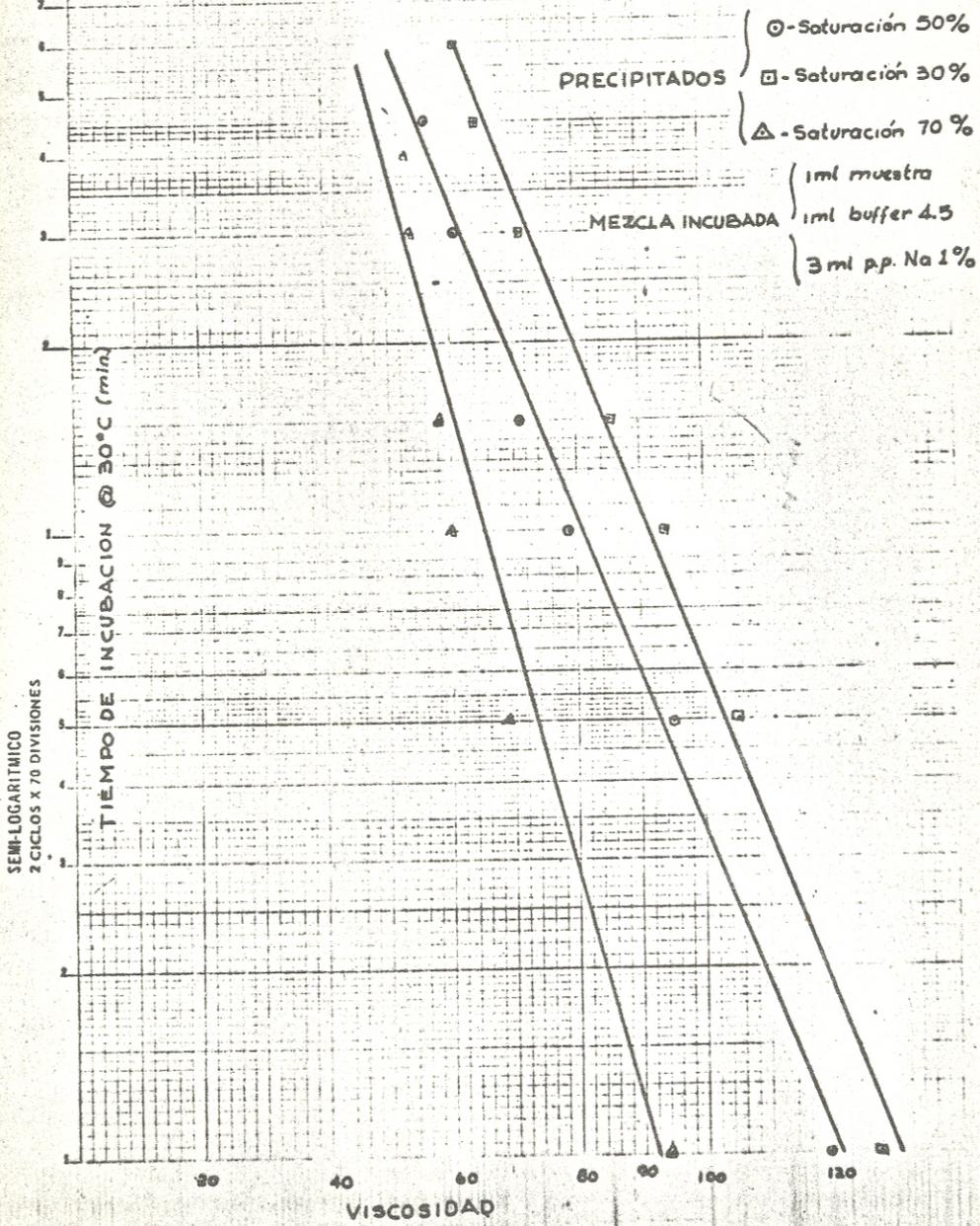
MEZCLA INCUBADA {  
 3 ml p.p. Na 1%  
 1 ml buffer 4.5  
 1 ml muestra

T. INCUBACION PARA 50% VISC. INICIAL



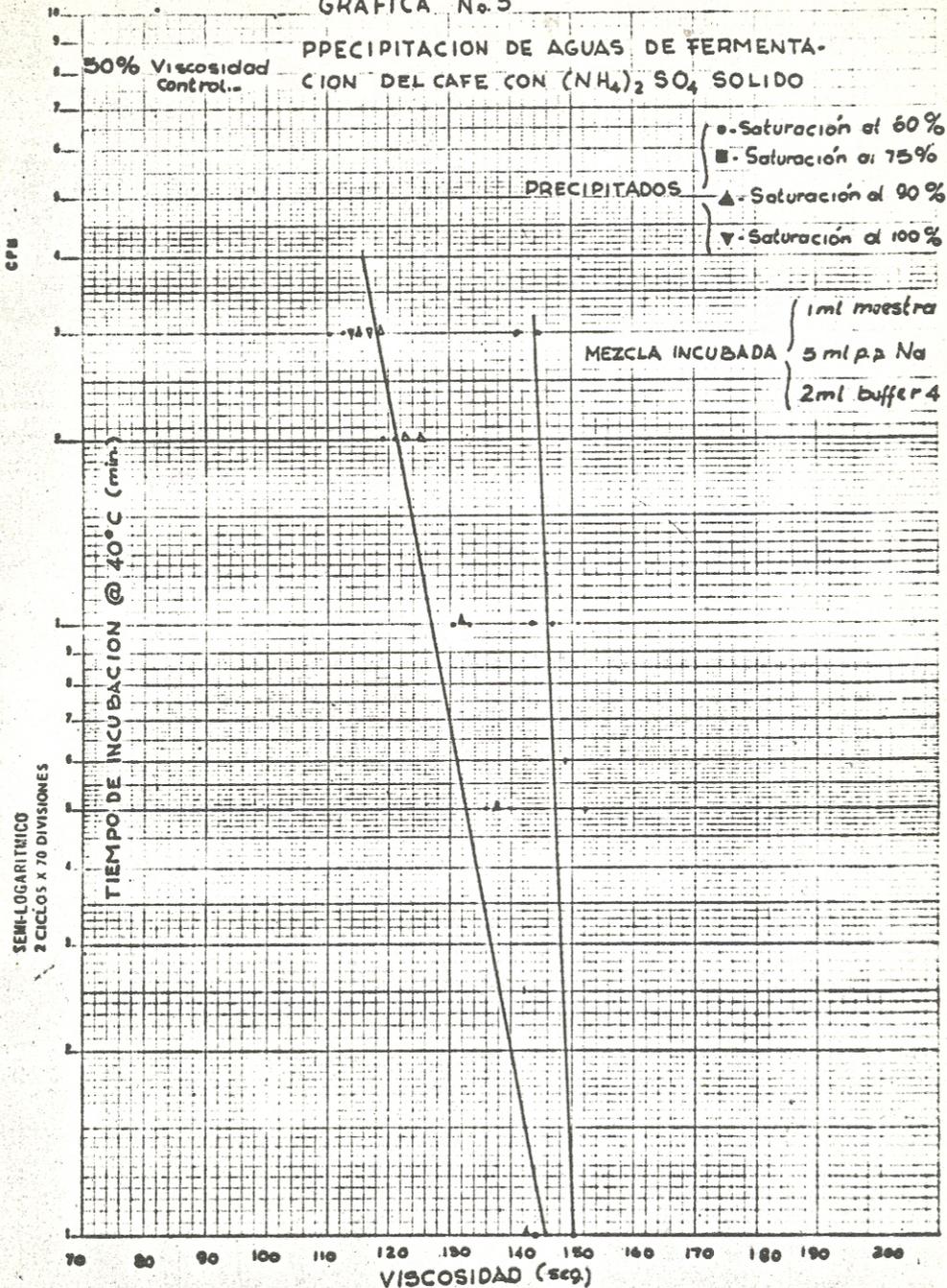
# GRAFICA No 2

PRECIPITACION DE PECTINOL 41-P (1mg/ml) CON  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> EN SOLUCION SATURADA

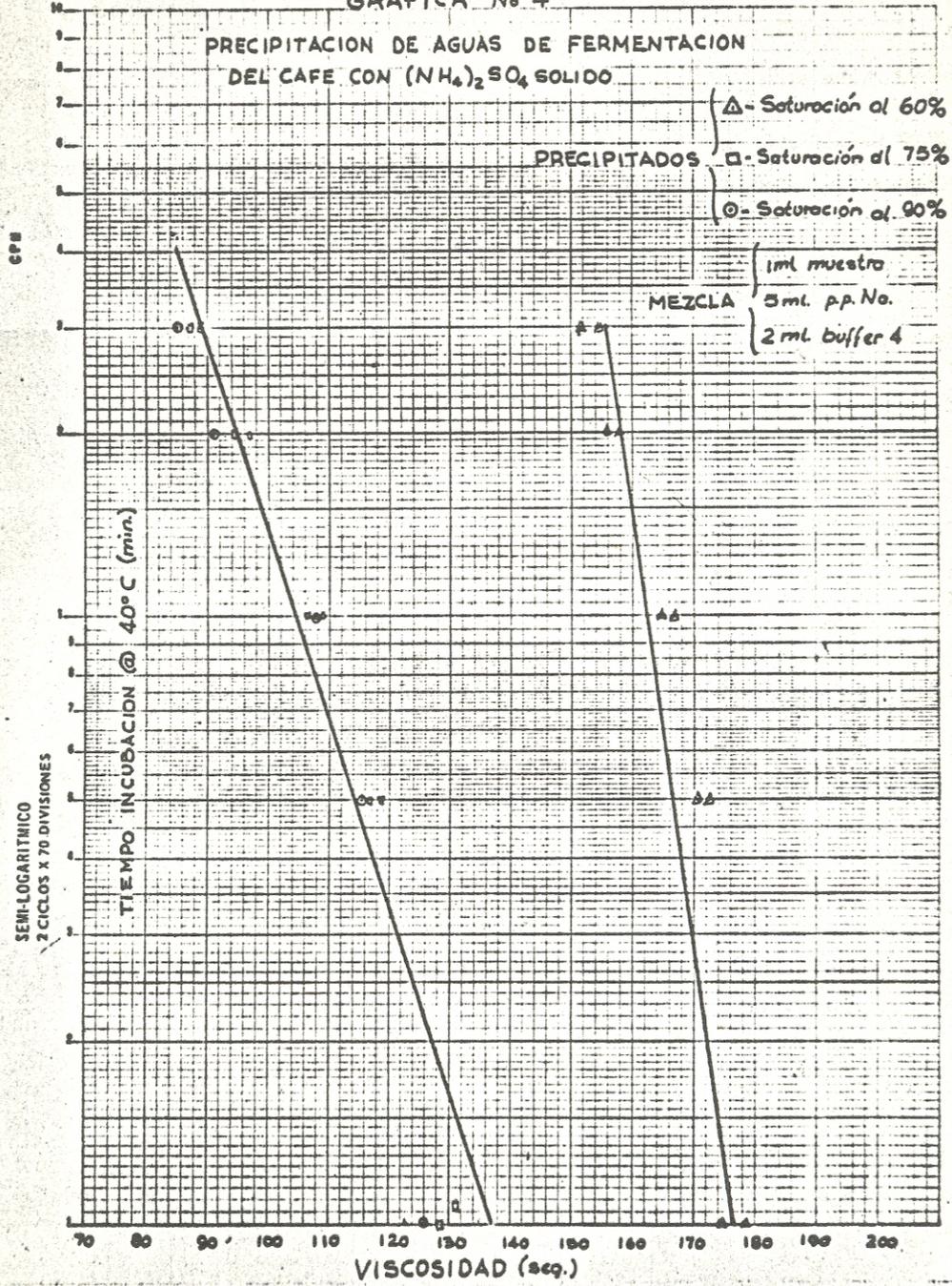


GRAFICA No.3

PRECIPITACION DE AGUAS DE FERMENTACION DEL CAFE CON  $(NH_4)_2 SO_4$  SOLIDO



GRAFICA No. 4



# GRAFICA No.5

FILTRACION EN GEL (SEPHADEX G-25) DE AGUAS DE FERMEN-  
TACION DEL CAFE Y PECTINOL 4I-P (10 mg/ml)

Absorbancia @  
280 m $\mu$

0.50  
0.45  
0.40  
0.35  
0.30  
0.25  
0.20  
0.15  
0.10  
0.05

TIEMPO DE ELUCION

50

48

46

44

42

40

38

36

34

32

30

28

26

24

22

20

18

16

14

12

10

8

6

4

2

AGUA DE CAFE (2 ml)  
Columna 2 1/2"

AGUA DE CAFE  
Columna 5"

2 ml Pectinol 4I-P (10 mg/ml)  
Columna 2 1/2" altura

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

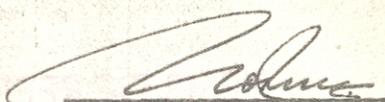
Biblioteca Central

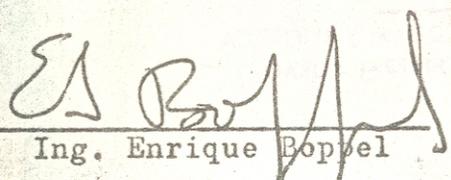
## BIBLIOGRAFIA

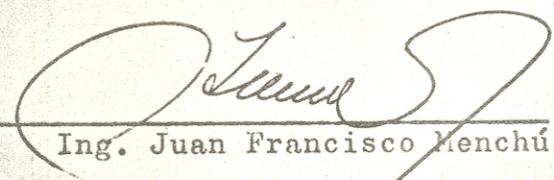
1. Ayers. et. al. PHYTOPATHOLOGY, 56, 1006 (1966).
2. Arda Alden y Walter Hughes. METHODS IN ENZYMOLOGY, 3, 453, (1970).
3. Busch, D.A. Codner, PHYTOCHEMISTRY CHEMICAL ENGINEERING, 9 (1) 87-97 (1970).
4. Barrios R. REPORTE PROYECTO 1358 ICAITI, Enero 1973.
5. Calle H. ALGUNOS METODOS DE DESMUCIAGINADO Y SUS EFECTOS SOBRE EL CAFE PERGAMINO, Cenicafé, Colombia 16, 3-11 (1965).
6. Carbonell R. Vilanova Mt. BENEFICIADO RAPIDO Y EFICIENTE DEL CAFE MEDIANTE EL USO DE SODA CAUSTICA. Centro Nac. de Agronomía, Boletín Técnico No. 13, 141 (1952).
7. Choussy. EL CAFE DE EL SALVADOR. 11,3 (1941).
8. Coto y Fukunaga, EXTENSION CIRCULAR 359 University of Haway (1956).
9. Enxime Nomenclature, RECMENTATIONS INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY. Elsevier Publishing Co. Amsterdam (1964).

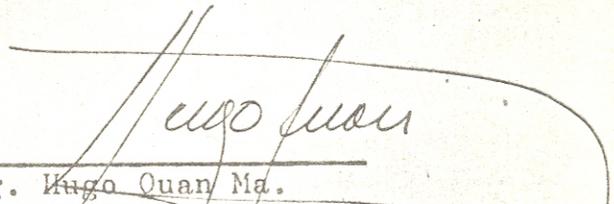
10. Endo and Yamasaki et. al. J. Agr. FOOD CHEM. 19 (15), 1971.
11. Fogarty W.M. & World P. PROCESS BIOCHEMISTRY 7 (8) 13 August (1972).
12. Ishin Shigetaka Yokosuka J. Agr. FOOD CHEM. 19 (5) 968-71 (Eng.) 1971.
13. Kertez A. et. al. CHEM ENG. Nexs.
14. Joslyn M.A. and Del J. Food SCIENCE, 28, 65 (1963)
15. Koller Anton, Edit. Teach. Hochsch, Zurich, Switz. Eur. J. Biochem.
16. Lowry Rosebrug, Parr y Randall. J. BIOL. CHEM. 193 265 (1951).
17. Magin L. Compt Rend. 107-144 (1958).
18. Kaplan N., Sidney P. METHODS IN ENZIMOLOGY. Vol. 5, 356 (1957).
19. O. Nyiril D. Cs. PROCESS BIOCHEMISTRY.
20. Reid W. S. MONOGRAPH 11 35 (1961).
21. Rolz, J. Menchú, R. Espinoza. EXTRAIT DU CINQUIME COLOQUE INTERNATIONAL SUR CHIMIE. Des Cafés. ASIC 5<sup>o</sup> Colloque. Lisbonne, 1971.
22. Silvetz M. and Foote COFFE PROCESSIN TECHNOLOGY. The Avi Publishing Co. 1973.

23. Ward P.E. INDUSTRIAL COFFE WASTES IN EL SALVADOR. Sewage Works J., 17, 39 (1945).
24. Wotton, A.E. THE FERMENTATION OF COFFE EAST AFRICA INDUSTRIAL RESEARCH. Organization Report. Nairobi, Kenya (1962).
25. Yates A.R. Mooney, CAM. IND. FOOD TECHNOLOGY J. 1 (3) 106-109 (1968).

  
Norma Marina Villar Cho

VoBo:   
Ing. Enrique Boppel  
Asesor

VoBo:   
Ing. Juan Francisco Menchú  
Asesor  
Director de la Escuela  
de Ingeniería Química

IMPRIMASE:   
Ing. Hugo Guan Ma.  
Decano de la Facultad  
de Ingeniería.