



Universidad Nacional de Itapúa
Facultad de Ciencias y Tecnología
Maestría en Biotecnología de los Alimentos



**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
UNA POLIGLACTURONASA MICROBIANA Y SU APLICACIÓN EN PROCESOS DE
INTERÉS REGIONAL**

Autor: Alicia Adela Mieres de Giménez

Director de Tesis: Dra. María Alicia Martos

Co-Director: Ing. Silvana Andrea Maidana (tesista Doctorado-becaria CONICET)

Encarnación - Paraguay

2017

DEDICATORIAS

Esta tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mi amado esposo Pedro, por su sacrificio y esfuerzo, por darme una carrera para nuestro futuro y por creer en mi capacidad, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre ha estado ahí, brindándome comprensión, cariño y amor.

A mis amados hijos Oscar Alejandro y Belén Itatí por ser mi fuente de motivación e inspiración para superarme cada día más.

A mis compañeros y amigos que estuvieron a mi lado apoyándome y lograron que este sueño se haga realidad.

A Dios, Siempre

AGRADECIMIENTOS

Gracias de corazón, a mi Tutora, la Dra. Alicia Martos, y a mi Co-tutora, la Ing. Silvana Maidana. Gracias por su paciencia, dedicación, criterio y aliento, al poner a mi disposición su tiempo y su saber para la realización de este trabajo. Han hecho fácil lo difícil. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

A la Bqca. Emilce Zubreski por su desinteresada colaboración y asistencia profesional, y a las compañeras de trabajo (Valeria y Vanesa) del “Laboratorio de Microbiología de los Alimentos y Biotecnología, Dr. Fernando Benassi”.

A mi querida Facultad de Ciencias y Tecnología, institución a la cual pertenezco, en la que me formé profesionalmente y hoy trabajo, por el apoyo para realizar mis estudios de Maestría y a todas las personas que fueron partícipes de este proceso, ya sea de manera directa o indirecta.

A la Universidad Nacional de Itapúa, prestigiosa casa de estudios, la cual me abrió sus puertas, preparándome para un futuro competitivo y formándome como persona.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca que me otorgó a través del programa Maestría en Biotecnología de Alimentos, y que me permitió realizar este curso de posgrado.

Y a todas las personas que de una u otra manera colaboraron para la realización de este trabajo.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT.....	iii
INTRODUCCIÓN	iv
OBJETIVO GENERAL.....	vi
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	vi
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 La pared celular vegetal	1
1.2 Sustancias pécticas.....	3
1.2.1 Estructura química de las sustancias pécticas	4
1.2.2 Clasificación de las sustancias pécticas	6
1.2.3. Propiedades de las pectinas.....	7
1.3 Enzimas utilizadas en alimentos	8
1.4 Enzimas microbianas de interés biotecnológico	9
1.5 Enzimas pécticas.....	11
1.5.1 Clasificación de enzimas pécticas.....	12
1.5.2 Principales aplicaciones de las enzimas pécticas	17
1.5.3 Producción de enzimas pécticas.....	23
1.5.4 Fermentación.....	28
1.5.5 Recuperación y purificación de enzimas pécticas.....	29
1.5.6 Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano	30
1.6 Sistemas de cultivos – Balance de Biomasa en un cultivo batch.....	32
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1. Microorganismos y medios de cultivos	35
2.1.1. Microorganismo	35
2.2. Producción de la enzima poligalacturonasa (PG)	35
2.2.1. Inóculo	35
2.2.2. Fermentación.....	35
2.3. Optimización de las condiciones de cultivo.....	37
2.4. Producción de PG a escala biorreactor	38
2.4.1. Precultivos.....	38
2.4.2. Fermentación.....	38
2.4.3. Determinaciones analíticas	39
2.5. Concentración del Extracto enzimático	39
2.6. Aplicación del extracto enzimático en tejido de ají morrón (Capsicumannuum).	41
2.6.1. Tratamiento de los tejidos vegetales	41
2.6.2. Evaluación de la capacidad macerante del extracto enzimático de W. anomalus.....	41

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
3.1. Estudio de la influencia de las condiciones de cultivo.....	43
3.2. Optimización de las condiciones de cultivo.....	45
3.3. Producción de PG a escala biorreactor.....	48
3.4. Concentración del Extracto enzimático	52
3.5. Aplicación del extracto enzimático en tejido de ají morrón (Capsicumannuum)	53
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXO	65

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Modelo aceptado de la pared celular. Hemicelulosas: líneas rojas; celulosa: cilindros celestes, pectinas: líneas negras.....	2
Fig. 2. estructura molecular básica de la pectina	4
Fig. 3. Estructura esquemática de la pectina	6
Fig. 4. Mecanismo de acción de las diferentes enzimas pécticas.....	13
Fig. 5. Estructura esquemática de protopectina.	17
Fig. 6. Microfotografía (400 ×) de <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	26
Fig. 7. Operaciones básicas para la producción de enzimas mediante un proceso de fermentación.. ..	28
Fig. 8. Esquema del crecimiento celular según el modelo de caja negra.....	31
Fig. 9. Esquema del proceso fermentativo de <i>W. anómala</i> en escala biorreactor.	40
Fig. 10. Proceso de maceración tejidos de morrón con el extracto enzimático de <i>W. anomals</i>	42
Fig. 11. Diagrama de Pareto para la producción de PGasa por <i>W. anomalus</i>	44
Fig. 12. Gráfica de efectos principales para PGasa.....	44
Fig. 13. Superficie de respuesta mostrando el efecto de la temperatura y el pH sobre la producción de PGasa por <i>W. anómala</i>	46
Fig. 14. Gráfica de efectos principales de temperatura y pH en la producción de PG.....	47
Fig. 15. Producción de biomasa y consumo del sustrato en función del tiempo	49
Fig. 16. Producción de PGasa y evolución del cultivo <i>W. anómala</i> en función del tiempo.....	50
Fig. 17. Producción de PG y valores de pH en el cultivo de <i>W. anómala</i>	51
Fig. 18. Gráfica Ln x en función de tiempo	51
Fig. 19. Tejidos de morrón macerados con el extracto enzimático	53
Fig. 20. Microfotografías (400 ×) de células de tejidos de ají macerados con el extracto enzimático de <i>W. anomalus</i>	53
Fig. 21. Células libres decantadas luego de la maceración enzimática de tejidos de morrón.....	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de algunas PGasas microbianas.	15
Tabla 2. Aplicación tecnológica de enzimas pectinolíticas	23
Tabla 3. Algunos microorganismos productores de enzimas pécticas.....	25
Tabla 4. Valores reales y codificados de los factores para diseño factorial 2^3	36
Tabla 5. Diseño a niveles alto y bajo para cada factor.....	36
Tabla 6. Valores codificados y reales utilizados en el diseño experimental	38
Tabla 7. Producción de PG por W. anomalus mediante el diseño factorial 2^3	43
Tabla 8. Análisis de Varianza para la producción de PG mediante el diseño factorial 2^3	43
Tabla 9. Valores obtenidos de Actividad PGasa mediante el diseño de Dohelert	45
Tabla 10. Resultados experimentales de Producción de PG a escala biorreactor	48
Tabla 11. PGasa de los EE obtenidos en la fermentación.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AG: ácido galacturónico

APG: ácido poligalacturónico

BA: batch alimentado

BAC: buffer acético-acetato de sodio

EE: extracto enzimático

FCE: fuente de carbono y energía

GE: grado de esterificación

HG: homogalacturonano

HM: alto metoxilo (por sus siglas en inglés)

LM: Bajo metoxilo (por sus siglas en inglés)

PE: pectinesterasa

PGasa: poligalacturonasa

PPasas: protopectinasas

RM: ramnogalacturonano

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de tesis fue evaluar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de la enzima poligalacturonasa por *Wickerhamomyces anomalus*, mediante la aplicación de diseños experimentales, a fin de encontrar las condiciones óptimas de producción de la enzima. Los cultivos se realizaron en frascos Erlenmeyer, durante 16 h, en un medio compuesto por glucosa, pectina de citrus, urea, sales y vitaminas. Las fermentaciones se realizaron variando las condiciones de cultivo (temperatura, pH y agitación). Se aplicó inicialmente un diseño factorial 2^3 y posteriormente se optimizaron las condiciones de cultivo mediante la metodología de superficie de respuesta. Se estudió la cinética de crecimiento y producción de la enzima en un biorreactor de laboratorio. Se determinó actividad PG, biomasa y glucosa residual en el transcurso del proceso fermentativo. El extracto enzimático concentrado se utilizó para macerar tejidos vegetales de morrón. El pH y la temperatura influyeron significativamente en la producción de la enzima PG por *W. anomalus*, mientras que la influencia de la velocidad de agitación fue no significativa. El pH influyó de manera positiva, mientras que la temperatura lo hizo de manera negativa. Los mayores títulos se obtuvieron a 30°C y pH de 5,7; con un valor máximo de producción de la enzima de 30,83 UE/mL. Durante el cultivo de *W. anomauls* a escala biorreactor, el microorganismo creció en fase exponencial hasta las 10 h de cultivo. La biomasa total producida fue de $3,03 \pm 0,905$ g_x/L, obteniéndose un rendimiento ($Y_{x/s}$) de 0,303 g_x/g_s en base a glucosa. La velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) fue de 0,12 h⁻¹. La síntesis de PGasa estuvo asociada al crecimiento, alcanzando un valor máximo de producción (30,52 UE/mL) al finalizar la fase exponencial. El pH se mantuvo prácticamente constante en el transcurso del proceso fermentativo. El extracto enzimático de *W. anomalus*, fue capaz de macerar tejidos de morrón. Se observó ablandamiento del tejido y células simples liberadas, sin evidenciarse ruptura celular. Fue posible optimizar las condiciones de cultivo para la producción de PGasa por *W. anomalus*, obteniendo extractos enzimáticos con elevada actividad, el cual fue capaz de macerar tejidos vegetales de morrón, un proceso biotecnológico de interés en tecnología de los alimentos.

Palabras clave: Poligalacturonasa; Levadura; Optimización.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to evaluate the effect of culture conditions on the production of the polygalacturonase enzyme by *Wickerhamomyces anomalus*, through by the application of experimental designs, to find the optimum conditions of production. Cultures were performed at Erlenmeyer flasks for 16 h in a medium composed of glucose, citrus pectin, urea, salts and vitamins. The fermentations were carried out varying the culture conditions (temperature, pH and agitation). A factorial design 2^3 was initially applied and culture conditions were subsequently optimized using the response surface methodology. The kinetics of growth and enzyme production were studied in a laboratory bioreactor. PG activity, biomass and residual glucose were determined during the fermentation process. Concentrated enzyme extract was used to macerate plant tissue. PH and temperature significantly influenced the production of the PG enzyme by *W. anomalus*, while the influence of the stirring rate was not significant. The pH influenced positively, while the temperature did so negatively. The highest titers were obtained at 30 ° C and pH 5.7; with a maximum enzyme production value of 30.83 EU / mL. During the cultivation of *W. anomauls* at the bioreactor scale, the microorganism grew in exponential phase up to 10 h of culture. The total biomass produced was 3.03 ± 0.905 gx / L, yielding a yield (Y_x / s) of 0.303 gx / gs based on glucose. The maximum specific growth rate (μ_m) was 0.12 h⁻¹. PGase synthesis was associated with growth, reaching a maximum value of production (30.52 UE / mL) at the end of the exponential phase. The pH remained practically constant throughout the fermentation process. The enzymatic extract of *W. anomalus* was able to macerate morrón tissues. Soft tissue and liberated single cells were observed, with no evidence of cellular rupture. It was possible to optimize the culture conditions for the production of PGase by *W. anomalus*, obtaining enzymatic extracts with high activity, which was able to macerate vegetal tissues of morrón, a biotechnological process of interest in food technology.

Keywords: Polygalacturonase; Yeast; Optimization.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas pécticas o pectinasas son las responsables de la degradación de las sustancias pécticas presentes en la laminilla media y en la pared celular primaria de las plantas superiores. Juegan un importante rol en la industria de alimentos, principalmente en el procesamiento de jugos de frutas, en la producción de vino, en la extracción de aceite de oliva y en la fermentación del té, café y cacao (Uzuner y Cekmecelioglu, 2015). Según su modo de acción se clasifican en: poligalacturonasa (PGasa), pectinesterasa (PE), pectinliasa (PL) y pectatoliasa (PAL). Las PE hidrolizan los ésteres metílicos de moléculas de pectina, liberando metanol. Las PL y PG son enzimas depolimerizantes, degradan enlaces glicosídicos ya sea por un mecanismo de hidrólisis (PGasa) o por un mecanismo de β -eliminación (PL)(Paudel *et al.*, 2015).

Algunas poligalacturonasas (PGasas), denominadas protopectinasas (PPasa), tienen la capacidad de hidrolizar restringidamente la protopectina presente en los tejidos vegetales, liberando pectina soluble con la consiguiente separación de las células sin producir mayores daños, proceso denominado maceración (Martos *et al.*, 2014). La maceración es un proceso a través del cual los tejidos organizados de los vegetales, se transforman en una suspensión de células intactas, manteniendo de esta manera las propiedades nutritivas del alimento.

Las enzimas pécticas son producidas por una gran variedad de microorganismos como hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Las levaduras son organismos unicelulares que presentan mayor velocidad de crecimiento, cualidades que le confieren importantes ventajas para el cultivo sumergido a gran escala, además de que a muchas de ellas se las considera como microorganismos GRAS (Generalmente reconocidos como seguros). Otra ventaja de las levaduras es que sólo producen endopoligalacturonasas, a diferencia de los hongos, los cuales originan una compleja mezcla de enzimas pécticas (Rodríguez Gàmez, *et al.*, 2008).

La producción de enzimas microbianas, actividad enzimática y mecanismos que controlan su síntesis y secreción están bajo la influencia de diversos factores tales como el pH del medio, temperatura de incubación y naturaleza y cantidad de la fuente de carbono. Estos factores son importantes identificar a fin de optimizar el crecimiento adecuado del microorganismo y la producción de la enzima (Barragán *et al.*, 2014).

Para optimizar la producción enzimática se utiliza la estrategia de modificar cada factor a la vez, mientras los demás se mantienen constantes, sin embargo esto requiere de un gran número de experimentos y la interacción entre factores es ignorada. En contraste, los diseños experimentales basados en la estadística son aproximaciones más eficientes que pueden llevarse a cabo con un gran número de variables simultáneamente; además, se puede estimar la interacción entre variables, mejorando los rendimientos del proceso (Díaz, Flórez y Cotes, 2005).

Wickerhamomyces anomalus, una levadura aislada en la provincia de Misiones, Argentina, produce, al crecer en medio líquido, extractos enzimáticos con actividad PG. Esta enzima, a diferencia de otras PGasas, posee además capacidad PPasa (Martos *et al.*, 2013). El potencial de aplicación industrial de PG de *W. anomalus*, en tecnología de Alimentos, justifica la realización de estudios tendientes a la optimización de la producción a fin de obtener extractos enzimáticos con elevada actividad enzimática en medios de cultivos de bajo costo, para su futura producción, a mayor escala.

En Paraguay, el estado del arte en cuanto a la utilización de enzimas en la industria de alimentos es una tarea pendiente, por lo que la información generada podrá incentivar el desarrollo y/o producción de enzimas como para aplicarlas a este sector alimentario debido a que en el Paraguay las enzimas, utilizadas son importadas (Yubero, 2016). En el país hay regiones frutihortícolas de excelencia. Estas producciones generan toda una rama de industrias relacionadas, como jugueras, fábricas de dulces, elaboradoras vegetales, etcétera, en las cuales las pectinasas son un factor fundamental en el proceso de producción, como también su aplicación en la reutilización de las grandes cantidades de subproductos que generan durante el procesamiento.

La presente investigación se plantea en dos etapas claramente diferenciadas pero concatenadas, una dedicada a optimizar la producción de la enzima poligalacturonasa (PG) por *Wickerhamomyces anomalus* y otra donde se evalúa la maceración de morrón (*Capsicum annuum*), utilizando el extracto enzimático obtenido.

OBJETIVO GENERAL

Optimizar la producción de la enzima poligalacturonasa (PGasa) por *Wickerhamomyces anomalus* y evaluar su aplicación en la maceración de tejidos vegetales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar la influencia de factores físicos y químicos sobre el proceso de producción de PG por *W. anomalus*, a escala frascos agitados, mediante diseños factoriales.
- ✓ Aplicar la metodología de superficie de respuesta para obtener las mejores condiciones para la producción de PG por *W. anomalus*, a escala frascos agitados.
- ✓ Producir la enzima en las condiciones óptimas seleccionadas, en un birreactor de laboratorio.
- ✓ Evaluar la maceración de tejidos de morrón (*Capsicum annuum*) utilizando el extracto enzimático producido por *W. anomalus*.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1 La pared celular vegetal

La pared celular vegetal es una estructura dinámica que circunda las células, exterior al plasmalema, y cuya composición y propiedades son constantemente adaptadas al crecimiento, diferenciación y variaciones medioambientales (Contreras-Esquivel, 2003).

Las células vegetales están rodeadas por una estructura rígida, la que se asienta externamente sobre la membrana plasmática. La pared celular vegetal posee la capacidad de otorgar estabilidad mecánica, proporcionar la forma y el soporte a la planta, mantener unidas las células en un tejido, modular el crecimiento celular y constituir una barrera ante el ataque de patógenos.

Está compuesta por una mezcla compleja y dinámica de polisacáridos de alto peso molecular como carbohidratos, lignina y proteínas, así como otras sustancias embebidas en ella, tales como cutina, suberina y ciertos componentes inorgánicos que varían de una planta a otra (Ringuelet y Viña, 2013). Tanto la estructura como la composición y las propiedades de la pared celular cambian a lo largo de la vida de la célula.

La pared celular de las plantas superiores está formada por tres capas: lámina media, pared primaria y pared secundaria (Fig. 1).

La laminilla media, primera capa que se deposita durante la división celular, está formada principalmente por sustancias pécticas y mantiene la unión entre las células adyacentes, que cumplen así el rol de sustancia cementante (Azcón-Bieto y Talón, 2000)

Una vez completada la división se deposita la pared primaria, formada fundamentalmente por celulosa; y también por otros carbohidratos como hemicelulosa y polisacáridos pécticos así como por proteínas estructurales, lignina y otras sustancias (Bernabeu, 2017).

La pared celular secundaria comienza a depositarse hacia el final del crecimiento de la célula. En la pared celular secundaria la cantidad de pectina es prácticamente nula está compuesta básicamente en tres capas de microfibrillas de celulosa con diferente orientación embebidas de lignina (Curtis, 2008). Contiene además otros polisacáridos tales como

hemicelulosas. En conjunto, es una estructura más gruesa que la pared primaria, con una mayor rigidez y resistencia.

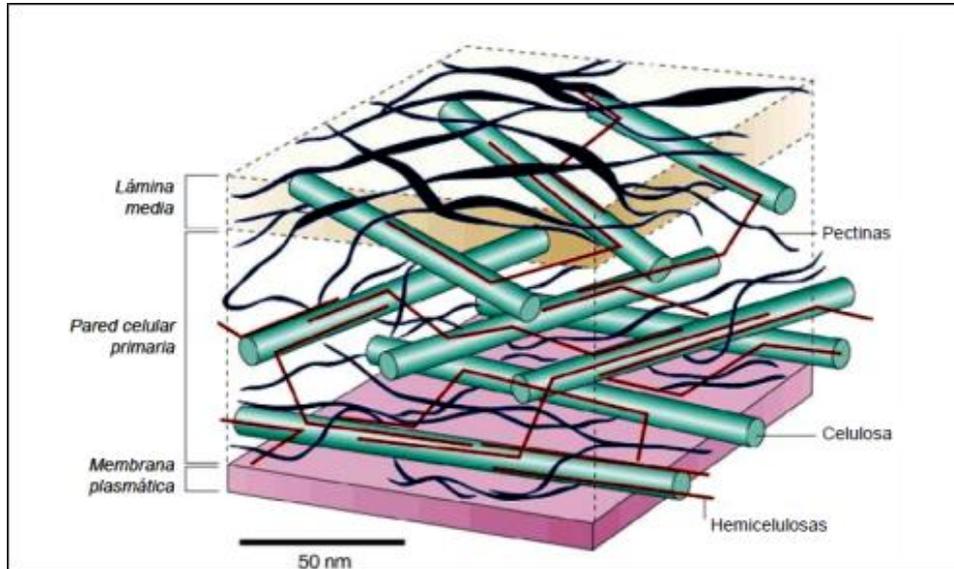


Fig. 1. Modelo aceptado de la pared celular. Hemicelulosas: líneas rojas; celulosa: cilindros celestes, pectinas: líneas negras (Tomado de Rosli, 2007).

La pared celular está compuesta por:

Celulosa: Constituye cuantitativamente la mayor fracción en la pared celular. Es una estructura ordenada en forma de fibras y su función principal es conferir rigidez a la pared celular. Consiste en un polímero no ramificado formado por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos (β -1,4) y su función principal es asegurar la rigidez de la pared celular vegetal. Las microfibrillas de celulosa forman una estructura paracrística estabilizada por puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, con cadenas orientadas de manera paralela y antiparalela (Soriano Lasheras, 2004).

Hemicelulosas: son polisacáridos muy heterogéneos que constituyen los segundos por orden de abundancia en la pared celular vegetal. Son polisacáridos neutros, conteniendo habitualmente glucosa o xilosa, que presentan una cadena principal relativamente larga con ramificaciones cortas, se asocian con las microfibrillas de celulosa para formar una matriz entrecruzada.

Pectinas: es el tercer grupo de polisacáridos de la pared celular, está constituido por las denominadas sustancias pécticas, las cuales están formadas por un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (AGA) unidos en enlaces α -1,4. Las sustancias pécticas son una mezcla compleja de polímeros ácidos y neutros, que se caracterizan por su capacidad para formar geles y actuar como sustancias cementantes en la lámina media y la pared primaria (Soriano Lasheras, 2004).

Lignina: es la sustancia más abundante en la matriz de la pared celular de las plantas leñosas. Es un polímero formado por restos fenilpropanoides, derivados de los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico, aumenta la resistencia química y la rigidez de la pared (Basanta, 2013).

Entre las diferentes cadenas de polisacáridos de la pared celular se pueden formar entrecruzamientos de naturaleza covalente o no, para generar una estructura rígida. Entre los entrecruzamientos no covalentes se cuentan los enlaces puente de hidrógeno, presentes principalmente entre la celulosa y la hemicelulosa, los enlaces iónicos entre las cuales se encuentran las uniones en las que participan cationes divalentes, normalmente Ca^{2+} , las cuales se presentan entre cadenas de pectina.

Los polisacáridos constituyentes de las paredes celulares vegetales representan un alto porcentaje de la biomasa vegetal. Estos determinan gran parte de los atributos de calidad de frutas y vegetales frescos como así también su comportamiento durante el proceso de manufactura de alimentos.

1.2 Sustancias pécticas

Las sustancias pécticas son polisacáridos ácidos complejos, que están localizados principalmente en la matriz de la pared primaria y laminilla media de plantas superiores. Actúan como controladoras de la porosidad y difusión pasiva de diversos solutos y participan en la regulación de los procesos de elongación y abscisión. Las sustancias pécticas representan entre el 0,5 % al 4 % del peso húmedo del material vegetal. Como todos los polisacáridos, no tienen un peso molecular definido, este depende de la fuente de la cual se obtienen, generalmente está entre 25 a 369 kDa (Jayani *et al.*, 2005).

1.2.1 Estructura química de las sustancias pécticas

Las sustancias pécticas están formadas por un esqueleto de residuos de ácido D-galacturónico (AG), unidos por enlaces glicosídicos α -1,4. Esta cadena constituye el ácido poligalacturónico o ácido péctico (APG) (Fig. 2).

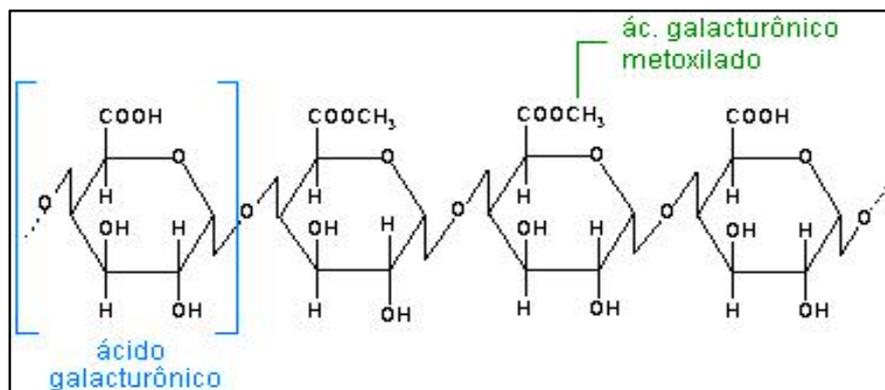


Fig. 2. Estructura molecular básica de la pectina (tomado de <https://www.ecured.cu/Pectina>)

Los grupos carboxilos de los restos de AG pueden estar esterificados con metanol en una proporción variable.

Como parámetro de la cantidad de grupos esterificados con metanol se usan alternativamente dos criterios distintos, a saber: el grado de esterificación (GE) y el contenido de metoxilos. El GE, se define como el número de residuos de AG esterificados sobre el total de ellos, expresado en tanto por ciento. El contenido de metoxilos se calcula relacionando la masa total de grupos metoxilos con la masa total de restos de AG (esterificados o no). Un GE de 100 % (todos los grupos carboxilos neutralizados con metanol) corresponde a un contenido de metoxilo de 16,32 %. Este parámetro es la base para la clasificación de las sustancias pécticas: si el compuesto tiene un GE entre el 3,5 al 10 %, se considera que son ácidos pectínicos y si superan este porcentaje se denominan pectinas.

Las pectinas a su vez se clasifican en: pectinas de bajo metoxilo (LM) si presentan un $\text{GE} < 50 \%$ (contenido de metoxilos $< 8 \%$) como las de papa, pera, receptáculos de girasol y pectinas de alto metoxilo (HM) si poseen un $\text{GE} > 50 \%$ (contenido de metoxilos $> 8 \%$), como las de cítricos y manzanas.

La esterificación de los grupos carboxilos del AG con metanol es una característica muy importante que le confiere a las pectinas sus propiedades estructurales y funcionales. El número de restos metilados y/o acetilados depende de la fuente de la cual se obtuvo la pectina (Iglesias y Lozano, 2004).

Pocos son los vegetales que presentan una estructura tan simple, en su mayoría las pectinas poseen una estructura más compleja. Las pectinas contienen dos regiones bien definidas. La primera es la región denominada lisa y la segunda es la denominada región pilosa (Contreras-Esquivel, 2003).

Región lisa: compuesta principalmente por los esqueletos de restos de AG, parcialmente esterificados con metanol en el C-6 y/o con ácido acético en C-2. A esta estructura se la denomina homogalacturonano (HG) y debido a que no contiene esencialmente ramificaciones o cadenas laterales se la denomina región lisa.

Región pilosa: en esta región también denominada ramnogalacturonano (RG), se pueden a su vez distinguir dos tipos de estructuras diferentes:

a) RG tipo I: en esta región, la cadena lineal de ácido D-galacturónico se interrumpe por la presencia de L-ramnosa (forma piranósica) unida mediante enlaces α -1,2. A estos residuos de ramnosa se unen cadenas de D-galactosa unidas por enlaces β -1,4, o en otros casos cadenas de L-arabinosa, unidas por enlaces α -1,5. A partir de estos azúcares pueden originarse otras ramificaciones del mismo tipo, o en ocasiones formadas por otros azúcares como D-xilosa, D-glucosa, D-manosa, L-fucosa y ácido D-glucurónico, dependiendo del vegetal de origen de la pectina. Estas ramificaciones representan un 20-40 % de la cadena total.

b) RG tipo II: lo conforman cadenas laterales de diferentes azúcares unidos directamente a los residuos de AG. Esta región puede ser considerada como una modificación estructural del HG y normalmente está en una posición adyacente al RG tipo I.

En la Figura 3 se muestra la estructura esquemática de la pectina, y se identifican claramente las regiones principales que la conforman.

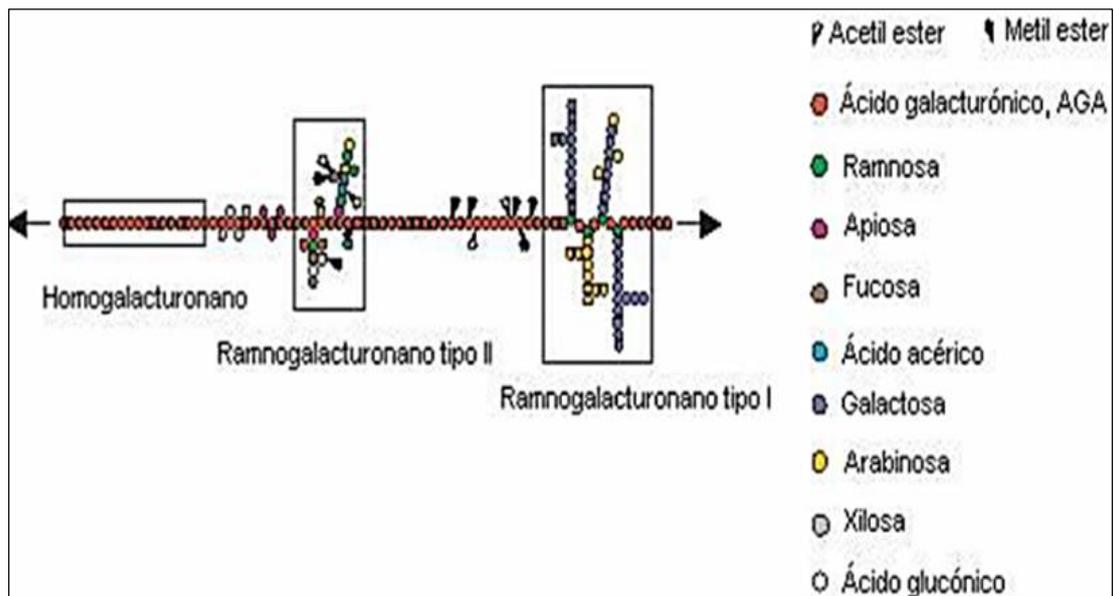


Fig. 3. Estructura esquemática de la pectina (Pedrolli et al., 2009)

1.2.2 Clasificación de las sustancias pécticas

Históricamente, las sustancias pécticas han sido consideradas como aquellos polisacáridos ácidos de los tejidos vegetales que son extraídos con agua caliente, ácido diluido u oxalato de amonio y otros agentes quelantes. Estas características de solubilidad han permitido clasificar las sustancias pécticas en: pectina soluble en agua, la cual puede ser extraída del tejido vegetal con agua caliente o soluciones salinas diluídas; pectina soluble en agentes quelantes, que se extrae con soluciones de EDTA, CDTA, hexametáfosfato, imidazol, etc., y protopectina que se solubiliza por calor en presencia de ácido o álcali. Estas características de solubilidad de las sustancias pécticas fueron aceptadas originalmente por la American Chemical Society y aún son empleadas por algunos investigadores. Los procedimientos de extracción diferencial son convenientes pero no enteramente selectivos, por lo que es recomendable clasificar a los polisacáridos pécticos de acuerdo a sus características estructurales.

En 1927 un comité designado por la American Chemical Society aborda por primera vez la problemática de la estructura y nomenclatura de las sustancias pécticas. En 1944, otro comité reunido a instancias del anterior, las definió como: “sustancias coloidales que se encuentran en las plantas, compuestas por unidades de ácido D-galacturónico cuyos grupos

carboxilos están esterificados con metanol en una proporción variable”. Las sustancias pécticas pueden ser clasificadas en cuatro grupos principales según la American Chemical Society (Olsen, 1941):

Acidospécticos o ácido poligalacturónico: se denomina así a las sustancias pécticas compuestas por ácido poligalacturónico, libre de grupos éster metílicos.

Acidospectínicos: son sustancias pécticas coloidales, parcialmente esterificadas con grupos metílicos.

Pectinas: así son designados aquellos ácidos pectínicos solubles en agua, de elevado contenido en ésteres metílicos, capaces de formar geles con azúcares y ácidos. Las pectinas constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos ácidos con propiedades de gelificación, estabilización de emulsiones y aporte nutricional, siendo por lo tanto sumamente útiles en las industrias alimenticias y farmacéuticas. Su precursor es la protopectina.

Protopectina: es la sustancia péctica insoluble en agua en el estado en la cual se halla naturalmente en los tejidos vegetales. Produce pectina soluble luego de una hidrólisis limitada mediante tratamiento con enzimas, ácidos u otros reactivos. Se encuentra fija en los tejidos vegetales, ligada a los componentes celulósicos de las paredes celulares. Se la puede considerar como un derivado de ácido poligalacturónico de alto peso molecular que está químicamente unido y mecánicamente inmerso dentro de otros constituyentes de la pared celular vegetal. Puede ser extraída del tejido vegetal por métodos degradativos únicamente (Jayani, *et al.*, 2005).

1.2.3. Propiedades de las pectinas

Solubilidad: Las pectinas son solubles en disoluciones acuosas, propiedad que se utiliza para elaborar geles y sustancias viscosas. Los enlaces metílicos provocan una separación entre las cadenas de polipéptidos lo que las hace más solubles (Sánchez-Villarruel *et al.*, 2011). Cuanto mayor sea el grado de esterificación, mayor será la solubilidad. Pueden ser insolubles en presencia de calcio (o de otros cationes bivalentes) por la formación de pectatos cálcicos que van a precipitar. También son insolubles en etanol, acetona y otros solventes orgánicos.

Gelificación: Desde el punto de vista de la tecnología alimentaria la propiedad más importante de las pectinas es su capacidad para formar geles, propiedad que depende del grado de metilación:

- a) *Pectinas de alto metoxilo (HM):* las pectinas HM sólo gelifican en presencia de concentraciones relativamente altas de azúcar y en medio ácido. Se producen zonas de unión en la molécula por interacciones hidrofóbicas entre los ésteres metílicos y formación de puentes de hidrógeno. Para la gelificación de las pectinas de HM es necesario un pH inferior a 3,5, de esta manera, los grupos ácidos se encuentran no disociados y pueden formar puentes de hidrógeno. Además es necesaria una concentración de sólidos solubles mayor al 60 % para que se favorezcan las interacciones hidrofóbicas. La mermelada es un ejemplo claro, es ácida, tiene alta concentración de azúcares, y por ello la pectina está en estado de gel. Para elaborar estos geles, se solubiliza la pectina por calentamiento y se gelifica al enfriar. La fuerza del gel vendrá dada en función del grado de esterificación; a mayor grado de esterificación, mayor serán las interacciones hidrofóbicas por lo que el gel será más fuerte. Además, comenzará a gelificar a temperaturas más altas.
- b) *Pectinas de bajo metoxilo (LM):* las pectinas LM, gelifican en ausencia de azúcar pero en presencia de concentraciones de iones, particularmente divalentes (Ca^{+2}). Las condiciones que deben darse son: presencia de calcio, un pH entre 1,0 y 7,0 o incluso mayor. Si la cantidad de calcio es muy elevada dará lugar a la precipitación de pectato cálcico.

1.3 Enzimas utilizadas en alimentos

La producción de enzimas para uso industrial se ha desarrollado gradualmente, desde finales del siglo XIX, cuando se produjeron en Dinamarca y Japón las primeras preparaciones de renina (extracto salino del estómago de terneros) y de amilasa fúngica (Carrera, 2003). El uso de enzimas tiene el potencial de aumentar la productividad, la eficiencia y la calidad en el procesamiento industrial de alimentos y su importancia no solo radica en las ganancias que se obtienen de su uso, sino en la mejora de los procesos de fabricación y las propiedades sensoriales de los alimentos. Su eficacia como catalizadores radica en que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas mucho más que cualquier catalizador artificial conocido, y además son altamente específicas ya que cada una de ellas induce la transformación de un sólo tipo de sustancia por lo que los procesos catalizados por enzimas en

la industria son cada día más numerosos. Se derivan de diversas fuentes tales como tejido vegetal, tejido animal y microorganismos, siendo éstas las más abundantes (Badui Dergal, 2006).

Las enzimas microbianas son más útiles que las derivadas de plantas por la gran variedad en que se presentan y su bajo costo de producción. Además, son más estables y su proceso de producción es más fácil y seguro. La manipulación genética y ambiental, para incrementar el rendimiento o la actividad enzimática de las células, puede llevarse a cabo fácilmente utilizando células microbianas debido a su corto tiempo de generación y a sus exigencias nutricionales relativamente simples (Souza *et al.*, 2003).

Los microorganismos producen una gran variedad de enzimas potencialmente útiles y algunas de ellas, en lugar de mantenerlas dentro de la célula, las excretan al medio de crecimiento (Carrera, 2003). Las enzimas extracelulares pueden digerir nutrientes insolubles como celulosa, proteínas, almidón, pectinas. Los productos de la digestión son transportados al interior de la célula donde se utilizan como nutrientes para el crecimiento. Estas enzimas se utilizan en la industria de alimentos, farmacéutica y textil.

Las enzimas a ser utilizadas en los alimentos deben estar reconocidas como inocuas y deben estar incluidas en la lista GRAS de la Food and Drug Administration (FDA).

Varias enzimas importantes de uso comercial se producen en gran escala por procesos microbianos, empleando hongos, levaduras o bacterias nativas o genéticamente modificadas, incluyendo enzimas digestoras de almidón (amilasa), de proteínas (proteasas, renina), de pectina (pectinasas) y de lípidos (lipasas).

Las enzimas no microbianas más notables son la papaína, presente en la planta *Carica papaya*, utilizada en cervecería y en el procesamiento de alimentos y la quimosina, extraída del cuarto estómago de los terneros sin destetar utilizada en la manufactura del queso.

1.4 Enzimas microbianas de interés biotecnológico

Se han identificado unas 5.000 enzimas, pero se cree que este número es apenas una fracción del número total de enzimas que existen en la naturaleza. Alrededor del 62% de las enzimas se consume en alimentos, 33% en detergentes y 5% en textiles y curtiembres (Arroyo *et al.*, 2014). Tomando en cuenta las tendencias modernas hacia procesos de producción

diseñados para que sean amistosos con el medio ambiente y que sean sostenibles, la biotecnología aplicada a la producción de enzimas se erige como la mejor alternativa en el desarrollo de procesos de producción (Thomas, *et al*, 2013).

Las enzimas microbianas presentan algunas ventajas en comparación con las provenientes de plantas y animales, las cuales pueden ser estacionales. Considerando la producción de enzimas de microorganismos, existe un suministro confiable de materia prima para hacer enzimas microbianas siempre que sea necesario, y su producción en biorreactores se controla fácilmente. Las microbianas producidas por fermentación pueden ser excretadas al medio, por lo que se logra obtener altos rendimientos de recuperación en comparación con las intracelulares de animales y plantas (Vermelho *et al.*, 2013). Por lo tanto, las fuentes de enzimas derivadas de microorganismos como hongos, levaduras y bacterias, son las responsables de la mayoría de las producidas por año, las cuales representan más del 85% del total del mercado (McAuliffe, 2012).

La selección de microorganismos para producir enzimas históricamente fue empírica, a partir de muestras de muy diversas fuentes naturales. El desarrollo de los procesos de fermentación durante la última parte del siglo pasado, se dirigió específicamente a la producción de enzimas mediante el uso de cepas seleccionadas y con microorganismos vivos. Además, se hizo posible la producción de enzimas purificadas a partir de preparaciones bien caracterizadas incluso a gran escala.

Un grupo importante de enzimas lo constituyen las amilasas, enzimas que degradan el almidón (Bernal y Bernal, 2014). Entre ellas se encuentran las α -amilasa, β -amilasa y amiloglucosidasa.

Las principales aplicaciones de estas enzimas extracelulares consisten en la conversión del almidón en jarabes que contienen glucosa, maltosa y oligosacáridos, en la producción de azúcares fermentables en cervecería, en la obtención de bebidas alcohólicas y en la modificación de la harina de panadería. Entre ellas, las más importantes son la α -amilasa producida por *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *Aspergillus oryzae* y la amiloglucosidasa de *A. niger* (Vargas y Silver, 2002). La β -amilasa junto con las α -amilasas se utilizan en la preparación de jarabe de maltosa a partir de almidón; la glucoamilasa junto con la α -amilasas para la obtención de glucosa a partir de almidón (Sánchez *et al.*, 2005).

Las proteasas, son otro grupo importante de enzimas con distintas aplicaciones, constituyen aproximadamente al 50% del mercado de las enzimas microbianas (Vázquez *et al.*, 2008). Las proteasas fúngicas se emplean como ablandadoras de productos cárnicos, siendo también significativa la utilización de la proteasa fúngica de *A. oryzae* para la modificación de la masa del pan. Las proteasas bacterianas se emplean, entre otras cosas, en la industria del cuero. Las proteasas de *B. subtilis* son termoestables y tienen un pH óptimo fuertemente básico de 10 – 11, siendo por lo tanto utilizada en detergentes (Carmona, 2011).

Las pectinasas catalizan la división de sustancias pécticas, son ampliamente utilizadas en el procesamiento industrial de frutas y vegetales, ya que disminuyen la viscosidad de los jugos y facilitan los procesos de extracción, maceración, liquefacción y clarificación. La fuente principal de producción de las pectinasas son los hongos, principalmente del género *Aspergillus*.

Las celulasas comerciales producidas por cepas de *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum* y *A. niger*, tienen en la actualidad aplicación limitada en el procesamiento de alimentos, en cervecería, en la producción de alcohol y en el tratamiento de desechos (Centeno y Pavone, 2015). Su mayor potencial comercial consiste en la conversión de la lignocelulosa y la celulosa de la madera en glucosa.

La glucosa isomerasa es la enzima intracelular comercial más utilizada en la industria alimentaria, para convertir la glucosa en fructosa durante la producción de jarabe de maíz ricos en fructosa (Arroyo *et al.*, 2014). Las lactasas comerciales, bacterianas y de levaduras, producidas con *Kluyveromyceslactis*, *Kluyveromycesfragilis* y *Bacillus* spp también son enzimas intracelulares muy utilizadas (Parra, 2009).

Otras enzimas extracelulares microbianas importantes son las lipasas fúngicas, que se utilizan para mejorar el aroma de los quesos y otros alimentos y las enzimas pécticas o pectinasas.

1.5 Enzimas pécticas

Las enzimas que hidrolizan sustancias pécticas se conocen como enzimas pécticas, enzimas pectinolíticas o simplemente pectinasas. Las enzimas pécticas constituyen el único grupo de enzimas que catalizan la degradación de las sustancias pécticas presentes en la pared

celular de las plantas, por lo tanto juegan un rol significativo en los cambios que ocurren en el almacenamiento post cosecha de frutas y vegetales. Se encuentran de manera natural en frutas y vegetales, pero también son producidas por microorganismos

Las enzimas pécticas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en plantas superiores (cítricos, tomates, bananas, manzanas, peras, papas, uvas, etc.) y en microorganismos, tanto en bacterias (de los géneros *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clostridium*, etc.) como en hongos filamentosos (de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, etc.) y levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Geotrichum lactis*, etc.) (Blanco *et al.*, 1999; Geralda Da Silva *et al.*, 2005).

Las pectinasas fueron algunas de las primeras enzimas que se utilizaron en la industria. Su aplicación comercial se observó por primera vez en 1930 para la preparación de vinos y jugos de frutas. Sólo en la década de 1960 la naturaleza química de los tejidos vegetales se hace evidente y con este conocimiento, los científicos comenzaron a utilizar una mayor gama de enzimas de manera más eficiente. Como resultado, las pectinasas son una de las enzimas más importantes del sector comercial, especialmente para la industria de los zumos de fruta, como prerrequisitos para obtener jugos bien clarificados y estables con mayores rendimientos (Tapre y Jain, 2014)

1.5.1 Clasificación de enzimas pécticas

Debido a la diversidad de sustancias pécticas que existen en la naturaleza, las enzimas pécticas presentan diferentes mecanismos de acción y se las puede clasificar en tres grupos: enzimas desesterificantes, enzimas depolimerizantes y protopectinasas (Fig. 4) (Martos *et al.*, 2014).

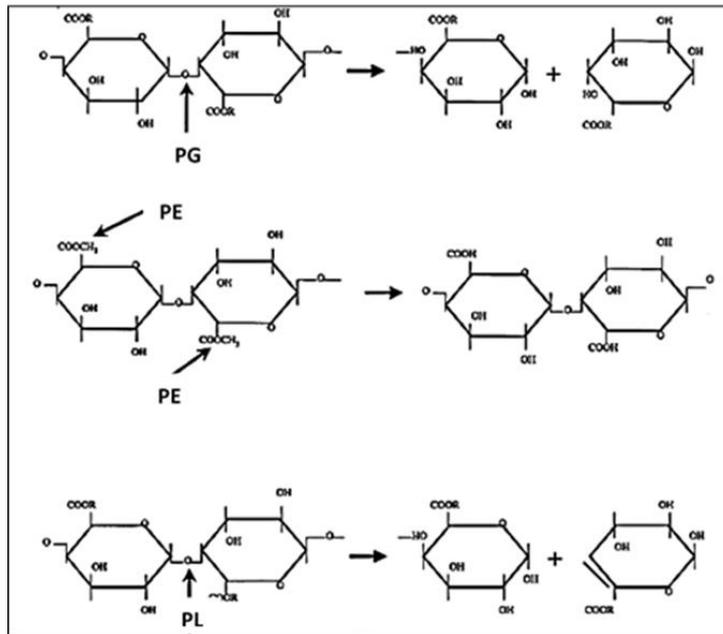


Fig. 4. Mecanismo de acción de las diferentes enzimas pécticas(Gummadi y Panda, 2003)

1.5.1.1 Enzimas desesterificantes (pectinesterasa):

La enzima pectinesterasa (PE, EC 3.1.1.11), cataliza la desesterificación de los grupos metil- ester de los galacturonanos de las sustancias pécticas liberando ácido péctico y metanol. PE remueve los grupos metoxilos de la molécula de pectina mediante un ataque nucleofílico de la enzima sobre el éster, que resulta en la formación de un intermedio entre el grupo acilo y la enzima con liberación de metanol. Luego se produce la hidrólisis del intermedio regenerándose la enzima y produciéndose ácido carboxílico. Las pectinesterasas son producidas por plantas superiores, numerosos hongos y algunas bacterias (Jayani *et al*, 2005).

La actividad pectinesterasa puede ser medida por diferentes métodos, usualmente por .titulación de los grupos carboxilos producidos a partir de pectina o por métodos colorimétricos, utilizando un indicador de pH (Avallone *et al.*, 2000).

Propiedades fisicoquímicas y biológicas de PE: La actividad PE es mayor con pectinas con un grado de metilación del 65 al 75 %, ya que actúa sobre grupos metoxilos adyacentes a grupos carboxílicos libres. Los PM de la mayoría de las PE están en el rango de 35-50 kDa. Los valores de pH en los cuales presentan su mayor actividad están en el rango de 4,0 a 8,0. Las PE producidas por hongos tienen un pH óptimo menor que aquellas de origen bacteriano. El rango de temperatura en los cuales presentan su mayor actividad está entre 40 – 50 °C para la mayoría de las PE (Jayani *et al.*, 2005).

1.5.1.2 Enzimas depolimerizantes (poligalacturonasas y liasas):

1. *Poligalacturonasas (PGasas)*: son enzimas pécticas que catalizan la ruptura de los enlaces glicosídicos α -(1,4) de las cadenas de Ácido poligalacturónico (APG). Se clasifican según su modo de acción en endo-PGasas (EC 3.2.1.15) y exo-PG (EC 3.2.1.67)(Van Rensburg y Pretorius, 2000). Las endo-PGasas producen ruptura al azar de los enlaces glicosídicos α -1,4 del ácido péctico, liberando monómeros de AG y oligómeros de dos o tres restos. Son producidas por una gran variedad de hongos filamentosos, levaduras y bacterias, como así también por plantas superiores (Souza *et al.*, 2003). Las endo-PGasas pueden ser medidas por determinación de los grupos reductores liberados, mediante métodos colorimétricos, pero los más utilizados hacen uso de viscosímetros, ya que producen más de un 50 % de caída en la viscosidad. Su actividad disminuye con el grado de polimerización, de manera tal que resulta nula en presencia del dímero. Las exo-PGasas hidrolizan las uniones α -1,4 de los enlaces glicosídicos a partir del extremo no reductor de la cadena de ácido péctico, dando AG como producto mayoritario de la reacción. La depolimerización se interrumpe por la ramificación que ocurre en el sustrato. Son menos frecuentes y se encuentran en plantas superiores, en el tracto intestinal de numerosos insectos, en hongos y en algunas bacterias(Jayani *et al.*,2005). Se ha informado que exo-PGasa fúngica produce AG como producto final, mientras que la exo-PG bacteriana produce ácido digalacturónico como principal producto final. La acción de exo-PGasa produce un gran incremento en la formación de grupos reductores. La actividad exo-PGasa se mide por determinación de grupos reductores liberados mediante métodos colorimétricos.

Propiedades fisicoquímicas y biológicas de poligalacturonasas (PGasas): las PGasas, aisladas de diferentes fuentes microbianas, difieren marcadamente unas de otras con respecto a sus propiedades físicoquímicas y bioquímicas y su modo de acción. Independientemente de la fuente microbiana, las PGasas, son activas bajo condiciones de acidez moderada, presentando un pH óptimo en el rango de 3,5 a 5,5, apropiado para el procesamiento de frutas y vegetales (Ortega *et al.*, 2004; Favela-torres *et al.*, 2006). Sin embargo, se han informado algunas PGasas alcalinas provenientes de *Bacilluslicheniformis* y *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersci*, con un pH óptimo de 11,0 o PG ácidas como la de *A. kawachi*, la que presentó actividad a pH entre 2,0 y 3,0 (Esquivel y Voget, 2004). La mayoría de las PGasas presentan mayor actividad a temperaturas moderadas, entre 30-50

°C (Blanco *et al.*, 1999). Se encontraron algunas PGasas que pueden hidrolizar sustancias pécticas a mayores temperaturas como las producidas por *Bacilluslicheniformis* y *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersci*(Jayani *et al.*, 2005).

En la Tabla 1 se presentan las propiedades más importantes de algunas PGasas producidas por diferentes microorganismos.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de algunas PGasas microbianas.

Fuente	PM (kDa)	pI	K _m	T ópt. (°C)	pH ópt.	T estab. (°C)	pH est	Ref.
<i>Aspergillus japonicus</i>	38 (PG I)	5,6	–	30	4 – 5,5	-	–	Jayani, 2005
	65 (PG II)	3,3	–	30	4 – 5,5	-	–	
<i>Aspergillus niger</i>	61 (PG I)	–	0,12	43	3,8–4,3	50	–	Jayani, 2005
	38 (PG II)	–	0,72	45	3 – 4,6	51	–	
<i>Aspergillus awamori</i>	41	6,1	–	40	5	50	4 – 6	Nagai <i>et al.</i> , 2000
<i>Fusarium oxysporum</i>	38	–	–	69	11	–	7 – 11	Jayani, 2005
<i>Lentinus edodes</i>	–	–	–	50	5,0	–	–	Zheng y Shetty, 2000
<i>Bacillus licheniformis</i>	38	–	–	69	11	–	7 – 11	Jayani, 2005
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	42	4,8	0,8	50	4	–	–	Jayani, 2005
	41,5	4,8	0,5	50	3,5	–	–	
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	43	5,4	–	50	4,2	–	–	Jayani, 2005
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39	–	4,7	45	5,5	50	4,5–6	Jayani, 2005

2. *Liasas (o transeliminadas)*: producen una ruptura no hidrolítica de las sustancias pécticas, mediante un mecanismo de transeliminación. Rompen los enlaces glicosídicos α -1,4 de la molécula de ácido péctico por un mecanismo de β -eliminación, descubierto por Albersheim y col. (1960), formando un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 por cada enlace glicosídico roto. Los mejores sustratos para esta enzima son las pectinas altamente esterificadas. Las liasas se pueden clasificar en función del tipo de sustrato que ellas degradan y según su modo de acción en: pectatoliasas (PAL), las que actúan sobre sustancias pécticas de bajo grado de metoxilación (endo-PAL, EC 4.2.2.2 y exo-PAL, EC 4.2.2.9) y pectinliasas (PL)

(EC 4.2.2.10) que actúan sobre pectina altamente metoxilada. Las liasas son producidas principalmente por bacterias y hongos filamentosos (Jayani *et al.*, 2005). El método más conveniente para medir la actividad de las PL o PAL, se basa en el incremento de la absorbancia a 235 nm producido por la formación de dobles enlaces. PL actúa sobre pectina altamente esterificada, sin la acción previa de PE, por lo que su utilización en la industria de jugos puede resultar ventajosa. Aumenta la estabilidad de los jugos de frutas porque se reducen los efectos floculantes que aparecen cuando, por acción de PG y PE, se generan derivados de pectina desesterificados los que se ponen en contacto con el Ca⁺² proveniente de la fruta (Bogdanoff, 2015).

Propiedades físicoquímicas y químicas: PL en general necesitan iones Ca⁺² para tener actividad y por ello los agentes quelantes como el EDTA actúan como inhibidores.

La mayoría de las liasas tienen pesos moleculares entre 30 y 40 kDa, con un pI de 7,0 a 11,0. Tienen un pH óptimo de actividad en la región alcalina (7,5 - 10) y temperaturas óptimas de 40-50 °C. Una exo-PL termoestable de *Bacillus* sp., presentó máxima actividad a pH 11,0 y 69 °C y fue dependiente de Ca⁺². Otras liasas termoestables fueron producidas por *Bacillus* sp. TS 47 y *Fusarium moniliforme* (Jayani *et al.*, 2005).

1.5.1.3 Protopectinasas (PPasas):

Las enzimas que catalizan la solubilización de protopectina, liberando pectina soluble de los tejidos vegetales, se conocen como enzimas solubilizadoras de pectina o protopectinasas (PPasas) (Nakamura *et al.*, 1995). Estas PPasas son un grupo heterogéneo de enzimas con diferentes actividades catalíticas. Varias PPasas han sido aisladas y caracterizadas y han sido clasificadas en dos tipos dependiendo de sus mecanismos de acción: PPasas tipo A y tipo B. Las PPasas tipo A son aquellas que reaccionan sobre una región específica del homogalacturonano (región lisa) de la protopectina, liberando pectina de alto peso molecular. Las PPasas tipo B son las que actúan sobre las cadenas de azúcares neutros que conectan la región del ramnogalacturonano (región ramificada) con los demás constituyentes de la pared celular, liberándose pectina de mayor peso molecular que en el caso particular de las PPasas tipo A. La actividad PPasa se determina midiendo la cantidad de sustancias pécticas liberadas a partir de protopectina. La pectina solubilizada es cuantificada y expresada como equivalentes de AG liberado (Ferreira *et al.*, 2002).

En la Figura 5 se muestra un esquema de la estructura de la protopectina y se representan los productos de las diferentes formas de acción de las PPasas.

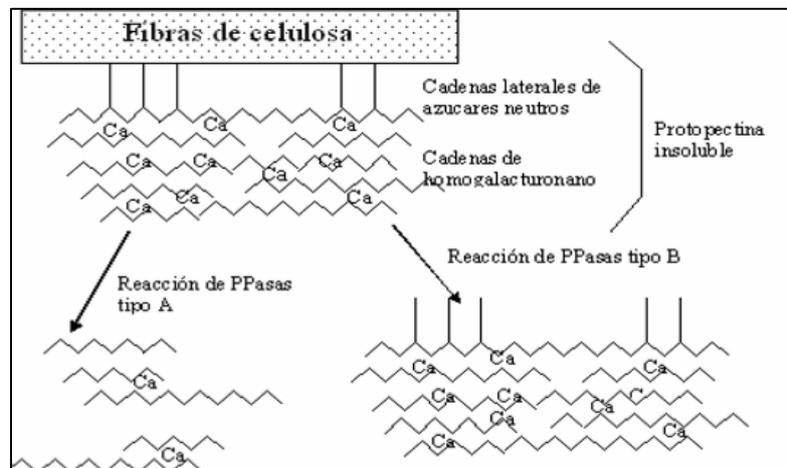


Fig. 5. Estructura esquemática de protopectina (Soriano Lasheras, 2004).

1.5.2 Principales aplicaciones de las enzimas pécticas

Las pectinasas microbianas son importantes desde el punto de vista industrial principalmente por su uso en el procesamiento de frutas y vegetales (elaboración de vinos, extracción y clarificación de jugos de frutas, extracción de aceites vegetales, maceración de vegetales, etc.) (Kashyap *et al.*, 2001; Hoondal *et al.*, 2002). Estas enzimas han sido utilizadas desde hace más de 60 años y sus aplicaciones continuarán expandiéndose ya que constituyen una herramienta indispensable en esta rama de la tecnología. La mayoría de las enzimas pécticas provenientes de hongos o levaduras, son activas bajo condiciones de acidez moderada (3,5 a 5,5), apropiado para el procesamiento de frutas y vegetales, considerando la naturaleza ácida de los mismos (Ortega *et al.*, 2004) y a temperaturas relativamente bajas (30 – 50 °C), lo que permite retener el color y el sabor de los alimentos.

Las principales aplicaciones de las enzimas pécticas se encuentra en los siguientes procesos:

1.5.2.1 Maceración:

Algunas pectinasas (particularmente las PPasas) tienen la capacidad de liberar sustancias pécticas cementantes de la pared celular de las plantas, produciendo la maceración de los tejidos vegetales (Sainz, 2008). En el proceso de maceración, la pectina insoluble

presente en la laminilla media es degradada, con la consiguiente liberación de células individuales y agregados celulares. Para tal propósito, únicamente el material cementante intercelular (laminilla media) y parte de la pared celular primaria de las plantas debe ser degradado, sin dañar la pared celular secundaria, a los efectos de evitar la lisis celular. De este modo las células conservan muchos de sus compuestos intracelulares, entre los cuales se cuentan carotenoides, vitaminas C, B6, B9 y E y flavonoides, compuestos que poseen reconocidos beneficios sobre la salud (Martos *et al.*, 2014). Este método presenta ventajas sobre la disgregación mecánica ya que conserva intactos el flavor, los pigmentos y los componentes celulares, compuestos con propiedades sumamente interesantes en ciertos productos alimenticios. Los procesos de maceración química o mecánica provocan un alto rompimiento celular, lo que implica que las propiedades nutritivas de los tejidos se ven afectadas negativamente (Franchi *et al.*, 2014).

El proceso de maceración mediante enzimas pécticas es empleada en la industria alimenticia para la obtención de néctares de frutas como peras, duraznos, damascos, frutillas; y de purés de vegetales como papa, zanahoria, ají rojo y otros, con alto contenido de sólidos, pigmentos y vitaminas, que se emplean en la alimentación de bebés y adultos mayores. Por el contrario, los procesos de maceración química o mecánica provocan un alto rompimiento celular, lo que implica que las propiedades nutritivas de los tejidos vegetales se vean afectadas negativamente.

La maceración enzimática depende de la concentración de enzima, del pH, tiempo de reacción y de la velocidad de agitación (Nakamura *et al.*, 1995). La velocidad de agitación debe ser tal de manera de generar el suficiente esfuerzo de corte como para minimizar las fuerzas de atracción entre las células y así promover su separación, pero a su vez no debe ocasionar el rompimiento de ellas de tal forma que se deteriore la calidad del producto obtenido.

Por otra parte, existen preparados enzimáticos capaces de degradar completamente el material vegetal, proceso denominado desintegración. Están formados por una mezcla de celulasas, hemicelulasas y pectinasas. Son utilizados mayoritariamente para elaborar purés y para mejorar el rendimiento durante la extracción de jugos de frutas.

1.5.2.2 *Extracción y clarificación de jugos de frutas:*

Las pectinas aumentan la turbidez y la viscosidad de los jugos de frutas, dificultando los procesos de extracción, filtración y clarificación. Los jugos de frutas son generalmente

extraídos bajo presión, pero esto no es fácil en el caso de frutas blandas como frutillas, manzanas, frambuesas, arándanos, etc. Las pectinasas se adicionan a la masa prensada de frutas para degradar a la pectina que causa la gelificación de la pulpa, facilitando así el proceso de filtración y asegurando altos rendimientos de jugo (Kashyap *et al.*, 2001; Tari *et al.*, 2007). Los jugos que habitualmente se someten al proceso de clarificación son aquellos cuyas características organolépticas y su aceptación por el público mejoran por el hecho de ser transparentes como por ejemplo los jugos de manzana, pera y uva. Estos jugos deben ser tratados enzimáticamente a fin de degradar las pectinas y los polisacáridos. Se utilizan pectinasas que hidrolizan las pectinas y provocan la precipitación de complejos proteína-pectina. Mientras que en los jugos de naranja y pomelo, debe lograrse una estabilización de las suspensiones coloidales mediante el uso de enzimas pécticas, ya que el consumidor prefiere un jugo turbio (Sin *et al.*, 2006).

a) Jugos de pera y manzana: luego de la obtención del jugo de fruta por prensado, el producto obtenido presenta cierta turbiedad debido a la presencia de restos de tejidos y a complejos formados por proteínas positivamente cargadas rodeadas de una capa de pectina con carga negativa (conocida como nube). Estos complejos proteína-pectina no precipitan debido a repulsiones electrostáticas y le confieren al jugo un aspecto poco atractivo. En un medio ácido (jugo manzana, pH 4,5) las moléculas de pectinas tienen cargas negativas y por lo tanto se repelen unas con otras. El agregado de una mezcla de PG y PE produce la degradación de la capa externa de pectina, permitiendo la exposición sobre la superficie de las partículas de proteínas contenidas en su interior. Esto genera zonas de carga positivas y zonas de carga negativas sobre las partículas, la repulsión electrostática se reduce promoviendo su interacción, se forman flóculos que sedimentan lentamente dejando un sobrenadante transparente. Posteriormente el jugo se centrifuga o filtra con tierra de diatomea para eliminar las partículas suspendidas (Sin *et al.*, 2006). En los extractos comerciales de pectinasas de origen fúngico, usados para la clarificación de jugos de frutas, coexisten tres tipos de enzimas: liasas, PGasas y PE. Estas enzimas en combinación hidrolizan pectina. Los jugos así obtenidos contienen metanol (por la acción de PE). Es difícil precisar si esto constituye o no un peligro para la salud, debido a la toxicidad del metanol. De cualquier forma este puede ser eliminado con el vapor durante la concentración.

El proceso de clarificación es afectado por el pH, la temperatura, tiempo de clarificación, y concentración de enzima. Un jugo con bajo pH clarificaría más rápido que uno con mayor pH, y respecto a la temperatura, se trabaja mejor en un rango entre 40 y 60 °C, a temperaturas mayores ocurre la desnaturalización de la enzima. El tiempo necesario para que ocurra la clarificación es inversamente proporcional a la concentración de enzima usada (Kashyap *et al.*, 2001).

b) Jugos de naranja y pomelo: contrariamente a los jugos de manzana y pera, en los jugos cítricos se utilizan las enzimas pécticas para obtener jugos turbios. En este tipo de jugos, la pérdida de turbidez del jugo es indeseable. Cuando los frutos se exprimen, la PE endógena desesterifica los grupos metilos de la molécula de pectina creando regiones con cargas negativas, las que interaccionan con iones Ca^{+2} presentes naturalmente en el jugo, dando lugar a la precipitación de pectatos de calcio y la consiguiente autoclarificación, dejando un sobrenadante claro. Las altas temperaturas de pasteurización que se utilizan para controlar el crecimiento microbiano, inactiva la PE y de este modo previene la precipitación (Croak y Corredig, 2006). Una alternativa para evitar el uso de altas temperaturas es el tratamiento controlado con enzimas pécticas (PG y PL). La degradación parcial de pectina mediante el uso selectivo de una PG o PL, genera productos de bajo peso molecular no precipitables con el calcio y de este modo evita la autoclarificación.

c) Jugo de limón: a diferencia del jugo de naranja, el de limón se vende como un jugo claro cuando es destinado a la elaboración de bases de bebidas gaseosas. Los métodos tradicionales de clarificación dependen de la cantidad de pectinesterasa nativa. Los sólidos suspendidos son precipitados en presencia de calcio como pectatos de calcio, pero el proceso puede llevar de 4 a 16 semanas, por lo que se deben agregar conservantes para evitar una proliferación microbiana. Las enzimas fúngicas exhiben la actividad pectinolítica incluso en medios muy ácidos (pH 2,2 a 2,8). Su uso asegura una clarificación en un término de 6 h sin necesidad de utilizar conservantes.

d) Vino: debido a la presencia de pectina en las uvas, se dificulta el prensado y la extracción del jugo. Las enzimas pécticas utilizadas durante la maceración en la producción de vino tinto facilitan la liberación del contenido celular de la baya de uva. De este modo, se producen vinos con más color, más ricos en compuestos fenólicos e igualmente más fáciles de clarificar y filtrar, comparados con los vinos sin tratamiento enzimático. El uso de PE aumenta el nivel de

metanol, pero la pequeña concentración de pectina disponible para la acción enzimática es limitada y dichos valores están dentro de lo permitido.

1.5.2.3 *Extracción de aceites:*

Los aceites de girasol, coco, palma, oliva, etc., se extraen normalmente con solventes orgánicos. El más utilizado es el hexano, el cual es un potencial cancerígeno. Las pectinasas se utilizan para degradar las paredes celulares y extraer el aceite vegetal en un proceso acuoso por liquefacción. Para la extracción del aceite de oliva, las enzimas son adicionadas durante la molienda de las aceitunas, así el aceite es liberado y se separa fácilmente. El tratamiento enzimático incrementa los costos, pero produce un mayor rendimiento en la extracción del aceite (Kashyap *et al.*, 2001; Hoondal *et al.*, 2002).

1.5.2.4 *Tratamiento de fibras*

En la industria textil, las pectinasas han sido empleadas en la maceración y el tratamiento de fibras textiles brutas: lino (*linum usitatissimum*), cáñamo (*Cannabis sativa*) y yute (*Carchuessa*). También han sido utilizadas en la preservación de maderas, aumentando la permeabilidad de éstas a los preservantes tradicionales (Rodríguez Gámez y Serrat Díaz, 2008)

1.5.2.5 *Fermentación del té y el café*

Las pectinasas son de gran utilidad para aumentar la productividad y la eficiencia en las fermentaciones naturales. Así, por ejemplo, aceleran la fermentación del té y eliminan la espuma que forman los granos debido a la destrucción de la pectina. Por otra parte, en la fermentación húmeda de las semillas de café, la adición ex profeso de preparados de pectinasa proveniente de levadura, permite reducir a aproximadamente la décima parte el tiempo de fermentación previa del café para lograr la separación final de las partículas de pericarpio aún adheridas a las semillas (Rodríguez Gámez y Serrat Díaz, 2008).

1.5.2.6 *Alimento animal*

Pueden ser usadas conjuntamente con otras celulasas y carbohidrasas en la formulación de alimento animal para facilitar la asimilación de los nutrientes por los animales. Reducen la viscosidad del alimento, lo cual incrementa la absorción de los nutrientes, al liberarlos por la hidrólisis de las fibras no biodegradables (Rodríguez Gámez y Serrat Díaz, 2008).

1.5.2.7 Otras aplicaciones

a) *Extracción de pectina:* La liberación enzimática de los monosacáridos que constituyen la estructura de la pectina tienen diferentes aplicaciones dentro de la industria de los alimentos y otros campos, y estos compuestos constituyen importantes herramientas en los procesos industriales: la arabinosa es un precursor de L-fructosa y L-glucosa, los cuales pueden ser utilizados como edulcorantes, y también transformados a 5-deoxi-L-arabinosa, un compuesto que tiene propiedades antiparkinsonianas. El ácido galacturónico puede ser enzimáticamente convertido en ácido ascórbico, o puede ser usado para producir agentes surfactantes por esterificación con varios ácidos grasos, y la ramnosa puede ser transformada químicamente en aromas usados en sabores de caramelos y frutas.

b) *Extracción de almidón:* El almidón es un polímero que sirve como almacén de nutrientes en las plantas. No sólo es una importante reserva para las plantas sino también en los seres humanos, con una alta importancia energética, proporcionando gran parte de la energía diaria necesaria a través del consumo de los alimentos. El almidón es uno de los principales componentes de muchas raíces entre ellas de la mandioca, el mismo que se obtiene separando los gránulos de almidón del resto de las materias contenidas en la raíz. Los gránulos de almidón se encuentran en el interior de las células conjuntamente con la proteína, las grasas y los carbohidratos solubles entre otros, los mismos pueden ser aislados por un proceso de extracción y posterior purificación. El proceso tradicional de extracción del almidón de mandioca consiste fundamentalmente en romper las paredes celulares para liberar los gránulos de almidón mediante un rallado, seguido de la adición de agua y filtración, lo que permite la separación de las partículas de almidón suspendidas en el medio líquido de aquellas que son relativamente más grandes, como los componentes de la fibra, posteriormente se elimina el agua y se lava el material sedimentado para eliminar las últimas fracciones diferentes del almidón para finalmente someter al almidón purificado a un secado (Alarcón y Dufour, 1998).

Hasta el momento no se encontraron reportes sobre el uso de enzimas para la liberación de almidón por vía enzimática. A través del uso de enzimas pécticas se puede lograr la degradación completa de la pared celular, dando lugar a la lisis y la consiguiente liberación del almidón.

En la Tabla 2 se presentan las aplicaciones principales de las enzimas pécticas.

Tabla 2. Aplicación tecnológica de enzimas pectinolíticas

Enzima	Importancia	Papel tecnológico	Aplicación
PeL	+++		
Exo- y exo-Arasa	+	Procesado de frutas	Extracción de jugo de manzana
RG-hidrolasa	+		
PAE	+		
PME	+++		
PGasa	+++		Jugos concentrados clarificados de manzana, pera, y uva
PeL	++	Despectinización de jugos	
Exo- y endo-Arasa	+		
Galasa	+		
RG-hidrolasa	+		
PAE	+		
PME	+++	Formación de pectato de calcio	Cidra francesa
Arasa	++		Jugo de piña clarificado
Galasa	++	Hidrólisis de gomas	
PGasa	+		
PGasa	+++		
PME	+		
PeL	+	Despectinización de Mostos	Clarificación de mosto de uva
Arasa	+		
Galasa	+		
PME	+++	Desmetoxilación de pectina endógena	Incremento de textura en vegetales
PME	+++	Desmetoxilación de pectina endógena	Extracción de jugo de manzana
PGasa	+++	Hidrólisis de pectinas endógenas	Extracción de pectina
PGasa	+++	Hidrólisis de ácido poligalacturónico	Galacturónico-oligosacáridos
PGasa	+++	Hidrólisis de pectinas	Decorticado enzimático de cítricos

PeL: pectin-liasa; Arasa: Arabinasa; RG-hidrolasa: ramnogalacturonano-hidrolasa; PAE: Pectin acetilesterasa; PME:pectin-metilesterasa; PGasa:poligalacturonasa; Galasa:galactanasa. (Contreras-Esquivel, 2003)

1.5.3 Producción de enzimas pécticas

1.5.3.1 Selección de la cepa productora

El campo de aplicación de las enzimas pécticas se encuentra expandiéndose, lo que demanda seguir descubriendo nuevas cepas productoras de pectinasas con propiedades diferentes de las existentes en el mercado (Nighojkar *et al.*, 2006; Tari *et al.*, 2007). Una seria restricción en la búsqueda de nuevas cepas productoras de enzimas pécticas es el hecho de que pocos microorganismos tienen la aprobación oficial para su uso en la industria alimenticia. Los organismos adecuados para ser usados en la producción de enzimas deben tener un cierto

número de propiedades, entre las que se incluye la facilidad y rapidez de crecimiento en fermentadores grandes con nutrientes sencillos y relativamente baratos.

Además, se debe obtener un alto rendimiento de la enzima, de forma que sea fácil aislarla, purificarla y concentrarla, sin que se produzca la formación concomitante de metabolitos tóxicos. El organismo debe tener características fisiológicas estables y ser fácilmente aceptado por las autoridades encargadas de controlar los alimentos y los fármacos.

Aunque muchos estudios se han hecho con enzimas pécticas de diferentes fuentes, las enzimas pécticas comerciales, utilizadas en las industrias alimenticias, se producen a partir de hongos principalmente del género *Aspergillus*. Los hongos son buenos productores de enzimas pécticas, cuyo pH óptimo se encuentra cerca del pH de muchas frutas el cual está entre 3,0 y 5,5 (Couri *et al.*, 2000; Ortega *et al.*, 2004). Además estos microorganismos son capaces de excretar al medio de cultivo casi el 90 % de las enzimas que producen, lo cual facilita el proceso de purificación (Souza *et al.*, 2003). El hongo filamentoso *A. niger* tiene la ventaja de poseer el status GRAS (generalmente aceptado como seguro), que permite el uso de sus metabolitos, incluyendo sus enzimas extracelulares en las industrias de alimentos, siendo por lo tanto muy utilizado en diversos procesos fermentativos para la producción de enzimas pécticas (Tari *et al.*, 2007). Las preparaciones comerciales de este hongo contienen una mezcla compleja de diferentes enzimas con actividad pectinolítica, incluyendo PG, PL y PE y otras enzimas que degradan otros polisacáridos de la pared celular como celulasas y xilanasas (Nagai *et al.*, 2000; Singh y Rao, 2002; Hasunuma *et al.*, 2003; Rogerson *et al.*, 2009). Esta variedad de enzimas les permite crecer sobre materiales pécticos. Las levaduras en general son capaces de producir un único tipo de enzimas pécticas las que suelen ser endo-PG, no presentan actividad PE y son capaces de liberar metanol (Zapata *et al.*, 2009).

Las levaduras son organismos unicelulares por lo que su crecimiento es relativamente simple y además también son microorganismos GRAS. Estas enzimas pueden ser producidas a bajo costo, como subproductos durante la producción de proteína unicelular (Geralda Da Silva *et al.*, 2005). Los primeros autores en describir la producción de pectinasas por *Saccharomyces fragilis* fueron Luh and Phaff (1951). Desde 1980 se han descrito varias especies de levaduras capaces de producir enzimas pécticas las que pertenecen a los géneros *Candida*, *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Zygosaccharomyces*, diversas especies del género

Saccharomyces incluyendo *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. fragilis*, *K. lactis*, *Geotrichum lactis* (Blanco *et al.*, 1999).

En la Tabla 3 se presentan el tipo de enzimas pécicas producidas por algunos microorganismos.

Tabla 3. Algunos microorganismos productores de enzimas pécicas

Microorganismos	PE	PG	PL	PAL
<i>Aeromonassp</i>				+
<i>Bacillus</i> sp				+
<i>Erwiniaaaroideae</i>		+	+	+
<i>Pseudomonassp</i>	+			+
<i>Xantomonascampestris</i>	+			+
<i>A. niger</i>	+	+	+	
<i>Kluyveromycesfragilis</i>		+		
<i>Penicillium</i> sp.	+	+	+	
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+		+

(Jayani 2005).

Picchia anómala ha sido aislada de diferentes hábitats, y presenta una robustez fisiológica destacable cuando se somete a condiciones de estrés, tales como bajos pH o a bajas actividades acuosas. Es altamente competitiva y puede inhibir a varios otros microorganismos. Debido a su actividad antimicrobiana, es considerada como un agente de biopreservación (Passoth *et al.*, 2011). Varios mecanismos están relacionados a su actividad antimicrobiana, incluyendo la producción de metabolitos volátiles tóxicos y factores killer, que son toxinas secretadas por ciertas levaduras y letales para otras cepas de levaduras más sensibles. Varias cepas de *P. anomala* han demostrado actividad antimicrobiana contra otras levaduras y hongos filamentosos así como también contra bacterias Gram-negativas. En frutas, inhibió a *Botrytis cinerea*, durante el almacenamiento de granos de cereales, inhibió a especies de *Penicillium* y *Aspergillus* y también a *Enterobacteriaceae* (Olstorpe *et al.*, 2010). Otras aplicaciones, como en la producción de enzimas también están siendo evaluadas actualmente (Passoth *et al.*, 2011).

En la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, Misiones, Argentina, se aisló una cepa de levadura pectinolítica a partir de cáscaras de cítricos, la cual fue identificada como *Wickerhamomyces anomalus*, según una re-

clasificación reciente de la especie *Pichia anomala* (Fig. 6) (Kurtzman, 2011; Martos *et al.*, 2013). Esta levadura produce extractos enzimáticos con actividad PGasa. Requiere una fuente de carbono y energía (FCE) rápidamente asimilable para poder crecer (glucosa) y ácido galacturónico, ácido poligalacturónico o pectina, como inductores de la producción de la enzima, aunque estos sustratos no pueden ser metabolizados por el microorganismo. La síntesis de la enzima no fue reprimida por glucosa (Martos *et al.*, 2013a).

En los sobrenadantes del cultivo de *W. anomalus*, no se detectó actividad PE o PL. Otras enzimas capaces de hidrolizar polímeros de la pared celular, tales como celulasas y xilanasas, tampoco fueron detectadas.

PGasa producida por *W. anomalus* fue identificada como una endo-PG. Se logró la purificación de PG a partir del sobrenadante del cultivo mediante un proceso en dos etapas: diálisis y cromatografía de intercambio catiónico. La enzima PG purificada, presentó un PM de aproximadamente 43 kDa, exhibió máxima actividad a pH 4,2, fue estable en un rango de pH de 3,5 a 6,0 y hasta 49 °C durante 10 h. Los valores de Vmax y Km obtenidos, usando ácido poligalacturónico como sustrato, fueron 0,26 mmol/l.min y 0,173 mg/ml respectivamente. Los cationes que produjeron una disminución de la actividad PG fueron K⁺ y Ca⁺² (Martos *et al.*, 2014). Se determinó que esta enzima posee actividad PPasa, capaz de macerar tejidos vegetales (Martos *et al.*, 2013b). Esta propiedad es muy importante para futuras aplicaciones en la industria alimentaria, principalmente para la producción de néctares de frutas o puré de verduras como papa o yuca en sustitución de los métodos mecánicos que producen una gran alteración celular.



Fig. 6. Microfotografía (400 ×) de *Wickerhamomyces anomalus*

1.5.3.2 Factores que influyen en la producción de enzimas pécticas

Para la producción de enzimas pécticas es importante, además de seleccionar la cepa productora, estudiar los factores que influyen en su producción como la composición del medio de cultivo, el pH del medio, la temperatura de incubación, el tiempo de fermentación, el volumen del inóculo y el oxígeno disuelto.

Todos estos factores son críticos en la producción de enzimas pécticas y varían de acuerdo al tipo de cepa utilizada, por lo que estos parámetros deben ser estudiados y especificados para cada cepa de interés. Ellos pueden afectar tanto el crecimiento del microorganismo como la producción de las enzimas y pueden influir además en la estabilidad de las mismas (Malvessi y Da Silveira, 2004).

La síntesis de enzimas pécticas está muy influenciada por los componentes del medio de crecimiento, especialmente por la fuente de carbono (Díaz *et al.*, 2005). Estudios relacionados a los aspectos regulatorios de la producción de pectinasas mediante hongos filamentosos, informaron que las enzimas fueron inducidas por pectina o alguno de sus derivados y que la glucosa reprimió la síntesis de las mismas (Zheng y Shetty, 2000). En general, el proceso de represión ocurre en presencia de altas concentraciones de glucosa u otros azúcares rápidamente metabolizables, que promueven una alta velocidad de crecimiento microbiano.

En varias especies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. tubigiensis*, *A. flavus*, *A. aculeatus*, etc.), la síntesis de las enzimas pectolíticas como PG, PE, PL o PAL, fue inducida por pectina, APG y AG y reprimida por glucosa. Esta cepa también produjo PE y PG en un medio que contenía glucosa como única FCE, lo que indicó que hubo un cierto nivel de enzimas constitutivas.

Por el contrario, en la mayoría de las levaduras, la producción de pectinasas es una capacidad constitutiva porque no se requieren pectina, APG o AG para inducir la síntesis de dichas enzimas (Blanco *et al.*, 1999). Sin embargo, la capacidad pectinolítica de unas pocas especies tales como *Cryptococcus albidus*, *Geotrichum lactis* y *Kluyveromyces fragilis* han sido descritas como inducibles. A su vez, la PG de *Saccharomyces fragilis* fue considerada parcialmente constitutiva porque la actividad fue mayor al crecer en un medio con glucosa y pectina que cuando se utilizó sólo glucosa (Cavalitto y Mignone, 2007).

La expresión de ciertos genes que codifican pectinasas u otras enzimas hidrolíticas está controlada por el pH del medio de cultivo. De este modo, regulando el pH del medio de cultivo es posible modificar la composición del pool enzimático liberado al medio, como fue reportado

para el caso de las diferentes pectinasas producidas por *A. foetidus* (Grebechova y Contreras, 2006).

Los organismos productores de enzimas pécicas son eminentemente aerobios, por lo que la provisión de oxígeno, en condiciones asépticas, durante la fermentación es fundamental.

1.6 Fermentación

Las fermentaciones son biotransformaciones llevadas a cabo por cultivos celulares, en las que se convierte la biomasa o sustratos complejos en productos de valor agregado. Mediante el aprovechamiento de la maquinaria bioquímica de los microorganismos, se producen metabolitos originados para las reacciones biocatalíticas (Luévanos-Escareño *et al.*, 2014).

Para tal efecto, los microorganismos producen enzimas que se encargan de procesar la fuente de carbono para volverla biodisponible para su aprovechamiento a nivel celular. Las fermentaciones generalmente, se emplean para la producción de enzimas a partir de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras. En la Figura 7 se describen las operaciones necesarias para llevar a cabo un proceso de fermentación para la producción de enzimas.

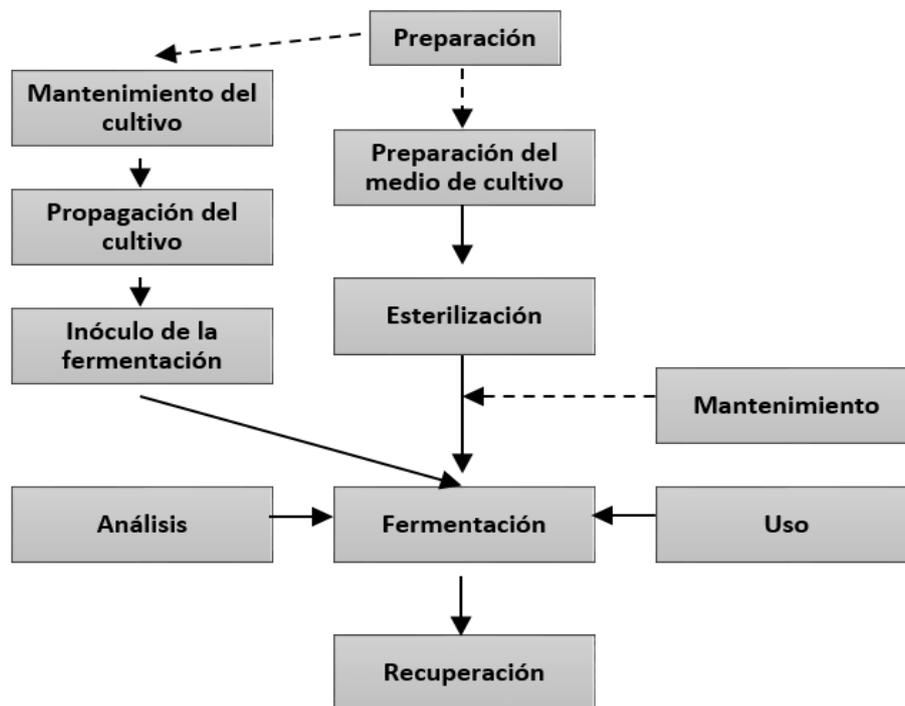


Fig. 7. Operaciones básicas para la producción de enzimas mediante un proceso de fermentación. Adaptado de (Luévanos-Escareño *et al.*, 2014).

Las pectinasas pueden ser producidas ya sea en fermentación en sistema sumergido o en sustrato sólido. El primero permite un mayor control de las condiciones de crecimiento que la fermentación en medio sólido (Costa *et al.*, 2007). El proceso de producción se realiza en aerobiosis, a una temperatura y pH que dependen del microorganismo seleccionado y de la enzima que se desea obtener.

Las fermentaciones en medio líquido (FML), se caracterizan por la utilización de un medio acuoso que contiene los nutrientes necesarios disueltos para que los microorganismos crezcan suspendidos en dicho medio. Las ventajas del uso de estas fermentaciones son la gran homogeneidad del medio de cultivo y el mantenimiento de parámetros tales como el pH y temperatura. Los sustratos líquidos comúnmente utilizados pueden ser melazas, caldos o extractos, en donde los compuestos bioactivos son secretados al medio de fermentación, y a la vez, pueden ser reemplazados por nutrientes. La separación del medio líquido de la biomasa se realiza por una simple filtración o centrifugación, lo cual aporta una gran ventaja tecnológica al procesamiento de los metabolitos producidos (Luévanos-Escareño *et al.*, 2014). Como consecuencia, la FML es el bioproceso más ampliamente utilizado a nivel mundial y del que se tiene más información acerca de su ingeniería y control de procesos (Subramaniyam y Vimala, 2012).

1.7 Recuperación y purificación de enzimas pécticas

Las enzimas microbianas extracelulares, producidas mediante fermentación en cultivo sumergido, se recuperan separando el líquido que contiene la enzima de las células por filtración o centrifugación. En el caso de fermentación en cultivos en medio sólido, se debe agregar agua (o buffer) a la masa semisólida obtenida luego de la fermentación, se prensa la matriz sólida para obtener un extracto enzimático y se continúa con una serie de operaciones similares a las aplicadas en el caso de fermentación en medio líquido.

El sobrenadante o filtrado que contiene la enzima, se concentra y se comercializa como una preparación enzimática líquida normalizada que contiene conservantes y/o estabilizantes o se precipita, con solventes orgánicos o sales inorgánicas, se seca y se muele con el objeto de obtener la enzima en forma de polvo o de gránulos, se mezcla con estabilizadores y es estandarizado con ingredientes inertes (dextrosa, lactosa, sacarosa, almidón, gelatina, glucosa, tierra diatomea), empaquetado y almacenado. En el caso de enzimas pécticas producidas por hongos filamentosos, el filtrado contiene una mezcla de enzimas pectinolíticas, otros productos

metabólicos y restos de nutrientes no asimilados. Para uso como clarificante de jugos no se requiere la separación de cada una de las enzimas (Cevallos, 2015).

En algunas aplicaciones, como por ejemplo durante el procesamiento de ciertos alimentos, se requiere que la enzima de interés este en estado puro, a los efectos de garantizar la calidad del producto final y evitar los cambios de color y aroma debido a la presencia de enzimas contaminantes en el preparado o cuando se necesita garantizar la ausencia de otros componentes tóxicos.

Un viejo axioma biotecnológico sostiene que nunca se debe purificar un compuesto más de lo necesario, pues aumentaría el costo del producto final, con la consiguiente desventaja en el mercado. En general, las enzimas utilizadas en la industria alimentaria no necesitan una purificación extrema comparada con la requerida por algunas de uso terapéutico.

1.8 Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano

A pesar de su complejidad y de que existen miles de reacciones intracelulares, el crecimiento microbiano puede describirse como si fuese una reacción química común.

El medio de cultivo debe contener básicamente, una fuente de carbono y energía (FCE), una fuente de nitrógeno (FN), sales (PO_4^- , SO_4^- , etc.), microelementos (Cu, Zn, Mn, Mo, etc.), pueden haber también factores de crecimiento (vitaminas). Si pensamos al cultivo como si fuese una reacción química, estos serán los reactivos y las células, CO_2 , algún otro compuesto que se forme durante el proceso serán los productos de la reacción.

Teniendo en cuenta únicamente aquellos compuestos del medio de cultivo que se encuentran en mayor cantidad y se consumen en forma significativa, el crecimiento aerobio de las células puede describirse en base al denominado modelo de “caja negra”. En este modelo se considera que la célula es un compartimiento abierto que recibe un flujo de FCE, uno de FN y uno de O_2 y del cual salen flujos de biomasa, CO_2 , H_2O , algún producto (si lo hubiera) y energía (como calor). En este modelo no se hace ninguna suposición sobre el metabolismo celular (Ferreyra *et al.*, 2002).

En la Figura 8 se observa un esquema del modelo utilizado.

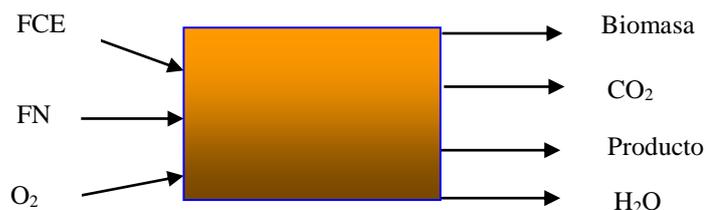
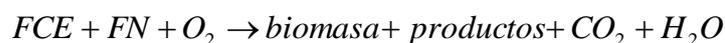


Fig. 8. Esquema del crecimiento celular según el modelo de caja negra.

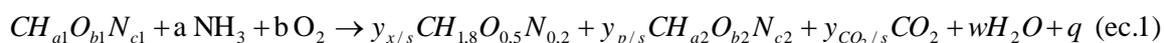
En base a este modelo se puede plantear la ecuación de crecimiento microbiano de la siguiente manera:



A fin de facilitar los cálculos debido a la complejidad de los compuestos involucrados (especialmente la biomasa), se define una cantidad determinada de cada sustancia denominada *carbono-mol* (c-mol) como la cantidad de cualquier compuesto carbonado que contiene 12 g de carbono.

Analizando la composición elemental de una gran cantidad de microorganismos, tanto eucariotas como procariotas, se ha encontrado que existe una regularidad en su "fórmula mínima". Se puede definir un microorganismo estándar o promedio como aquel que posee la siguiente composición expresada en c-mol: $CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$, siendo estos componentes el 95% en masa del microorganismo (el 5% restante son sales). El peso molecular de un c-mol de biomasa será de 25,8 g.

De esta manera el crecimiento microbiano en medio sintético, puede ser representado mediante la siguiente ecuación estequiométrica, referida a un c-mol de FCE:



Los correspondientes coeficientes estequiométricos son:

a: moles de nitrógeno consumido/c-mol de FCE.

b: moles totales de O_2 consumido/c-mol de FCE.

$y_{x/s}$: c-mol de biomasa /c-mol de FCE.

$y_{p/s}$: c-mol de producto/c-mol de FCE.

$y_{CO_2/s}$: moles totales de CO_2 producidos/c-mol de FCE.

1.9 Sistemas de cultivos – Balance de Biomasa en un cultivo batch

La fermentación en medio líquido para la producción de enzimas, se puede llevar a cabo en sistemas tipo *batch*, *batch alimentado (BA)* o *cultivo continuo*.

El cultivo batch o cultivo por lote, es el crecimiento de microorganismos en un volumen fijo de nutrientes que continuamente es alterado hasta su agotamiento por el crecimiento. Se realiza sin intercambio de materia con los alrededores (Muñoz y Catrilaf, 2015). El proceso termina cuando todo el sustrato es consumido por la biomasa.

El término cultivo *batch alimentado (BA)* se refiere a un cultivo *batch* al cual se alimenta continuamente con medio de cultivo fresco o con alguno de sus componentes. Si el nutriente que se alimenta es el limitante del crecimiento, esta técnica permite controlar la velocidad de crecimiento (μ) del microorganismo.

El cultivo continuo no es muy recurrido para la producción ya que gran número de generaciones que transcurren en el mismo hace que sea proclive a la contaminación y a la aparición de mutaciones espontáneas con el consiguiente cambio en la cepa de producción. Los procesos *batch* son simples y robustos pero los microorganismos crecen a velocidades específicas máximas (μ_m) durante buena parte del cultivo, lo cual conlleva a problemas de inhibición por sustrato. Además algunos microorganismos presentan un metabolismo de sobreflujo en el cual, cuando crecen a velocidades específicas elevadas, poseen un metabolismo respirofermentativo, en el que generan producto (etanol) a pesar de poseer suficiente cantidad de oxígeno (efecto Crabtree) (Passoth *et al.*, 2011)

Para un cultivo batch y considerando un componente cualquiera del cultivo, incluida la biomasa, se puede plantear el siguiente balance de materia en el biorreactor:

$$\left(\begin{matrix} \text{velocidad} \\ \text{acumulación} \end{matrix} \right) = \left(\begin{matrix} \text{Veloc.} \\ \text{Entrada} \end{matrix} \right) - \left(\begin{matrix} \text{Veloc.} \\ \text{Salida} \end{matrix} \right) + \left(\begin{matrix} \text{Veloc.} \\ \text{Form.} \end{matrix} \right) - \left(\begin{matrix} \text{Veloc.} \\ \text{Cons.} \end{matrix} \right) \quad \text{ec. 1}$$

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = F_1 \cdot C_{i1} - F_2 \cdot C_i + V \cdot r_{fi} - V \cdot r_{ci} \quad \text{ec. 2}$$

Siendo:

V: volumen del cultivo.

F₁: caudal de alimentación.

F₂: caudal de salida.

C_{i1} : concentración del componente i en la alimentación.

C_i : concentración componente i a la salida (hipótesis mezclado perfecto: $C_{i2}=C_i$).

r_{fi} , r_{ci} : velocidades de formación y consumo del componente i , respectivamente.

Considerando que en un cultivo *batch* los caudales de entrada (F_1) y salida (F_2) son nulos y por lo tanto V se mantiene constante en el tiempo.

Aplicando el balance a la biomasa, la ec. 2 se reduce a:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (\text{ec.3})$$

Siendo:

$\frac{dX}{dt}$: Velocidad de crecimiento microbiano (g/l.h).

μ : velocidad específica de crecimiento (tiempo⁻¹).

X : biomasa (g/l).

Introduciendo la ec de Monod en la ec. 3, se obtiene:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{k_s + S} \cdot X \quad (\text{ec.4})$$

Siendo:

S : concentración de sustrato limitante (g/l).

μ_m : velocidad específica de crecimiento máxima.

k_s : constante de saturación, da una idea de la afinidad del microorganismo por el sustrato (a menor k_s , mayor afinidad).

Al principio del cultivo batch, todos los nutrientes son saturantes, aún el sustrato limitante ($s \gg k_s$) y el microorganismo crecerá a μ_m máximo y constante, entonces la ec.4 se reduce a la siguiente ecuación:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_m \cdot X \quad (\text{ec.5})$$

Integrando se obtiene:

$$\ln X - \ln X_0 = \mu_m \cdot t \quad (\text{ec.6})$$

Esta fase se denomina fase crecimiento logarítmico porque si se grafica el logaritmo de la concentración de células (x) frente al tiempo se obtiene una línea recta cuya pendiente es μ_m y ordenada al origen es $\ln X_0$.

Por lo tanto durante la fase logarítmica, la velocidad de crecimiento (r_x) puede describirse por una ecuación de primer orden, considerando que en esta fase el sustrato limitante está en exceso y la velocidad específica de crecimiento es constante y máxima en las condiciones que se opera. Esta fase continua hasta que se agota un componente del medio (sustrato limitante) o se acumulan sustancias tóxicas y el cultivo entra así en la fase estacionaria de crecimiento.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos y medios de cultivos

2.1.1. Microorganismo

W. anomalus, aislado de cáscaras de citrus en la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (UNaM) en la Provincia de Misiones, Argentina (Martos et al., 2013a).

2.1.2. Medio de cultivos

a) Medio de propagación (g/L): extracto de levadura (Sigma), 5; Triptona (Difco), 5; Glucosa (Britania), 10; Agar (Britania), 15; pH 5,0.

b) Medio de producción (MP) (g/L): glucosa (Britania), 10; pectina de citrus, 5; urea, 1.4; KH₂PO₄, 1; MgSO₄, 0.5; CaCl₂, 0.1; solución de vitaminas (1000 ×), 1 mL/L; solución de microelementos (1000 ×), 1 mL/L; pH 5 (Cavalitto et al., 2000; Martos et al., 2014).

Solución de vitaminas (1000 ×): (Sigma) (μg/L): biotina, 2; pantotenato de calcio, 400; ácido fólico, 2; inositol, 2000; niacina, 400; Ácido p-aminobenzoico, 200; piridoxina, 400; riboflavina, 200; tiamina, 400.

Solución de microelementos (1000 ×) (μg/L): H₃BO₃, 500; CuSO₄•5H₂O, 40; KI, 100; FeCl₃•6H₂O, 200; MnSO₄•H₂O, 400; NaMoO₄•2H₂O, 200; ZnSO₄•7H₂O, 400.

Todos los componentes del medio fueron autoclavados (121°C, 15 min), excepto en los casos de vitaminas y urea, que se esterilizaron por separado mediante filtración a través de un papel de filtro celulósico (0,22 μm, Sartorius).

2.2. Producción de la enzima poligalacturonasa (PG)

2.2.1. Inóculo

A partir de cultivos jóvenes (24 h) de la levadura desarrollada en estrías de medio de mantenimiento, se efectuaron diluciones en agua destilada hasta DO₆₂₀ de 0,96.

2.2.2. Fermentación

Se inocularon frascos Erlenmeyer de 250 mL que contenían 45 mL del medio de producción (MP) con 5 mL del inóculo. Los mismos se incubaron a 30 °C en una incubadora con agitación orbital (MRC, TOU-50N 25 mm de excentricidad) a 180 rpm, durante 16 h (Martos et al.,

2014). Se realizó 1 (uno) pasaje sucesivo (precultivo) y se evaluó el crecimiento y la producción de la enzima en el 2do cultivo.

2.2.3. Estudio de la influencia de las condiciones de cultivo

Las fermentaciones se realizaron variando las condiciones de cultivo (temperatura, pH y agitación), mediante la aplicación de un diseño factorial 2^3 . Estos factores se analizaron en dos niveles: alto (+1) y bajo (-1). Las variables codificadas y las respectivas variables reales, se presentan en la Tabla 4. Basado en el diseño factorial, se confeccionó una matriz con 8 experimentos (Tabla 5). Las fermentaciones se realizaron en un orden aleatorio, con tres repeticiones de cada experimento y los resultados se presentan como valores medios. El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo con el programa estadístico Statgraphics Centurión XV.

Tabla 4. Valores reales y codificados de los factores para diseño factorial 2^3

Factor	Código	Niveles del factor	
		Alto (+)	Bajo (-)
Temperatura	A	50	30
pH	B	6	3
Agitación	C	250	150

Tabla 5. Diseño a niveles alto y bajo para cada factor.

tc	A	B	C	Exp
1	30	3	150	1
a	50	3	150	2
b	30	6	150	3
ab	50	6	150	4
c	30	3	250	5
ac	50	3	250	6
bc	30	6	250	7
abc	50	6	250	8

*A: Temperatura; B: pH; C: Agitación.

Los cultivos se llevaron a cabo según se describió en el ítem anterior (2.2.2) y se incubaron bajo las condiciones determinadas según el diseño experimental planteado, durante 16 hs. Finalizada la fermentación, la totalidad de cada frasco Erlenmeyer fue centrifugado y el EE conservado hasta su utilización como fuente de enzima extracelular.

2.3. Optimización de las condiciones de cultivo

Una vez seleccionados los factores que influyen en la producción de la enzima por *W. anomalus*, se aplicó la metodología de superficie de respuesta, utilizando el diseño experimental de Doehlert (Doehlert, 1970), para optimizar las condiciones de cultivo para la producción de la enzima. Se realizaron un total de nueve experiencias, las que estudiaron el efecto de dos variables independientes a cinco niveles cada una, con tres repeticiones en el punto central (Butiuk *et al.*, 2015).

Los factores estudiados fueron Temperatura (30°C- 50°C) y pH (3-6). Los valores reales y codificados de las variables independientes de acuerdo al diseño experimental, se presentan en la Tabla 6.

Los cultivos se llevaron a cabo según se describió en el ítem 2.2.2 y se incubaron bajo las condiciones determinadas según el diseño experimental planteado, durante 16 hs. Finalizada la fermentación, la totalidad de cada frasco Erlenmeyer fue centrifugado y el EE conservado hasta su utilización.

Las experiencias se realizaron por triplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios. Las curvas de superficie de respuesta se obtuvieron a través del programa estadístico Statgraphics Centurión XV para determinar los niveles óptimos de las variables para la producción máxima de la enzima PGasa.

Tabla 6. Valores codificados y reales utilizados en el diseño experimental de Doehlert.

Experiencia	Valores codificados		Valores reales	
	Temperatura	pH	Temperatura (°C)	pH
1	1	0	50	4,5
2	0,5	-0,866	45	3
3	-0,5	-0,866	35	3
4	-1	0	30	4,5
5	-0,5	0,866	35	6
6	0,5	0,866	45	6
7	0	0	40	4,5
8	0	0	40	4,5
9	0	0	40	4,5

2.4. Producción de PG a escala biorreactor

Para validar la optimización de las condiciones de cultivo, se evaluó la producción de PGasa por *W. anomalus*, en función del tiempo de fermentación, con las condiciones óptimas, a escala biorreactor de laboratorio.

2.4.1. Precultivos

Se inocularon cuatro frascos Erlenmeyer de 500 mL que contenían 95 mL del medio de fermentación con 5 mL de inóculo (DO620 = 0,96) proveniente de un cultivo joven (24 h) de *W. anomalus* en medio de conservación. Los mismos se incubaron a 30 °C con agitación (180 rpm), durante 20 h. Al cabo de este tiempo, los cultivos (400 mL) se cosecharon por centrifugación. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 100 mL de agua destilada estéril y constituyó el inóculo para la etapa siguiente de fermentación.

2.4.2. Fermentación

Se utilizó un biorreactor de 5 L de capacidad (New Brunswick Scientific CO. INC.; Edison, N. J., U. S. A.; Modelo MA 107), conteniendo 3 L de MP. El fermentador se esterilizó en autoclave (121 °C, 15 min) con la solución de glucosa y pectina a la que se le agregó 300 µL de aceite de

silicona como antiespumante (Sigma). El resto de las soluciones de nutrientes y el inóculo, se mezclaron, antes de su utilización, en un frasco Erlenmeyer de 1000 mL con salida lateral y se utilizó inmediatamente para inocular el biorreactor e iniciar el proceso fermentativo. El cultivo se agitó a 600 rpm y se le suministró aire estéril con un caudal de 2,82 L/min. Se tomaron muestras en función del tiempo y se midió el crecimiento microbiano por medida de DO a 620 nm. Luego las muestras se centrifugaron y el sobrenadante (EE), se utilizó para medir pH, glucosa residual y actividad PG.

2.4.3. Determinaciones analíticas

- a) *Medida de la actividad PG*: Se ensayó midiendo los grupos reductores liberados a partir de una solución de ácido poligalacturónico 2 g/L (Sigma), en una solución tampón de acetato sódico/ácido acético (BAC, 0,2 M, pH 5,0) usando el método Somogyi-Nelson (Anexo). La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 10 minutos. Se realizó una curva de calibración usando ácido galacturónico (GA) como estándar. Una unidad de PG se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de GA por minuto (Cavalitto *et al.*, 2000; Ferreyra *et al.*, 2002).
- b) *Determinación de biomasa*: El crecimiento microbiano (g/L) se siguió por medias de densidad óptica (DO) a 620 nm y por peso seco.
- c) *Glucosa residual*: Se utilizó el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (Glicemia, Wiener, Argentina) (Anexo).

2.5. Concentración del Extracto enzimático

Una vez terminada la etapa de fermentación en el biorreactor, el contenido del mismo fue centrifugado a $2350 \times g$ durante 10 min para remover las células de levadura. El sobrenadante obtenido (EE), se concentró $2 \times$ a presión reducida en un rotavapor a escala banco (Büchi; 30 vueltas por min, a 38 °C) y se mantuvo a -18°C hasta su utilización para la aplicación en tejidos vegetales. Al extracto puro y concentrado se le realizaron medidas de actividad PG utilizando el método de Somogyi Nelson. Cuando fue necesario, las muestras se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37 °C con agitación a los efectos de acelerar el proceso a modo de evitar la desnaturalización de las proteínas presentes.

Esquema general del proceso fermentativo

En la Figura 9 se presenta el esquema del proceso fermentativo para la producción de la enzima PG por *W. anomalous*, a escala biorreactor.

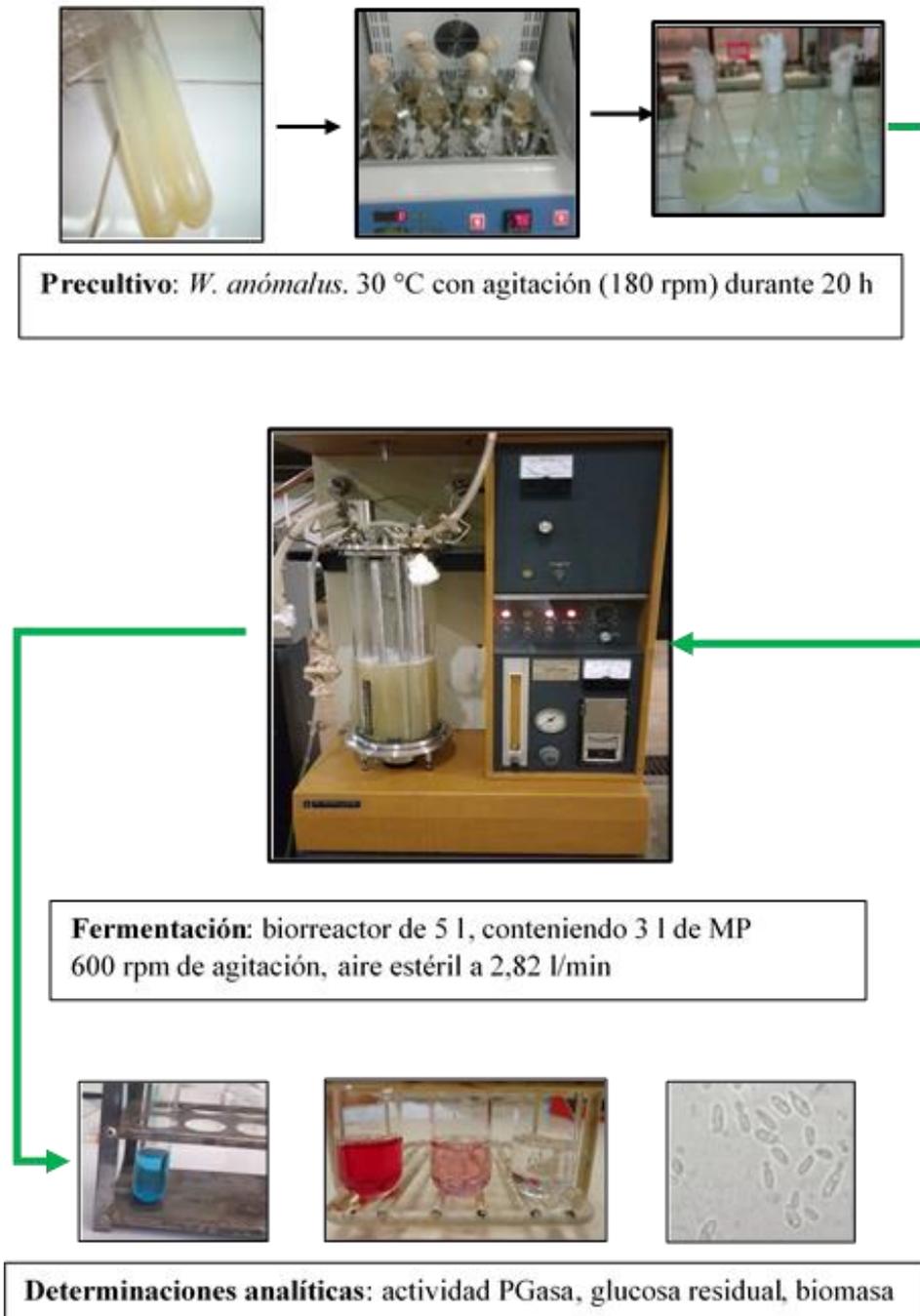


Fig. 9. Esquema del proceso fermentativo de *W.anomalous* a escala biorreactor.

2.6. Aplicación del extracto enzimático en tejido de ají morrón (*Capsicum annuum*).

En la presente etapa, se evaluó la capacidad macerante del extracto enzimático de, *Wickerhamomyces anomalus* sobre tejidos vegetales de morrón (*Capsicum annuum*), mediante un método cualitativo.

2.6.1. Tratamiento de los tejidos vegetales

Los frutos de morrón fueron primeramente lavados con agua destilada. Posteriormente, se cortaron cubos de aproximadamente 5 x 5 mm de lado y 5 mm de espesor.

*2.6.2. Evaluación de la capacidad macerante del extracto enzimático de *W. anomalus**

Se colocaron 15 g de la fruta, en frascos Erlenmeyers de 125 mL, a los que se les agregó 15 mL de la enzima y 35 mL de buffer acetato de sodio/ácido acético (BAC) 0,2 M, al pH óptimo de la enzima (pH 4,5) (Martos *et al.*, 2014). Los frascos se incubaron con agitación (MRC, TOU-50N 25 mm de excentricidad) a 180 rpm, durante 3,5 hs, a 40 °C, dentro del rango de estabilidad de la enzima (Zubreski *et al.*, 2014). Una vez cumplido el tiempo de maceración correspondiente, el contenido total de cada frasco se filtró a través de malla de 20 mesh. El filtrado se recolectó en tubos cónicos graduados de 10 ml. La sedimentación se efectuó a 4 °C, durante 4 h (Martos *et al.*, 2013b). Las células sedimentadas fueron secadas en estufa a 45 °C hasta peso constante. El rendimiento del proceso de maceración se expresó como porcentaje respecto al peso seco del tejido original (% p/p).

La pérdida de coherencia de los tejidos y la presencia de células libres se utilizaron también como indicadores de la actividad macerante (Schwan *et al.*, 1997) . La observación de células libres se efectuó mediante un microscopio Olympus, modelo CH-2, con un aumento de 400×.

En la Figura 10 se presenta el diagrama de flujo del proceso de maceración con el extracto enzimático de *W. anomalus*.

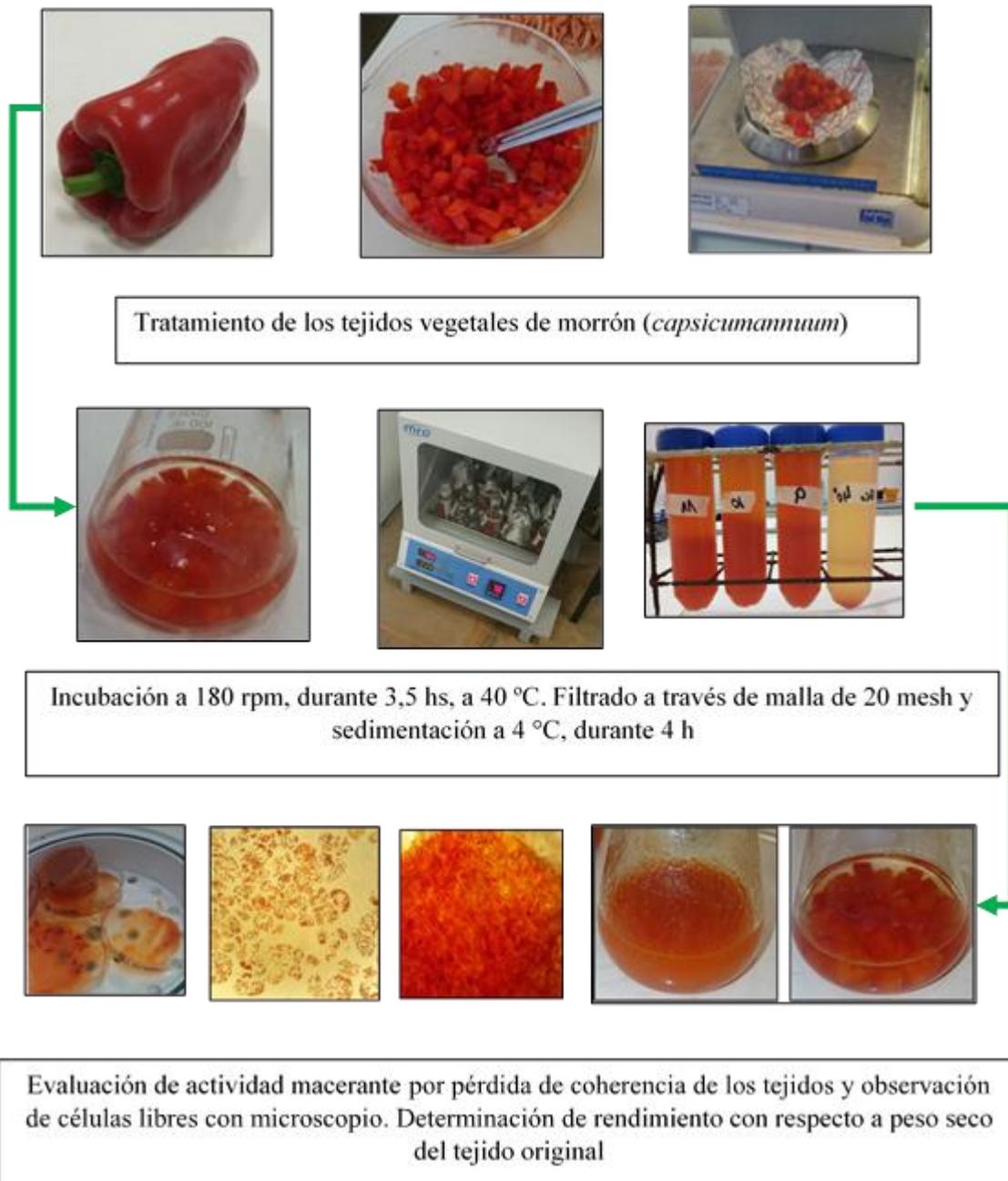


Fig. 10. Proceso de maceración tejidos de morrón con el extracto enzimático de *W. anomauls*.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estudio de la influencia de las condiciones de cultivo

En la Tabla 7 se muestran los valores obtenidos de actividad PG al estudiar el efecto de las tres variables sobre la producción de dicha enzima por *W. anomalus*, a las 16 h de fermentación mediante el diseño factorial 2³. En la Tabla 8, se presenta el Análisis de Varianza (ANOVA).

La Figura 11 muestra el Diagrama de Pareto y la Figura 12 el gráfico de los Efectos Principales.

Tabla 7. Producción de PG por *W. anomalus* mediante el diseño factorial 2³.

Exp	A	B	C	PG(U/mL)
1	30	3	150	22,43± 0,680
2	50	3	150	2,15± 0,113
3	30	6	150	28,42± 0,152
4	50	6	150	1,15± 0,087
5	30	3	250	22,67± 0,440
6	50	3	250	1,50±0,030
7	30	6	250	29,09± 1,263
8	50	6	250	2,35± 0,118

*A: Temperatura; B: pH; C: Agitación

Tabla 8. Análisis de Varianza para la producción de PG mediante el diseño factorial 2³

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	1139,08	1	1139,08	3722,27	0,0000
B:pH	18,7884	1	18,7884	61,40	0,0043
C:Agitacion	0,26645	1	0,26645	0,87	0,4196
AB	19,7192	1	19,7192	64,44	0,0040
Error total	0,91805	3	0,306017		
Total (corr.)	1178,77	7			

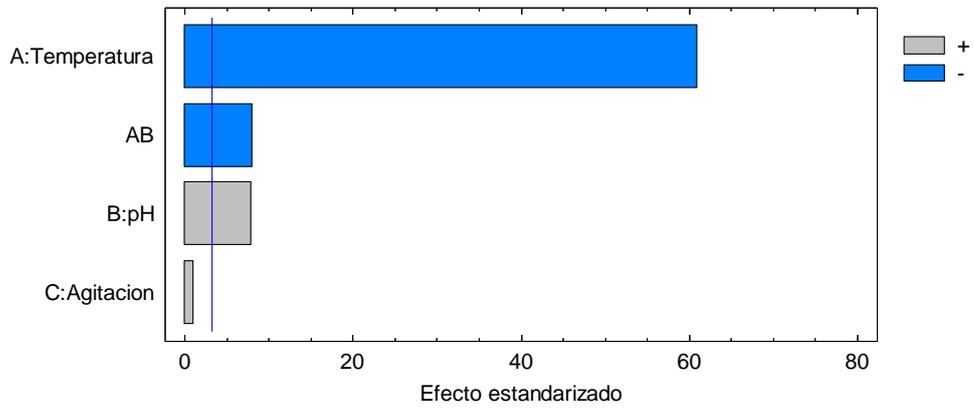


Fig. 11.Diagrama de Pareto para la producción de PGasa por *W. anomalus*

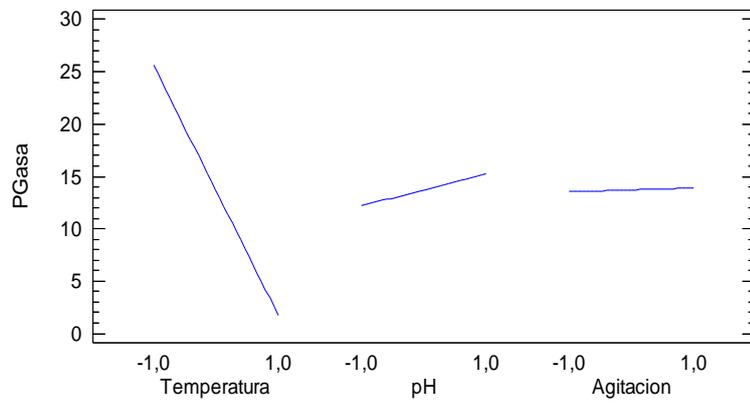


Fig. 12: Gráfica de efectos principales para PGasa

La Tabla de ANOVA (Tabla 8) muestra que la temperatura, el pH y la interacción entre éstos, influyeron significativamente en la producción de PG, siendo el valor de P menor a 0,05, para un nivel de confianza del 95,0%. El R² estadístico (99,9221 %) indicó que el modelo presentó un buen ajuste a los datos experimentales.

El pH influyó de manera positiva sobre la producción de la enzima, mientras que la temperatura lo hizo de manera negativa, al igual que la interacción entre ambos factores. La velocidad de agitación no influyó sobre la misma variable de respuesta. (Figura 11). El aumento de temperatura mostró una marcada disminución en la producción de la enzima (Figura 12).

3.2.Optimización de las condiciones de cultivo

En la Tabla 9 se muestran los valores obtenidos de actividad PG de acuerdo al diseño experimental de Dohelert.

Tabla 9.Valores obtenidos de Actividad PGasa mediante el diseño de Dohelert

Exp.	Temp(°C)	pH	PG(U/mL) ± DS
1	50	4,5	1,55 ± 0,077
2	45	3	1,49 ± 0,054
3	35	3	9,39 ± 0,798
4	30	4,5	28,96± 0,239
5	35	6	17,98± 0,129
6	45	6	2,54± 0,136
7	40	4,5	10,35± 0,064
8	40	4,5	10,20± 0,098
9	40	4,5	10,54± 0,077

La producción de PG por *W. anomalous* en las distintas experiencias realizadas según el diseño experimental de Doehlert se convirtieron en una ecuación polinomial de segundo orden que se presenta a continuación:

$$PGasa \left(\frac{UE}{ml} \right) = -10,3633 - 13,025 * T + 2,78002 * pH + 4,89167 * T^2 - 4,35912 * T * pH - 4,97863 * pH^2 \quad (ec. 7)$$

En dicha ecuación, la temperatura (T) y el pH, representan los valores codificados. El valor de R² para la ecuación es igual a 0,99, de modo que la ecuación presenta un muy buen ajuste a los datos experimentales. El valor R² es siempre entre 0 y 1, y un valor > 0,75 indica idoneidad del modelo. Según la ecuación 1, se puede puntualizar que las dos variables independientes tuvieron un efecto lineal significativo positivo (pH) y negativo (temperatura). La temperatura fue la variable lineal más importante que afectó la producción de PGasa, ya que posee el mayor coeficiente de regresión. Ambos factores tuvieron efectos cuadráticos negativos y positivos, indicando la existencia de un máximo de producción para la temperatura y un mínimo para el pH. Se observó interacción entre ambos factores.

En la Figura 13 se presenta la superficie de respuesta para la producción de PG en función de las dos variables independientes y la Figura 14, la Gráfica de los Efectos Principales.

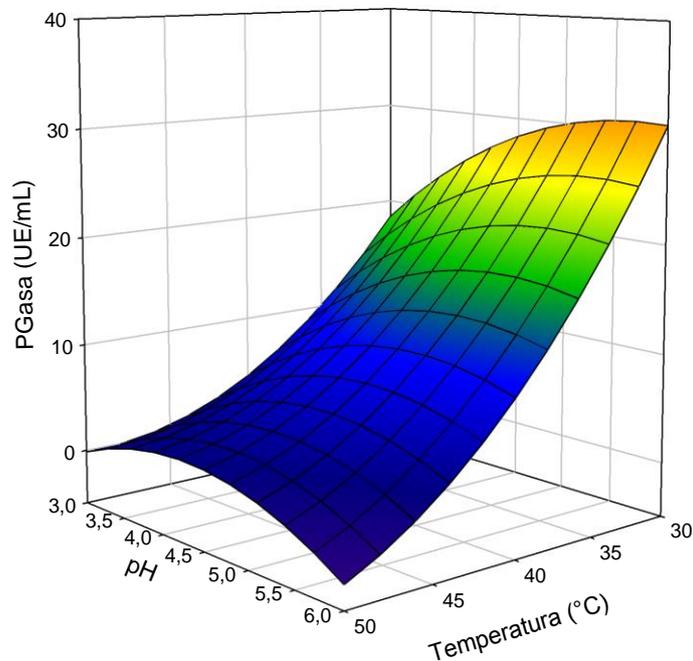


Fig. 13. Superficie de respuesta mostrando el efecto de la temperatura y el pH sobre la producción de PGasa por *W. anomalous*.

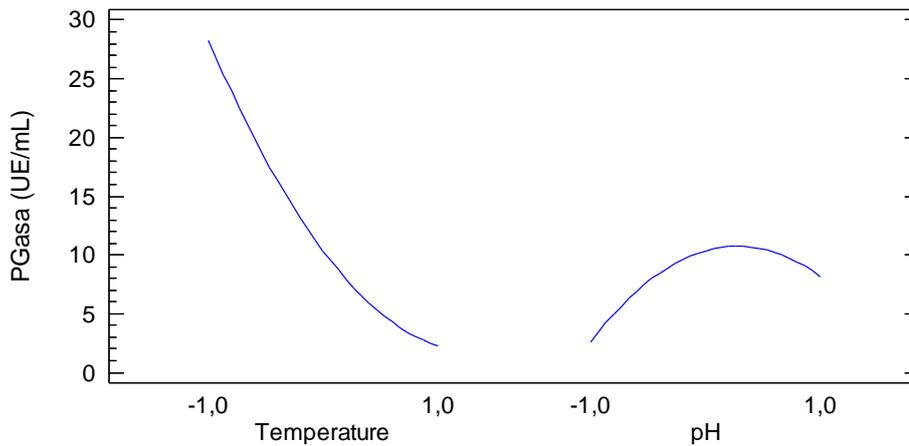


Fig. 14. Gráfica de efectos principales de temperatura y pH en la producción de PG

Las Figuras 13 y 14 muestran que la mayor producción de la enzima se obtuvo a temperaturas bajas y pH en el rango de 5,0 a 6,0. La ecuación 1 permitió determinar los valores óptimos de las dos variables independientes, resultando en una temperatura de 30°C y un pH de 5,7 con un valor máximo de producción de PG de 30,83 UE/mL.

Moyo y *et al.* (2003) determinaron que los efectos de la temperatura y el pH fueron los factores más significativos en la producción de enzimas con actividad pectinolítica de *Kluyveromyces wickerhamii*. Las condiciones óptimas estimadas fueron pH 5,0 y temperatura, 32°C (Moyo *et al.*, 2003). Uzuner y Cekmecelioglu (2015) informaron que la temperatura de fermentación ejerció un efecto significativo sobre la producción de PG por *Bacillus subtilis*, dando altos rendimientos de enzima alrededor de los 30-35°C (Uzuner y Cekmecelioglu, 2015).

3.3. Producción de PG a escala biorreactor

En la Tabla 10 se muestran los valores obtenidos de biomasa, glucosa residual y actividad PGasa en la producción de PGasa a escala biorreactor de laboratorio.

Tabla 10. Resultados experimentales de Producción de PG a escala biorreactor

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)± DS	Glucosa residual (g/L)± DS	PG (UE/mL) ± DS	pH
0	0,42±0,047	9,96±0,099	0,00±0,138	5,7
1	0,79±0,010	9,35±0,112	0,96±0,118	5,7
2	1,01±0,001	9,15±0,145	3,68±0,126	5,7
3	1,18±0,001	8,89±0,221	6,33±0,131	5,7
4	1,64±0,007	8,09±0,182	10,13±0,311	5,6
5	2,05±0,004	7,08±0,190	13,47±0,030	5,6
6	2,31±0,001	6,51±0,158	17,67±0,260	5,5
7	2,53±0,004	5,39±0,142	20,80±0,064	5,5
8	2,77±0,006	3,70±0,078	23,09±0,428	5,5
9	2,87±0,001	2,98±0,081	25,15±0,057	5,5
10	2,89±0,002	1,04±0,047	29,74±0,097	5,4
11	2,94±0,074	0,17±0,004	30,21±0,206	5,4
12	2,99±0,066	0,10±0,006	30,49±0,208	5,4
13	3,02±0,058	0,06±0,003	30,50±0,418	5,3
14	3,03±0,066	0,00±0,000	30,52±0,147	5,3

En la Figura 15 se presentan los perfiles de crecimiento y concentración remanente de la FCE (glucosa) y en la Figura 16 los valores de biomasa y actividad PG de los cultivos realizados a escala biorreactor.

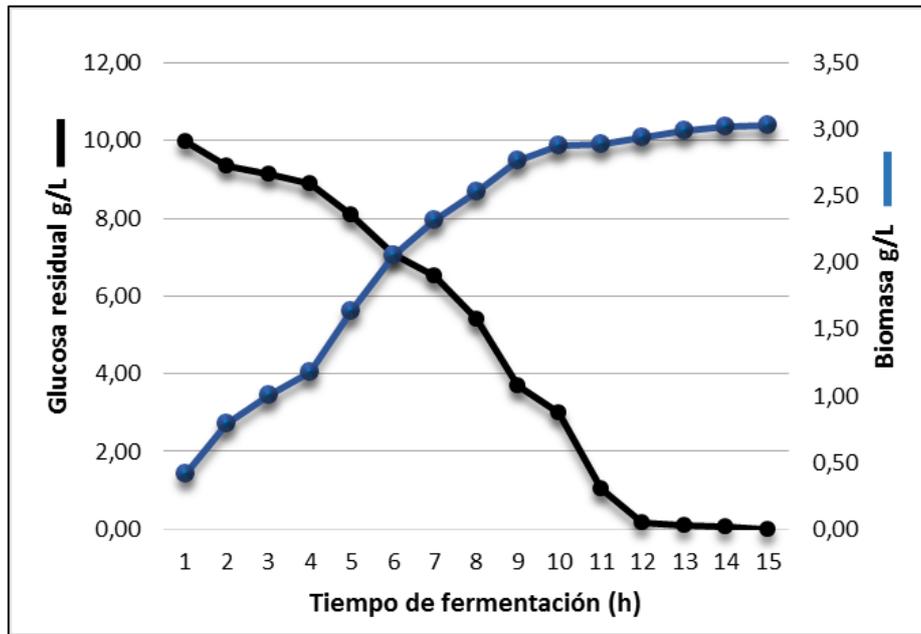


Fig. 15. Producción de biomasa y consumo del sustrato en función del tiempo

La Figura 15 muestra que el microorganismo creció en fase exponencial hasta aproximadamente las 12 h de cultivo, en coincidencia con el agotamiento de la FCE. La biomasa total producida fue de $3,03 \pm 0,905$ g_x/L, obteniéndose un rendimiento ($Y_{x/s}$) de 0,303 g_x/g_s en base a glucosa, valores estos similares al informado para el crecimiento de la mayoría de las levaduras sobre monosacáridos (Cavalitto *et al.*, 2000)

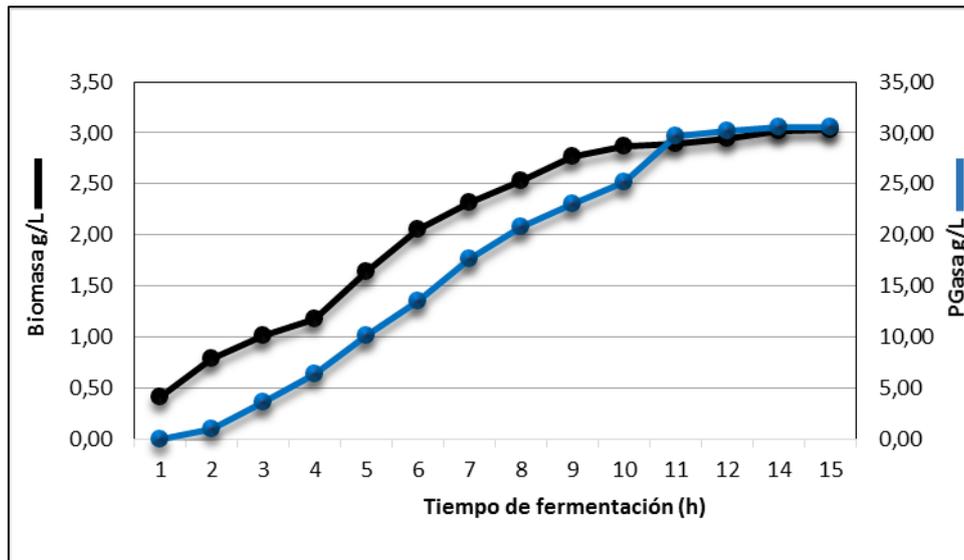


Fig. 16. Producción de PGasa y evolución del cultivo *W. anomalus* en función del tiempo.

A partir de las 2 h de cultivo se detectó actividad PG (Fig. 16). La síntesis de la enzima estuvo asociada al crecimiento de la levadura, alcanzando un valor máximo de producción (30,52 UE/mL), al finalizar la fase exponencial. A partir de este momento, las medidas de actividad enzimática del sobrenadante dieron valores constantes.

De estudios previos se demostró que existe una relación directa entre el crecimiento de la levadura y la expresión de la enzima para el cultivo de *W. anomalus* (Martos *et al.*, 2014).

En la Figura 17 se presentan los valores de pH y actividad PG en el transcurso del cultivo. Como se observa en dicha figura, el pH se mantuvo prácticamente constante en el transcurso del proceso fermentativo.

W. anomalus es un microorganismo ureasa +. La urea es hidrolizada en forma periplasmática liberando amoníaco y dióxido de carbono. Mientras haya FCE en el medio, el NH_3 es asimilado a la biomasa y por lo tanto el pH se mantiene a un valor constante. Cuando la FCE se agota, se detiene el crecimiento, el NH_3 se libera al medio de cultivo incrementando rápidamente el valor del pH del mismo (Cavalitto *et al.*, 2003).

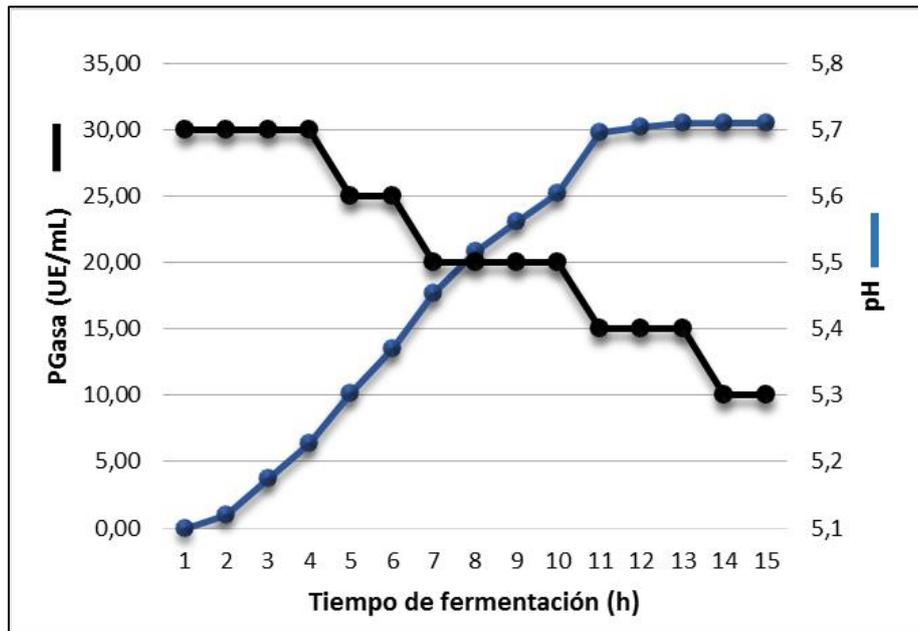


Fig. 17. Producción de PG y valores de pH en el cultivo de *W. anomalous*

En la Figura 18 se representa el $\ln x$ en función del tiempo, a fin de obtener el valor de la velocidad específica máxima del microorganismo (μ_{max}).

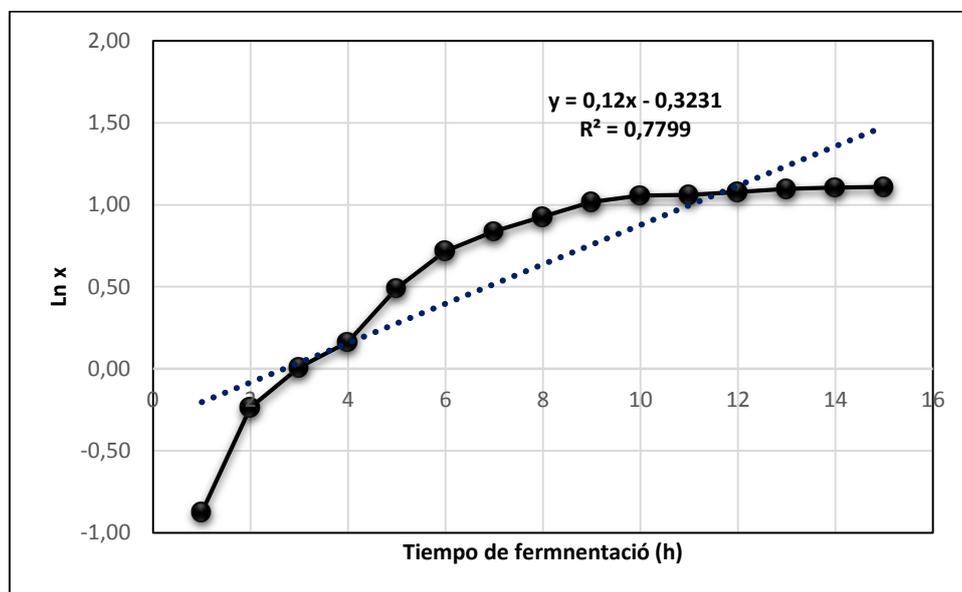


Fig. 18. Grafica $\ln x$ en función de tiempo

Se puede observar que los valores experimentales se ajustaron a una línea recta cuya ecuación es $y=0,12x-0,3231$, dando un valor para el coeficiente de correlación de $R^2=0,78$. La pendiente de dicha recta es la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) con un valor de $0,12\text{ h}^{-1}$ (Fig. 18), la cual para un tipo de microorganismo dado depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura y pH.

Una cepa de levadura aislada de uvas y denominada *S. cerevisiae* Narince 3, al crecer en un medio de cultivo que contenía glucosa, extracto de levadura y sales presentó un valor de μ_{max} de 0.535 h^{-1} (Yalçin y Özbas, 2004).

3.4. Concentración del Extracto enzimático

Las medidas de actividad PG que se realizaron al EE sin ningún tratamiento (extracto crudo) y posterior al proceso de evaporación (extracto evaporado), utilizando el método de Somogyi Nelson se presentan en la Tabla 11

Tabla 11. PGasa de los EE obtenidos en la fermentación

Extracto enzimático	PG (UE/mL)
Ext. crudo	$30,52 \pm 0,11$
Ext. Evaporado (2 ×)	$128,420 \pm 0,126$

3.5. Aplicación del extracto enzimático en tejido de ají morrón (*Capsicum annuum*)

En la Figura 19 se muestra el tejido de morrón, luego del proceso de maceración con el EE de *W. anomalus*. Transcurridas 3,5 h de incubación se observó ablandamiento del tejido vegetal (Fig. 19 A). Los controles realizados con la enzima inactivada mostraron que el efecto de la maceración fue causado principalmente por la actividad PG presente en el extracto enzimático y no por efectos mecánicos producto de la agitación (shear) (Fig. 19 B).

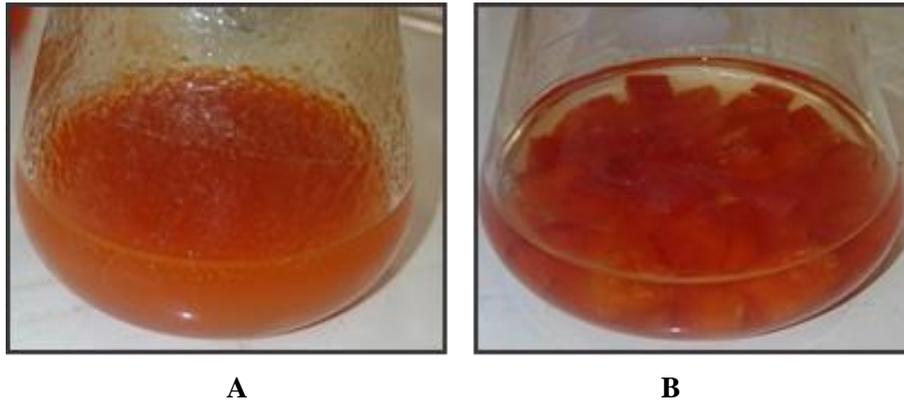


Fig. 19. Tejidos de morrón macerados con el extracto enzimático (B: control negativo)

En la Figura 20 se muestran microfotografías (400 ×) de las células del tejido vegetal, luego del tratamiento enzimático. El examen microscópico de los productos macerados mostró células simples liberadas y agregados celulares no observándose lisis por destrucción de la pared celular (Fig. 20A).

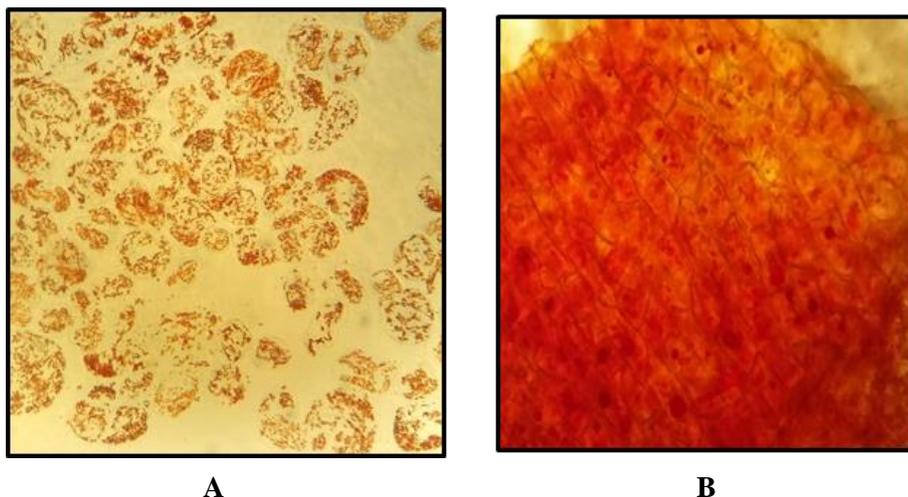


Fig. 20. Microfotografías (400 ×) de células de tejidos de ají macerados con el extracto enzimático de *W. anomalus* (A), blanco con la enzima inactivada (B)

El rendimiento del proceso de maceración expresado como porcentaje de peso seco de tejido macerado (células libres) respecto al peso seco del tejido original (% p/p) resultó del 98,02%.

La actividad de la enzima producida por *W. anomalus* se centra particularmente en la laminilla media (protopectina) que une entre sí a las células del tejido y no degrada celulosa, debido a lo cual, las células no se lisan. Estos resultados confirmaron la capacidad de maceración de PGasa como se informó anteriormente con el sobrenadante de *W. anomalus* (Martos *et al.* 2013a)

Zubresky *et al.* (2014) demostraron que el extracto enzimático de *W. anomalus* maceró tejidos de frutilla, convirtiendo cerca del 99% de los tejidos de las frutas evaluadas en células libres (Zubreski *et al.*, 2014).

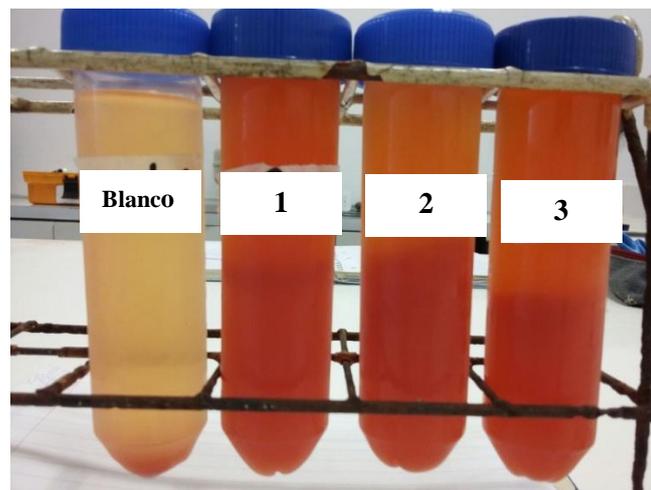


Fig. 21. Células libres decantadas luego de la maceración enzimática de tejidos de morrón (Izquierda: control negativo)

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

- ✓ El diseño factorial 2^3 determinó que el pH y la temperatura influyeron significativamente sobre la producción de la enzima PG por *W. anomalus*, mientras que la influencia de la velocidad de agitación fue no significativa.
- ✓ El diseño de Doehlert determinó que las dos variables independientes tuvieron un efecto lineal significativo positivo (pH) y negativo (temperatura). La temperatura fue la variable lineal más importante que afectó la producción de PG. El aumento de temperatura mostró una marcada disminución en la producción de la enzima. Los mayores títulos se obtuvieron a 30°C y pH de 5,7; con un valor máximo de producción de la enzima de 30,83 UE/mL.
- ✓ Durante el cultivo del microorganismo a escala biorreactor, el microorganismo creció en fase exponencial hasta aproximadamente las 10 h de cultivo. La biomasa total producida fue de $3,03 \pm 0,905$ gx/l, obteniéndose un rendimiento ($Y_{x/s}$) de 0,303 gx/gs en base a glucosa. La velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) fue de $0,12$ h⁻¹. La síntesis de PG estuvo asociada al crecimiento de la levadura, alcanzando un valor máximo de producción (30,52 UE/mL) al finalizar la fase exponencial. El pH se mantuvo prácticamente constante en el transcurso del proceso fermentativo.
- ✓ El extracto enzimático de *W. anomalus*, fue capaz de macerar tejidos de morrón, observándose ablandamiento del tejido y células simple liberadas, sin evidenciarse ruptura celular, luego de 3,5 h de incubación.

Como conclusión general se puede decir que en el presente trabajo de tesis se logró optimizar las condiciones de cultivo para la producción de la enzima PG por *W. anomalus*, obteniéndose extractos enzimáticos con elevada actividad PG, el que fue capaz de macerar tejidos vegetales, proceso este de interés en tecnología de los alimentos.

RECOMENDACIONES

1. Caracterizar diferentes residuos agroindustriales de la zona a fin de utilizarlos en el medio de cultivo en reemplazo de pectina de citrus comercial.
2. Evaluar la producción de la enzima utilizando los diferentes residuos agroindustriales.
3. Encontrar el tipo y concentración del residuo más adecuado para la mayor producción de la enzima, a fin de obtener un medio de cultivo de menor costo y al mismo tiempo reducir la contaminación ambiental.
4. Realizar el escalado en la producción de la enzima de frascos agitados a escala birreactor de laboratorio en el medio económico.
5. Estudiar los distintos factores que afectan el proceso de maceración de tejidos de morrón utilizando diseños estadísticos.
6. Optimizar la maceración mediante diseños de superficie de respuesta.

BIBLIOGRAFÍA

Arroyo, M., Acebal, C. y De la Mata, I. (2014) «Biocatálisis y biotecnología», *Arbor*, 190(768), p. a156. doi: 10.3989/arbor.2014.768n4010.

Avallone, C. M., Cravzov, A. L., Montenegro, S. B., y Pellizzari, E. E. (2000) «Estudio de la actividad de un extracto enzimático de sandía (*Citrullus vulgaris* Schard)», *Biochemistry*, pp. 0-3.

Badui Dergal, S. (2006) *Química de los alimentos*, Ed. Pearson educación. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Barragán, J. C. A., Zerpa, S. A. I., Castillo, M. L. S., Haro, M. R., Alarcón, W. N., & Gasco, F. O. (2014) «Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de pectinasas producidas por *Bacillus* spp.», *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 34(1), pp. 33-41.

Basanta, M. F. (2013) *Estudio químico y funcional de pectinas y glicanos entrecruzantes de paredes celulares de prunoideas*. Universidad de Buenos Aires.

Bernal, L. y Bernal, L. (2014) «Una nueva visión de la degradación del almidón», *Revista del Centro de Investigación de la Universidad la Salle*, 7(25), pp. 77-90. doi: 10.26457/recein.v7i25.249.

Blanco, P., Sieiro, C. y Villa, T. G. (1999) «Production of pectic enzymes in yeasts», *FEMS Microbiology Letters*, 175(1), pp. 1-9. doi: 10.1016/S0378-1097(99)00090-7.

Bogdanoff, N. M. (2015) «Optimización de los procesos de obtención y concentración de pectina de naranja». Tesis de Doctorado. Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata.

Butiuk, A. P., Adachi, O. y Hours, R. A. (2015) «Yerba mate as a novel inducer for fungal chlorogenate hydrolase production», *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier, 4(3), pp. 327-334. doi: 10.1016/j.bcab.2015.06.002.

Carmona, J. A. J. Z. (2011) «Aislamiento De Cepas De *Bacillus* Productoras De Proteasas Con Potencial Uso Industrial», *Journal of Chemical Information and Modeling*, 68. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

- Carrera, J. E. (2003) «Producción Y Aplicación De Enzimas Industriales», *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 1(1), pp. 9-15.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. a y Mignone, C. F. (2000) «Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media», *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(5), pp. 260-265. doi: 10.1038/sj.jim.7000072.
- Cavalitto, S. F. y Mignone, C. F. (2007) «Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain», *Process Biochemistry*, 42(2), pp. 175-179. doi: 10.1016/j.procbio.2006.07.031.
- Centeno, R. y Pavone, D. (2015) «Producción de celulasas y biomasa del hongo *Trichoderma reesei* utilizando lodo papelerero como fuente de carbono», *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(1), pp. 40-46.
- Cevallos, G. (2015) «Caracterización de pectinasas antárticas y su aplicación en la clarificación de jugo de manzana», *Espol*, 1, p. 1.
- Contreras-Esquivel, J. C. (2003) «Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*», *Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina*, pp. 1-171.
- Costa, J. A. V., Colla, E., Magagnin, G., Santos, L. O. dos, Vendruscolo, M., y Bertolin, T. E. (2007). «Simultaneous amyloglucosidase and exo-polygalacturonase production by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation», *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Tecpar, 50(5), pp. 759-766. doi: 10.1590/S1516-89132007000500003.
- Couri, S., Terzi, C., Saavedra, G. A., Pereira, S., y Carlos, A. (2000) «Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8», 36, pp. 255-261.
- Croak, S. y Corredig, M. (2006) «The role of pectin in orange juice stabilization: Effect of pectin methylesterase and pectinase activity on the size of cloud particles», *Food Hydrocolloids*, 20(7), pp. 961-965. doi: 10.1016/j.foodhyd.2005.10.016.
- Curtis, H. (2008) *Curtis Biología*. Médica Panamericana.
- Díaz, A., Flórez, J. y Cotes, A. M. (2005) «Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv027)», *Revista Colombiana de Biotecnología*, VII(1), pp. 51-58.

- Doehlert, D. H. (1970) «Uniform Shell Designs», *Journal of the Royal Statistical Society*, 19(3), pp. 231-239. doi: 10.2307/2346327.
- Esquivel, J. C. C. y Voget, C. E. (2004) «Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*», *Journal of Biotechnology*, 110(1), pp. 21-28. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.01.010.
- Favela-torres, E., Volke-sepúlveda, T. y Viniestra-gonzález, G. (2006) «Production of Hydrolytic Depolymerising Pectinases.pdf», 44(2), pp. 221-227.
- Ferreira, O. A., Cavalitto, S. F., Hours, R. A., y Ertola, R. J.(2002) «Influence of trace elements on enzyme production: Protopectinase expression by a *Geotrichum klebahnii* strain», *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), pp. 498-504. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00146-1.
- Franchi, L., Fratebianchi, D., Pose, G., y Cavalitto, F.(2014) «Producción Nacional de Pectinasas de origen Fúngico y su Aplicación al Procesamiento Frutihortícola», *Sns*, 5, p. 37.
- Geralda Da Silva, E., De Fátima Borges, M., Medina, C., Hilsdorf Piccoli, R., y Freitas Schwan, R.(2005) «Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits», *FEMS Yeast Research*, 5(9), pp. 859-865. doi: 10.1016/j.femsyr.2005.02.006.
- Grebechova, R. y Contreras, L. (2006) «Biosíntesis de las enzimas pectolíticas a partir de hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus* para aplicación en industria de alimentos1», *Revista de Investigación*, 6, pp. 153-162.
- Gummadi, S. N. y Panda, T. (2003) «Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review», *Process Biochemistry*, 38, pp. 987-996. doi: 10.1016/S0032-9592(02)00203-0.
- Hasunuma, T., Fukusaki, E. I. y Kobayashi, A. (2003) «Methanol production is enhanced by expression of an *Aspergillus niger* pectin methylesterase in tobacco cells», *Journal of Biotechnology*, 106(1), pp. 45-52. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.07.008.
- Hoondal, G., Tiwari, R., Tewari, R., Dahiya, N., y Beg, Q. (2002) «Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: A review», *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4-5), pp. 409-418. doi: 10.1007/s00253-002-1061-1.
- Iglesias, M. T. y Lozano, J. E. (2004) «Extraction and characterization of sunflower pectin», *Journal of Food Engineering*, 62(3), pp. 215-223. doi: 10.1016/S0260-8774(03)00234-6.

- Jayani, R. S., Saxena, S. y Gupta, R. (2005) «Microbial pectinolytic enzymes: A review», *Process Biochemistry*, 40(9), pp. 2931-2944. doi: 10.1016/j.procbio.2005.03.026.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R.(2001) «Applications of pectinases in the commercial sector: A review», *Bioresource Technology*, 77(3), pp. 215-227. doi: 10.1016/S0960-8524(00)00118-8.
- Kurtzman, C. P. (2011) «Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*», *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 99(1), pp. 13-23. doi: 10.1007/s10482-010-9505-6.
- Luévanos-Escareño, M. P., Vázquez-Vuelvas, O. F., Balagurusamy, Nagamani Romero-Cedillo, L., y Valenzuela Loera(2014) *Biocatalizadores : Desarrollo tecnológico de enzimas con beneficios a gran escala*.
- Malvessi, E. y Da Silveira, M. M. (2004) «Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*», *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(5), pp. 693-702. doi: 10.1590/S1516-89132004000500004.
- Martos, M. A., Butiuk, A. P., Rojas, N. L., y Hours, R. A. (2014). Batch culture of *Wickerhamomyces anomalus* in a lab scale bioreactor for poligalacturonase production. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 68-73. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.47245>
- Martos, M. A., Butiuk, A. P., Rojas, N. L., y Hours, R. A. (2014). Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Wickerhamomyces anomalus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(4), 587-594. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402214>
- Martos, M. A., Zubreski, E. R., Combina, M., Garro, O. A., y Hours, R. A. (2013a). Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(2), 332-338. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000047>
- Martos, M. a, Zubreski, E. R., Garro, O. a, y Hours, R. a. (2013b). Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhanomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels. *Biotechnology research international*, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2013/435154>

- McAuliffe, J. C. (2012) «Industrial Enzymes and Biocatalysis», en *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. Boston, MA: Springer US, pp. 1183-1227. doi: 10.1007/978-1-4614-4259-2_31.
- Moyo, S., Gashe, B. A., Collison, E. K., y Mpuchane, S. (2003) «Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology», *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2), pp. 87-100. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00503-2.
- Muñoz, M. A. y Catrilaf, G. (2015) «Estimation of kinetic parameters of *Saccharomyces cerevisiae* in batch fermentation during different growth conditions», *Researchgate*, (June).
- Nagai, M., Ozawa, A., Katsuragi, T., y Sakai, T.(2000) «Purification and characterization of acid-stable protopectinase produced by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation», *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 64(7), pp. 1337-1344. doi: 10.1271/bbb.64.1337.
- Nakamura, T., Hours, R. A. y Sakai, T. (1995) «Enzymatic Maceration of Vegetables with Protopectinases», *Journal of Food Science*, 60(3), pp. 468-472. doi: 10.1111/j.1365-2621.1995.tb09805.x.
- Nighojkar, S., Phanse, Y., Sinha, D., Nighojkar, A., y Kumar, A.(2006) «Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer», *Process Biochemistry*, 41(5), pp. 1136-1140. doi: 10.1016/j.procbio.2005.12.009.
- Olsen, A. K. S. E. L. G. (1941) «Report of the Committee for the Revision of the Nomenclature of Pectic Substances», 2, pp. 105-106.
- Olstorpe, M. *et al.* (2010) «*Pichia anomala* yeast improves feed hygiene during storage of moist crimped barley grain under Swedish farm conditions», *Animal Feed Science and Technology*, 156(1-2), pp. 47-56. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2009.12.008.
- Ortega, N., De Diego, S., Perez-Mateos, M., y Busto, M. D.(2004) «Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification», *Food Chemistry*, 88(2), pp. 209-217. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.01.035.
- Parra, A. (2009) «Lactosuero: Importancia En La Industria De Alimentos», *SciELO*, pp. 4967
- Passoth, V., Olstorpe, M. y Schnürer, J. (2011) «Past, present and future research directions with *Pichia anomala*.», *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), pp. 121-125. doi: 10.1007/s10482-

010-9508-3.

Paudel, Y. P., Lin, C., Shen, Z., y Qin, W. (2015) «Characterization of pectin depolymerising exo polygalacturonase by *Bacillus* sp. HD2 isolated from the gut of *Apis mellifera* L.», *Microbiology Discovery*, 3(1), p. 2. doi: 10.7243/2052-6180-3-2.

Pedrolli, D. B., Monteiro, A. C., Gomes, E., y Carmona, E. C.(2009) «Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes», *The Open Biotechnology Journal*, 3(1), pp. 9-18. doi: 10.2174/1874070700903010009.

Van Rensburg, P. y Pretorius, I. S. (2000) «Enzymes in winemaking: Harnessing natural catalysts for efficient biotransformations- A review», *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(Special Issue), pp. 52-73.

Ringuelet, J. y Viña, S. (2013) *Productos Naturales Vegetales*. Ed. de la Universidad de La Plata. Universidad Nacional de la Plata.

Rodríguez Gámez, Odalys; Serrat Díaz, M. (2008) «POLIGALACTURONASAS DE LEVADURAS: UN PRODUCTO BIOTECNOLÓGICO DE GRANDES POTENCIALIDADES», *Tecnología Química*, XXVII, pp. 80-90.

Rogerson, F. S. S., Vale, E., Grande, H. J., Silva, M. C. M., Vale, E., Grande, H. J., y Alternative, M. C. M. S.(2009) «Alternative processing of port-wine using pectolytic enzymes procesado alternativo pectolíticos procesado alternativo do vinho de oporto usando enzimas pectolíticos»*Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 8122(October 2015). doi: 10.1080/11358120009487605.

Sainz, R. (2008) «Maceración enzimática de tejidos vegetales. Acción de protopectinasa de *Geotrichum klebahnii* sobre cáscara de pomelo ». Seminario de Investigación. Departamento de Ciencia y Tecnología Licenciatura en Biotecnología. Universidad Nacional de Quilmes.

Sánchez-Villarruel, A. D., Aguilar González, C. ; Contreras-Esquivel, J. C., y Nevárez-Moorillón, G. V.(2011). Taiz, L. and Zeiger, E. (2006) *Plant Physiology*, Fourth Edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 764 pages, *Tecnociencia*, 5(2), pp. 76-82.

Sánchez, C., Mejía, C., Figueroa, C., Esquivia, M., Agudelo, L., Zapata, N., y Gómez, M.(2005) «Estudio de cepas nativas amilolíticas.», *Vitae*, 12(2), pp. 21-28.

Schwan, R. F., Cooper, R. M. y Wheals, A. E. (1997) «Endopolygalacturonase secretion by

Kluyveromyces marxianus and other cocoa pulp-degrading yeasts», *Enzyme and Microbial Technology*, 21(4), pp. 234-244. doi: 10.1016/S0141-0229(96)00261-X.

Sin, H. N., Yusof, S., Hamid, N. S. A., y Rahman, R. A. (2006) «Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology», *Journal of Food Engineering*, 73(4), pp. 313-319. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.01.031.

Singh, S. A. y Rao, A. G. A. (2002) «A simple fractionation protocol for , and a comprehensive study of the molecular properties of , two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*», 123, pp. 115-123.

Soriano Lasheras, M. (2004) «Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*», p. 255.

Souza, J. V. B., Silva, Maia, M. L. S., y Teixeira, M. F. S. (2003) «Screening of fungal strains for pectinolytic activity: Endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavissporus* 2A.UMIDA.1», *Process Biochemistry*, 39(4), pp. 455-458. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00092-X.

Subramaniam, R. y Vimala, R. (2012) «Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances : a Comparative Study», *Intenational Journal of Science and Nature*, 3(3), pp. 480-486.

Tapre, A. R. y Jain, R. K. (2014) «Pectinases: Enzymes for fruit processing industry», *International Food Research Journal*, 21(2), pp. 447-453.

Tari, C., Göğus, N. y Tokatli, F. (2007) «Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology», *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), pp. 1108-1116. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.08.016.

Thomas, L., Larroche, C. y Pandey, A. (2013) *Current developments in solid-state fermentation*, *Biochemical Engineering Journal*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.bej.2013.10.013.

Uzuner, S. y Cekmecelioglu, D. (2015) «Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* growing on hazelnut shell hydrolyzate», *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Elsevier B.V., 113, pp. 62-67. doi:

10.1016/j.molcatb.2015.01.003.

Vargas, A. y Silver, L. (2002) «Selección y evaluación de bacterias del género *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido.», *UNSM*.

Vázquez, I. R., Aguilera, A. F., Prado-Barragán, L. A., y Aguilar, C. N.(2008) «Producción fúngica de proteasas inducidas con pelo de cerdo», *Informacion Tecnologica*, 19(2), pp. 33-40. doi: 10.4067/S0718-07642008000200005.

Vermelho, A. B., Noronha, E. F., Filho, E. X. F., Ferrara, M. A., y Bon, E. P. S. (2013) «Diversity and Biotechnological Applications of Prokaryotic Enzymes», en *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 213-240. doi: 10.1007/978-3-642-31331-8_112.

Yalçın, S. K. y Özbas, Z. Y. (2004) «Effects of different substrates on growth and glycerol production kinetics of a wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3», *Process Biochemistry*, 39(10), pp. 1285-1291. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00252-8.

Yubero, F. (2016) «Relevamiento del uso de enzimas en la industria paraguaya y su aplicación en la producción de alimentos para animales», *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 6(1), pp. 31-34.

Zapata, A. D., Escobar, C. A., Cavalitto, S., y Hours, R. A. (2009) «Evaluation of Pectin Solubilization Capability From Lemon Peel Using Protopectinase-Se», *Vitae*, 16(1900), pp. 67-74.

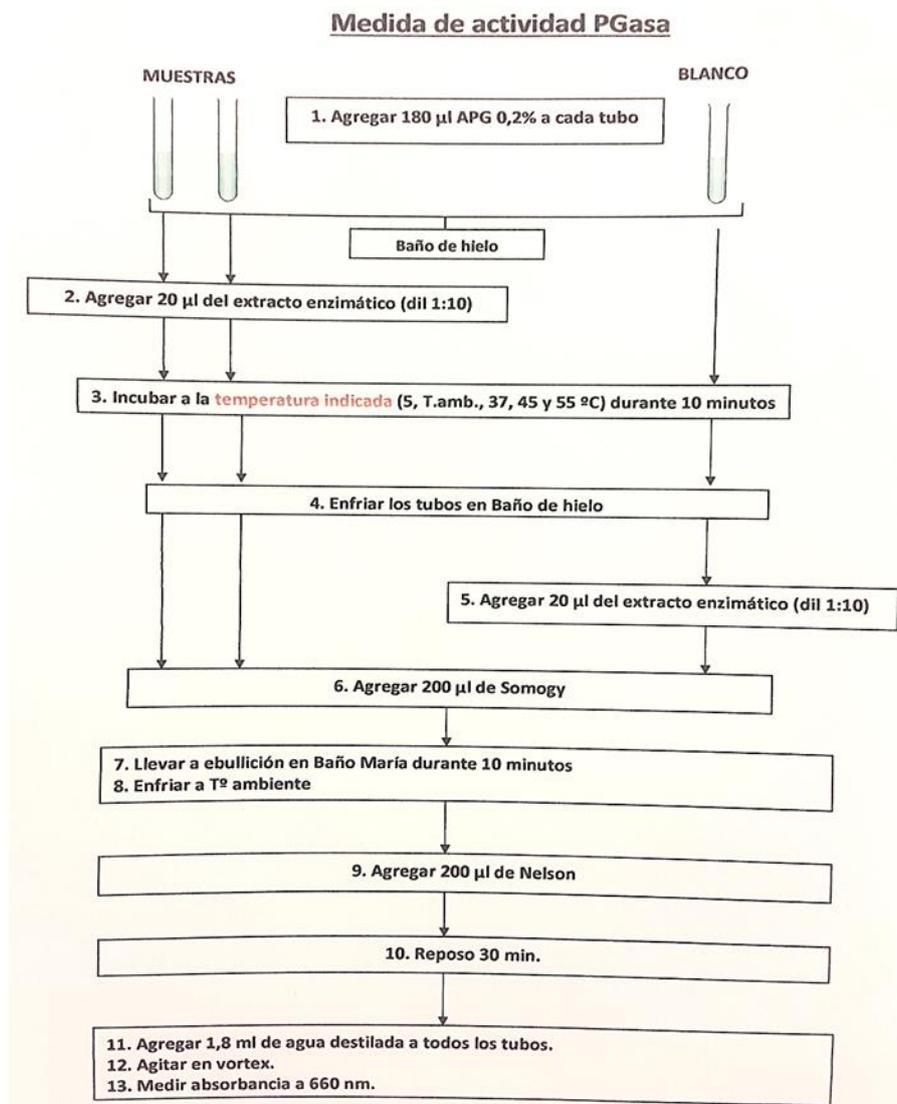
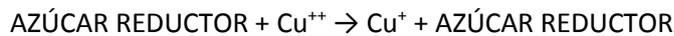
Zheng, Z. y Shetty, K. (2000) «Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes», *Process Biochemistry*, 35(8), pp. 825-830. doi: 10.1016/S0032-9592(99)00143-0.

Zubreski, E.R.; Delinski, G.; Martos, M. A. (2014) «Maceración enzimática de frutas con una endo-poligalacturonasa producida por *Wickerhamomyces anomalus*», *La Alimentación Latinoamericana*, 47(309), pp. 60-65.

ANEXO

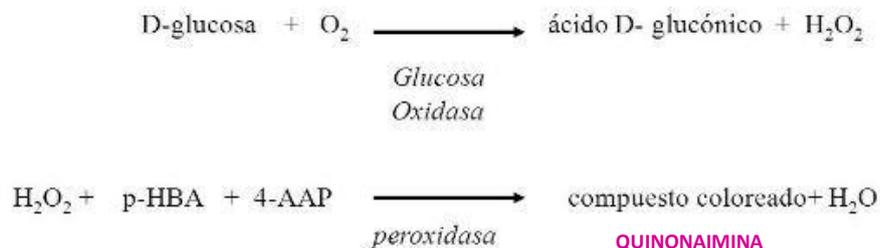
Determinación de actividad PG. Método de Somogyi Nelson.

Fundamento: Los azúcares con un grupo aldehído o cetona libre son capaces de reducir los iones Cu^{++} del Reactivo alcalino de Somogyi, en iones Cu^+ . Cuando los iones cuprosos, formados por la acción reductora de los glúcidos, reaccionan con el ácido arseno-molíbídico del Reactivo de Nelson, el Molibdeno hexavalente se reduce y toma un intenso color azul que es proporcional a la concentración inicial de azúcar reductor y que se compara en fotocolorímetro con el color que produce un patrón del mismo azúcar en iguales condiciones de trabajo.



Determinación de glucosa por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa

Fundamento: La glucosa presente en la muestra origina, según las reacciones descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



En un primer paso la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la D-glucosa a ácido D-glucónico con formación de peróxido de hidrógeno. Éste es utilizado por la peroxidasa para oxidar a la 4-aminofenazona y al fenol, dando lugar a una quinonaimina coloreada. La intensidad de color será proporcional a la concentración de glucosa presente inicialmente.

Procedimiento: En tres tubos de ensayos marcados B (blanco), S (standard), M (muestra), colocar:

	B	S	M
Standard		20 µl	
Muestra			20 µl
React. de trabajo	2 ml	2 ml	2ml



Resultados experimentales del diseño factorial 2³

Muestra	Absorbancia	Abs Neta	GALA (mg/lt)	Dilución	Ecuación	Prom	DS	CV %
Bco	0,239							
1	1,330	1,091	459,636	10	21,6605	22,432	0,680	3,032
1	1,390	1,151	486,909	10	22,9458			
1	1,378	1,139	481,455	10	22,6887			
Bco	0,905							
2	1,087	0,182	46,455	10	2,1892	2,146	0,113	5,281
2	1,079	0,174	42,818	10	2,0178			
2	1,089	0,184	47,364	10	2,2320			
Bco	0,237							
3	1,650	1,413	606,000	10	28,5580	28,422	0,152	0,535
3	1,645	1,408	603,727	10	28,4509			
3	1,636	1,399	599,636	10	28,2581			
Bco	1,07							
4	1,207	0,137	26,000	10	1,2253	1,147	0,087	7,549
4	1,204	0,134	24,636	10	1,1610			
4	1,199	0,129	22,364	10	1,0539			
Bco	0,2							
5	1,325	1,125	475,091	10	22,3888	22,674	0,440	1,941
5	1,328	1,128	476,455	10	22,4531			
5	1,362	1,162	491,909	10	23,1814			
Bco	0,906							
6	1,057	0,151	32,364	10	1,5251	1,504	0,030	2,015
6	1,055	0,149	31,455	10	1,4823			
6	1,059	0,153	33,273	10	1,5680			
Bco	0,207							
7	1,689	1,482	637,364	10	30,0360	29,093	1,263	4,341
7	1,668	1,461	627,818	10	29,5862			
7	1,578	1,371	586,909	10	27,6583			
Bco	0,859							
8	1,048	0,189	49,636	10	2,3391	2,346	0,118	5,028
8	1,054	0,195	52,364	10	2,4677			
8	1,043	0,184	47,364	10	2,2320			

Resultados experimentales del diseño de Doehlert

Muestra	Absorbancia	Abs Neta	GALA (mg/lit)	Dilución	PGasa	Prom	DS	CV %
Blanco	0,952							
1	1,101	0,149	31,455	10	1,4823	1,547	0,077	4,994
1	1,103	0,151	32,364	10	1,5251			
1	1,108	0,156	34,636	10	1,6323			
Blanco	0,907							
2	1,054	0,147	30,545	10	1,4395	1,497	0,054	3,602
2	1,059	0,152	32,818	10	1,5466			
2	1,057	0,150	31,909	10	1,5037			
Blanco	0,121							
3	0,668	0,547	212,364	10	10,0077	9,387	0,798	8,499
3	0,652	0,531	205,091	10	9,6650			
3	0,597	0,476	180,091	10	8,4868			
Blanco	0,203							
4	1,625	1,422	610,091	10	28,7507	28,965	0,239	0,824
4	1,647	1,444	620,091	10	29,2220			
4	1,633	1,430	613,727	10	28,9221			
Blanco	0,196							
5	1,115	0,919	381,455	10	17,9762	17,976	0,129	0,715
5	1,109	0,913	378,727	10	17,8477			
5	1,121	0,925	384,182	10	18,1047			
Blanco	0,958							
6	1,152	0,194	51,909	10	2,4462	2,543	0,136	5,361
6	1,161	0,203	56,000	10	2,6390			
6	1,148	0,190	50,091	10	2,3606			
Blanco	0,578							
7	1,138	0,560	218,273	10	10,2862	10,350	0,064	0,621
7	1,141	0,563	219,636	10	10,3504			
7	1,144	0,566	221,000	10	10,4147			
Blanco	0,572							
8	1,123	0,551	214,182	10	10,0934	10,200	0,098	0,962
8	1,132	0,560	218,273	10	10,2862			
8	1,129	0,557	216,909	10	10,2219			
Blanco	0,599							
9	1,172	0,573	224,182	10	10,5646	10,543	0,077	0,733
9	1,174	0,575	225,091	10	10,6075			
9	1,167	0,568	221,909	10	10,4575			

Resultados experimentales de Producción de PG a escala biorreactor

Tiempo (h)	DO Biomasa (Abs 620nm)	Biomasa (g/L)	DS	DO Glucosa residual (Abs 505 nm)	Glucosa residual (g/L)	DS	PG (UE/mL)	DS	pH
0	0,258	0,42	0,047	0,802	9,96	0,099	0,00	0,138	5,7
1	0,278	0,79	0,010	0,717	9,35	0,112	0,96	0,118	5,7
2	0,293	1,01	0,001	0,665	9,15	0,145	3,68	0,126	5,7
3	0,388	1,18	0,001	0,562	8,89	0,221	6,33	0,131	5,7
4	0,567	1,64	0,007	0,521	8,09	0,182	10,13	0,311	5,6
5	0,733	2,05	0,004	0,466	7,08	0,190	13,47	0,030	5,6
6	0,910	2,31	0,001	0,410	6,51	0,158	17,67	0,260	5,5
7	1,023	2,53	0,004	0,355	5,39	0,142	20,80	0,064	5,5
8	1,160	2,77	0,006	0,247	3,70	0,078	23,09	0,428	5,5
9	1,257	2,87	0,001	0,190	2,98	0,081	25,15	0,057	5,5
10	1,298	2,89	0,002	0,126	1,04	0,047	29,74	0,097	5,4
11	1,285	2,94	0,074	0,070	0,17	0,004	30,21	0,206	5,4
12	1,292	2,99	0,066	0,015	0,10	0,006	30,49	0,208	5,4
13	1,290	3,02	0,058	0,007	0,06	0,003	30,50	0,418	5,3
14	1,3	3,03	0,066	0,000	0,00	0,000	30,52	0,147	5,3

PG extracto crudo

Muestra	Absorbancia	Abs Neta	GALA (mg/lt)	Dilución 1/10	PGasa	Prom	DS	CV %
Blanco	0,108							
1	1,605	1,497	644,182	10	30,3573	30,522	0,146	0,478
1	1,618	1,510	650,091	10	30,6358			
1	1,615	1,507	648,727	10	30,5715			
Blanco	0,136							
2	1,631	1,495	643,273	10	30,3145	30,086	0,963	3,201
2	1,659	1,523	656,000	10	30,9142			
2	1,571	1,435	616,000	10	29,0292			

PG extracto evaporado

Muestra	Absorbancia	Abs Neta	GALA (mg/lt)	Dilución 1/50	PGasa	Prom	DS	CV %
Blanco	0,28							
1	1,561	1,281	546,000	50	128,6522	128,509	0,550	0,428
1	1,554	1,274	542,818	50	127,9025			
1	1,564	1,284	547,364	50	128,9735			
Blanco	0,287							
2	1,565	1,278	544,636	50	128,3309	128,331	0,643	0,501
2	1,559	1,272	541,909	50	127,6883			
2	1,571	1,284	547,364	50	128,9735			