

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS  
PECTINOLÍTICAS OBTENIDAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SEMISÓLIDO DEL  
*Aspergillus niger*

VÍCTOR RENÉ ROJAS MUÑOZ

UNIVERSIDAD EAFIT  
ESCUELA DE INGENIERÍAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS  
MEDELLÍN  
2009

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS  
PECTINOLÍTICAS OBTENIDAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SEMISÓLIDO DEL  
*Aspergillus niger*

VÍCTOR RENÉ ROJAS MUÑOZ

Proyecto de grado para optar al título de  
Ingeniero de Procesos

Asesora:

CATALINA GIRALDO ESTRADA  
MSc. en Biotecnología

Coasesora:

YULY ANDREA RAMÍREZ TAPIAS  
Ingeniera de Procesos

Grupo de Investigación en Procesos Ambientales y Biotecnológicos  
-GIPAB-

UNIVERSIDAD EAFIT  
ESCUELA DE INGENIERÍAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS  
MEDELLÍN  
2009

Nota de aceptación

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

-----  
Firma del jurado

-----  
Firma del jurado

Ciudad y fecha (día, mes, año)

El autor agradece a las personas que le dieron la oportunidad de adelantar este trabajo de investigación como proyecto de grado para optar a su título como Ingeniero de Procesos.

Catalina Giraldo Estrada, MSc. en Biotecnología y asesora del proyecto.

Yuly Andrea Ramírez Tapias, Ingeniera de Procesos y coasesora del proyecto.

Luz Deisy Marín Palacio, MSc. en Biotecnología, por su apoyo incondicional y asesoría académica constante.

Egresadas del grupo de Investigación en Biotecnología y personal de los laboratorios de Ingeniería de Procesos de la Universidad EAFIT, especialmente a Sigifredo Cárdenas y Jhon Jairo Estrada.

Grupo de Investigación en Procesos Ambientales y Biotecnológicos –GIPAB–.

## TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN .....	10
2. INTRODUCCIÓN .....	12
3. OBJETIVOS .....	15
3.1 GENERAL .....	15
3.2 ESPECÍFICOS .....	15
4. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE ANTECEDENTES .....	16
4.1 APLICACIONES DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS .....	16
4.2 CLASIFICACIÓN DE LAS PECTINASAS .....	16
4.3 LAS PECTINASAS DEL GÉNERO <i>Aspergillus</i> .....	17
4.4 PURIFICACIÓN DE ENZIMAS POR MÉTODOS DE PRECIPITACIÓN .....	18
4.4.1 Precipitación por punto isoelectrico .....	18
4.4.2 Precipitación por salado o “ <i>salting-out</i> ” .....	19
4.5 PURIFICACIÓN DE ENZIMAS POR ULTRAFILTRACIÓN .....	21
4.6 SISTEMAS DE BIFASES ACUOSAS .....	22
5. DISEÑO METODOLÓGICO .....	25
5.1 OBTENCIÓN Y PRETRATAMIENTO DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO .....	25
5.2 MÉTODOS DE PRECIPITACIÓN .....	25
5.2.1 Precipitación por salado .....	25
5.2.2 Precipitación por punto isoelectrico .....	26
5.2.3 Acople salado-pH .....	26
5.3 ULTRAFILTRACIÓN .....	27
5.4 SISTEMAS BIFÁSICOS .....	27
5.5 TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	28
5.5.1 Exopoligalacturonasa (exo-PG) .....	28
5.5.2 Endopoligalacturonasa (endo-PG) .....	28
5.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	29
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO DE EXPERIMENTOS .....	29
5.8 CUANTIFICACIÓN DEL FACTOR DE PURIFICACIÓN .....	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31

6.1 TRATAMIENTO PRELIMINAR DEL PRODUCTO DE FERMENTACIÓN.....	31
6.1.1 Extracción con metabisulfito de sodio (SMS).....	31
6.1.2 Centrifugación y microfiltración .....	32
6.2 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR SALADO .....	32
6.3 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR PUNTO ISOELÉCTRICO.....	35
6.4 TRATAMIENTO DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO CON EL ACOPLE SALADO – pH.....	37
6.5 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE ULTRAFILTRACIÓN .....	41
6.6 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR BIFASES ACUOSAS.....	44
6.7 ESQUEMATIZACIÓN, POSIBLE RUTA DE PURIFICACIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	47
RECOMENDACIONES .....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	53
CIBERGRAFÍA.....	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Actividad enzimática endo-PG en sobrenadantes y pellets obtenidos al realizar salting-out a diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	32
Figura 2. Variación de la actividad enzimática exo-PG en sobrenadantes por efectos del pH.....	34
Figura 3. Variación de la actividad enzimática endo-PG en sobrenadantes al someter el extracto enzimático a un barrido de pH.....	35
Figura 4. Actividad enzimática exo-PG de las muestras obtenidas en el acople salado-pH.....	36
Figura 5. Actividad enzimática endo-PG de los sobrenadantes obtenidos en el acople salado-pH.....	37
Figura 6. Actividad enzimática exo-PG de los retenidos y permeados procedentes del proceso de ultrafiltración.....	39
Figura 7. Actividad enzimática endo-PG de los retenidos y permeados procedentes del proceso de ultrafiltración.....	41
Figura 8. Actividad enzimática endo-PG de tres sistemas preparados de bifases acuosas.....	42
Figura 9. Actividad enzimática exo-PG de las fases superiores obtenidas en la preparación de tres sistemas de bifases acuosas.....	43
Figura 10. Ruta de purificación propuesta .....	46

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades bioquímicas de poligalacturonasas del género <i>Aspergillus</i> .....	16
Tabla 2. Preparación de los sistemas de bifases acuosas.....	26
Tabla 3. Factores y niveles de los diseños de experimentos.....	28
Tabla 4. Valores promedio de los indicadores de actividad enzimática evaluados a los extractos enzimáticos en las diferentes fases del pretratamiento.....	31
Tabla 5. Efecto del acople salado-pH en la actividad enzimática del extracto.....	38
Tabla 6. Efecto de la ultrafiltración en la actividad enzimática del extracto. ....	42
Tabla 7. Efecto de la extracción por bifases acuosas en la actividad enzimática del extracto.....	44



## LISTA DE ANEXOS

Anexo A.....	47
Anexo B.....	49
Anexo C.....	50

## 1. RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo para evaluar diferentes métodos de bioseparación orientados a la recuperación de exopoligalacturonasas (exo-PG) y endopoligalacturonasas (endo-PG) contenidas en el extracto enzimático procedente de la fermentación en medio semisólido de *Aspergillus niger* utilizando cáscara de naranja para la preparación de los sustratos.

El producto de fermentación fue sometido a un pretratamiento que involucró una fase de extracción sólido-líquido utilizando solución 0.1 M de metabisulfito de sodio y encontrándose mediante la implementación de un diseño de experimentos unifactorial completamente aleatorizado que la relación producto de fermentación – solvente que maximizó la concentración de proteínas y la actividad enzimática fue 1:4. La etapa de pretratamiento involucró además un proceso de centrifugación a 4500 rpm a 4 °C durante 30 min y un proceso de microfiltración con membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm, reportándose factores de purificación de 1.96 y 1.75 para la exo-PG y la endo-PG respectivamente.

Los métodos de precipitación por salado y por punto isoeléctrico fueron evaluados de manera independiente, determinándose que los pellets resuspendidos en buffer acetato 0.1 M y pH 4.5 presentan una mayor actividad endo-PG cuando son obtenidos al ajustar el extracto enzimático pretratado a un 80% de saturación de sal, empleando solución 4 M de sulfato de amonio; por otro lado, se encontró que las enzimas pectinolíticas de interés se caracterizan por presentar un rango de estabilidad a valores de pH entre 3.0 y 6.0, intervalo por fuera del cual la actividad enzimática disminuía hasta perderse.

Ante la sensibilidad que presentaron los métodos de cuantificación de actividad enzimática cuando la proteína total de las muestras analizadas se encontraba muy diluida, se definió utilizar sulfato de amonio en estado sólido para implementar una prueba que acopló los dos métodos de precipitación anteriormente mencionados, derivando en un factor de purificación de 1.79 y de 1.17 para la exo-PG y endo-PG respectivamente que se explican por el efecto de concentración que tomó lugar en la fase de resuspensión de los precipitados en el buffer acetato.

El proceso de ultrafiltración fue implementado en el Sistema de Ultrafiltración marca Millipore, modelo Pellicon 2, utilizando una membrana de peso molecular de corte (MWCO) de 30 kDa y alcanzando para la exo-PG y la endo-PG factores de purificación respectivos de 1.39 y 1.14.

Por otro lado, la extracción líquido-líquido mediante el sistema de bifases acuosas conformado por polietilenglicol de peso molecular 4000 (13% w/w) y buffer fosfato (28% w/w) derivó en un factor de purificación de 1.11 para la enzima endo-PG.

Finalmente, y con base en todos estos resultados, se sugiere una integración de procesos downstream que derive en factores de purificación mayores para las enzimas pectinolíticas de interés. La ruta de purificación en cuestión involucra la precipitación por salado utilizando sulfato de amonio en estado sólido para ajustar el producto de fermentación pretratado a un 80% de saturación, la resuspensión de los pellets en un volumen de buffer equivalente a  $\frac{1}{4}$  del volumen del extracto enzimático inicial y, por último, el paso de la resuspensión obtenida por membrana de ultrafiltración de 30 kDa.

## 2. INTRODUCCIÓN

El empleo de enzimas en la industria ha cobrado especial importancia en las últimas décadas por cuanto la implementación de procesos tales como la clarificación e hidrólisis enzimática representa beneficios para varios de sus sectores, entre los que se cuenta el textil, el papelerero y, de manera especial, el de alimentos (Carrera, 2003). Sin embargo, la dificultad en el acceso a diferentes tipos de enzimas como las pectinasas limita el uso de estos procesos en las industrias de los países en vía de desarrollo (García y Ramírez, 2008).

Las empresas líderes productoras de enzimas a gran escala están distribuidas principalmente en Europa; es el caso de Novozymes, Danisco y Chr Hansen en Dinamarca, y DSM, Degussa y AB enzymes en Alemania, y aunque éstas cuentan con representantes comerciales en todos los continentes, los costos de importación del producto aumentan el valor de los procesos en la industria de alimentos de otras regiones (De Guzman, 2005).

En efecto, las importaciones de preparaciones para la elaboración de bebidas en Colombia ascendieron en el 2001 a un poco más de US 37.500, ubicándose en la posición 41 de los 50 principales productos de importación en el país; de esta cifra, cerca del 85% proceden de Brasil y Dinamarca, países productores de enzimas (ALADI, 2001). Para el año 2007, las importaciones totales de enzimas fueron de 438.770 toneladas, equivalentes a US 5.6 millones (BACEX, 2008), mostrando de esta forma un incremento más que considerable en tan sólo seis años. Hechos como éste son los que evidencian la necesidad latente de implementar procesos para la obtención de estos productos de tan alto valor agregado, dejando en claro que el satisfacer la demanda interna de las enzimas pectinolíticas y otras enzimas de interés industrial es una manera de impulsar la naciente industria biotecnológica en países como Colombia, cuyo enfoque a la producción de tales enzimas es aún limitado a nivel industrial.

Una de las rutas recientemente estudiadas en Colombia para la producción de pectinasas es a partir del *A. niger* vía fermentación en estado semisólido, empleando la cáscara de naranja como sustrato (García y Ramírez, 2008); en este estudio se identificaron condiciones de operación para la producción de estas enzimas obteniendo un extracto enzimático con actividad pectinolítica y otros metabolitos. Sin embargo, se sabe que en la industria biotecnológica se deben involucrar procesos posteriores a la fermentación que posibiliten que el producto de interés sea separado y purificado; tales procesos son los que se conocen como *procesos downstream*.

Se estima que los pasos necesarios para alcanzar un grado de purificación aceptable involucran alrededor del 60% del costo total del proceso de obtención de proteínas, excluyendo los costos inherentes a la compra de materias primas (Lee, 1992). A lo anterior se le suma el hecho de que, en la actualidad, el mercado de los bioproductos se

ha constituido en un sector con bastante competencia en el mundo, lo cual ratifica la importancia de seleccionar una secuencia de procesos de separación y purificación, ya que una vez el proceso ha sido aprobado por las entidades regulatorias competentes, la modificación de sus características implica costos considerables (Lienqueo y Asenjo, 2000). De esta manera, se evidencia la importancia del tema en estudio, el cual conduce sus esfuerzos a la evaluación de procesos downstream aplicados a enzimas pectinolíticas -de alto interés para la industria de alimentos y bebidas-.

Existen dos factores principales que influyen en el desarrollo y elección de los procesos de bioseparación o aislamientos de moléculas biológicas. En primer lugar, se encuentra el aspecto económico que conlleva a considerar una gama de procesos de separación que muestre rendimientos con respecto a la relación de los costos operacionales y los valores de recuperación promedio. Un segundo pero no menos importante factor, es la necesidad de un ambiente bio-compatible que permita la aplicación de criterios rigurosos de separación sin comprometer las propiedades del producto final. En el caso de la recuperación enzimática mediante precipitación por salado y por punto isoeléctrico y extracción por bifases acuosas, ambos factores mencionados son de relevancia máxima (Weatherley, 1994).

Ahora bien, una de las principales características de la separación de moléculas biológicas que las diferencian de muchos productos convencionales es la sensibilidad de especies particulares al ambiente en el que son procesadas. Esto es especialmente cierto en el caso de las proteínas y, en particular, de los productos enzimáticos cuya actividad y funcionalidad son notablemente sensibles a criterios ambientales tales como pH, temperatura y potencial iónico (Weatherley, 1994). Ello conlleva a la necesidad imperante de implementar una técnica de bioseparación que no ponga en riesgo la actividad enzimática de las pectinasas y, debido a las razones que serán expuestas a lo largo de este estudio, las alternativas que se constituyen en el objeto del mismo derivan en opciones viables desde el explicado punto de vista.

En el marco del presente trabajo, se ha definido como requerimiento esencial de los métodos en estudio, además de los ya mencionados, la compatibilidad con procesos continuos, lo cual viene ligado a pequeños tamaños de equipos, bajos inventarios, estabilidad del proceso y uniformidad del producto. Esto es congruente con el hecho de que el esquema de numerosos procesos para la purificación de proteínas comerciales implica una integración de procesos que constituye una secuencia o ruta de purificación estandarizada con la prioridad de maximizar rendimientos (Harris y Angal, 1995).

Para los procesos de recuperación de proteínas, los diagramas de flujo siempre incluyen los mismos tipos de operaciones unitarias (centrifugación, procesos con membranas – filtración, microfiltración y ultrafiltración– precipitación, extracción líquido-líquido) (Lienqueo y Asenjo, 2000). El problema que debe ser resuelto entonces es la selección secuencial entre las alternativas de operación aplicables al tipo específico de biomoléculas en estudio que, en el enfoque de esta investigación, serán las pectinasas

procedentes de la fermentación del *A. niger* en sustrato semisólido con base en cáscaras de naranja, evitando la desnaturalización irreversible de las enzimas y enfocándose en la conservación de su actividad enzimática y en la obtención de altos rendimientos. Dicho de otra manera, la investigación se centra en la determinación de la viabilidad inherente a la implementación a escala laboratorio de los métodos para la purificación de enzimas de interés industrial en términos de partición y rendimiento.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GENERAL**

Evaluar diferentes métodos de bioseparación orientados a la extracción y purificación de enzimas pectinolíticas obtenidas por fermentación en estado semisólido del *A. niger*.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

**3.2.1** Evaluar la precipitación como método para la purificación de enzimas pectinolíticas mediante la adición de sales y el ajuste de pH.

**3.2.2** Evaluar los métodos de ultrafiltración y de extracción líquido-líquido como alternativas para la purificación de pectinasas.

**3.2.3** Proponer una secuencia de etapas de purificación de enzimas pectinolíticas que mejore el factor de purificación global y el rendimiento.

## 4. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE ANTECEDENTES

### 4.1 APLICACIONES DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS

El uso de enzimas a nivel industrial se remonta al siglo XIX, cuando comenzaron a producirse las primeras preparaciones de renina a partir del estómago de terneros y de amilasa de origen fúngico. En la actualidad, la industria de alimentos emplea una amplia gama de enzimas, tales como amilasas, celulasas, invertasas, glucanasas, enzimas proteolíticas y enzimas pécticas, entre otras (Carrera, 2003). Las pectinasas tienen aplicaciones en la industria de alimentos que corresponden a un 25% de las ventas globales de enzimas grado alimenticio (Singh *et al.*, 1999). Ellas tienen la capacidad de degradar pectinas (polisacáridos complejos presentes en los tejidos vegetales) en moléculas más simples como el ácido D-galacturónico (Castilho *et al.*, 2000).

Las enzimas pécticas son empleadas industrialmente con diferentes propósitos (Lima *et al.*, 2002; Demir *et al.*, 2001):

- Extracción, clarificación y concentración de jugos de frutas.
- Clarificación de vinos.
- Extracción de aceites esenciales, sabores y pigmentos a partir de material vegetal.
- Tratamiento de fibras en la industria textil.
- Producción de papel.
- Fermentación de café y té.
- Tratamiento de aguas residuales con contenido de pectina.

El empleo de las pectinasas se encuentra en pleno auge en la industria de jugos de frutas. Existen diferentes tipos de jugos y consecuentemente procesos y tratamientos enzimáticos variados. En la producción de jugo de manzana, por ejemplo, las pectinasas, además de mejorar el rendimiento durante las etapas de prensado y filtración, remueven las partículas en suspensión para evitar la turbidez. (Lee *et al.*, 2006; Demir *et al.*, 2001; Kashyap *et al.*, 2001) Es así como el propósito de una clarificación enzimática es reducir la viscosidad y facilitar el proceso subsecuente de filtración, pues en la mayoría de los jugos de fruta, la fracción de pectina es frecuentemente identificada como la causante de la mayoría de las dificultades en el desempeño de la filtración (Pilnik y Voragen, 1993).

En el jugo de naranja por ser un jugo turbio, lo que se busca también al adicionar las enzimas pécticas es estabilizar las partículas suspendidas. La poligalacturonasa (PG) es ideal para este caso (Lee *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2003; Kashyap *et al.*, 2001).

### 4.2 CLASIFICACIÓN DE LAS PECTINASAS

Las enzimas pécticas pueden clasificarse en dos grupos, uno de desesterificación y el otro de depolimerización, dependiendo de su mecanismo de acción. Dentro del grupo de



las enzimas de desesterificación se encuentra la pectinestearasa, capaz de remover los grupos metoxilo presentes en la pectina. Las enzimas depolimerizantes, a su vez, se clasifican en poligalacturonasas y poligalacturonato liasas, las cuales atacan el ácido poligalacturónico presente en la pectina, hidrolizando los enlaces  $\alpha$ -1,4 o cortando por  $\beta$ -eliminación, respectivamente (Dogan y Tari, 2008; Hadj-Taieb *et al.*, 2002).

Hacen parte del grupo de las poligalacturonasas o hidrolasas la endopoligalacturonasa (endo-PG) que tiene una acción aleatoria dentro de la cadena y la exopoligalacturonasa (exo-PG) que actúa en los extremos reductores de la cadena (Lima *et al.*, 2002; Kashyap *et al.*, 2001). Así que mientras más actividad exista por parte de la endo-PG, más extremos reductores estarán disponibles para que la exo-PG actúe.

### 4.3 LAS PECTINASAS DEL GÉNERO *Aspergillus*

Aunque muchas levaduras, algunas bacterias y una larga variedad de hongos filamentosos son conocidos por sintetizar pectinasas, la opción preferida por la industria es el hongo del género *Aspergillus*, particularmente el *A. niger*, el cual es un organismo generalmente considerado como seguro (GRAS: Generally Regarded As Safe) (Almeida *et al.*, 2003). Algunas propiedades bioquímicas de las enzimas del género *Aspergillus* son mostradas en la tabla 1.

**Tabla 1.** Propiedades bioquímicas de poligalacturonasas del *Aspergillus* (Niture, 2008)

Hongo (fuente)	Forma PG	pH óptimo	PM (kDa)	Punto isoeléctrico
<i>Aspergillus niger</i>	II	3.8 - 4.3	61	-
	IV	3.0 – 4.6	38	-
	Exo I	-	82	-
	Exo II	-	56	-
<i>Aspergillus awamori</i>	I	-	41	6.1
<i>Aspergillus carbanarius</i>	I	4.0	61	-
	II	4.1	42	-
	III	4.3	47	-
<i>Aspergillus japonicus</i>	I	4.0	38	5.6
	II	5.0	65	3.3
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Exo PG	4.2	78	3.7 -4.7
<i>Aspergillus kawachii</i>	I	2.0 – 3.0	60	3.55
<i>Aspergillus ustus</i>	I	5.0	36	8.2
<i>Aspergillus cinerea</i>	Exo I	5.0	65	8.0
	II	5.2	52	7.8

Son de especial interés para el presente estudio los datos de punto isoeléctrico y PM.

## 4.4 PURIFICACIÓN DE ENZIMAS POR MÉTODOS DE PRECIPITACIÓN

Las diferencias en comportamientos de solubilidad han sido usadas por más de 50 años para la separación de proteínas (Weatherley, 1994). Actualmente, la precipitación es usualmente utilizada como un paso de separación durante las primeras etapas de un proceso de purificación, y normalmente es seguida por otro tipo de separaciones, como la cromatografía. La precipitación puede ser utilizada también como método de concentración de proteínas como paso previo a un proceso de purificación (Harris y Angal, 1995).

Lo anterior se debe a que a pesar de que los procesos de precipitación pueden ser aplicados de manera fácil y reproducible, el diseño de estos no es tan sencillo, ya que no existe aún una teoría predictiva para analizar las posibles relaciones que existen entre los métodos, y consecuentemente el diseño de estos procesos continuará como un ejercicio empírico que necesita largas horas de mediciones en el laboratorio (Weatherley, 1994).

La precipitación de proteínas es obtenida por la adición de sales, inducida por el cambio de pH o potencial iónico, o por adición de solventes -ya sean orgánicos, inertes o polímeros-. Los precipitados pueden ser recuperados por filtración o centrifugación, por lavado o por resuspensión en un buffer adecuado (Harris y Angal, 1995).

### 4.4.1 Precipitación por punto isoeléctrico

Uno de los métodos más fáciles para la precipitación de proteínas se lleva a cabo ajustando el pH de la solución a uno cercano o igual al punto isoeléctrico de la proteína de interés; este proceso es llamado también precipitación isoeléctrica. La superficie de las proteínas está cubierta por grupos cargados positiva y negativamente; cuando está cargada negativamente, se dice que está por encima del punto isoeléctrico, y de manera contraria, cuando la superficie está cargada positivamente, la proteína se encuentra por debajo del punto isoeléctrico (Harrison *et al*, 2003).

En ambos casos, las moléculas cargadas de manera igual a la superficie son repelidas por la proteína. Sin embargo, cuando se alcanza el punto isoeléctrico, las cargas positivas y negativas presentes en la superficie se neutralizan unas con otras y la repulsión electrostática con otras moléculas no ocurre, dando lugar a la atracción entre las moléculas de proteína disueltas y formando así un precipitado (Harris y Angal, 1995). Es importante tener en cuenta que valores extremos de pH pueden favorecer la desnaturalización de la proteína.

Existen dos ventajas en este método cuando se emplean ácidos para causar la precipitación: los ácidos minerales son de bajo costo y muchos de ellos (fosfórico, clorhídrico, sulfúrico) son aceptables en proteínas de la industria de alimentos (Harrison *et al*, 2003).

Diferentes investigadores se han enfocado en la determinación del punto isoeléctrico de proteínas de interés. Sin embargo, para el caso de las poligalacturonasas, el enfoque se justifica más por propósitos de caracterización que de purificación, como es el caso de la poligalacturonasa del *Streptomyces lydicus*, donde se reporta un punto isoeléctrico de 3.1 para la proteína (Jacob *et al.*, 2008). En contraste, Rao y colaboradores (1996) reportan el valor de 8.2 como punto isoeléctrico de la poligalacturonasa del *Aspegillus ustus*.

Los anteriores son los dos casos extremos de todos los estudios encontrados en la revisión de la literatura para poligalacturonasas, y en ambos casos el procedimiento de determinación del punto isoeléctrico implicó barridos de pH dentro del rango 3.0 -9.0, en consonancia con la restricción mencionada de los pH extremos. En particular, la metodología reportada por Jacob y colaboradores (2008) involucra la pre-incubación de la enzima en diferentes buffers a una temperatura de 50°C y la posterior medición de su actividad residual después de 90 minutos.

Sin embargo, sí es posible encontrar reportes donde la precipitación por efectos de pH sea utilizada en la recuperación de variedad de proteínas en general. Perfiles de solubilidad son entonces encontrados en trabajos como el de Zaman y colaboradores (1999), quienes se enfocaban en la recuperación de lisozimas a partir de extracto de canola inicialmente a pH básico, sometiendo dicho extracto a pH's entre 4.0 y 9.0; valores de pH que favorecen la precipitación de diferentes tipos de lisozimas son allí reportados. Metodologías similares son implementadas para la precipitación de hidrolasas del *Lupinus mutabilis* (Anduaga *et al.*, 1999) y de la proteína insecticida del *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* producida en *Escherichia coli* recombinante (Gustafson *et al.*, 1999) reportando precipitaciones a pH 7.0 – 7.5 y a pH 9.0, respectivamente.

#### **4.4.2 Precipitación por salado o “salting-out”**

La precipitación por adición de sales neutras tiene sus orígenes en 1859, cuando Denis realizó un trabajo para la separación de proteínas de la sangre (Weatherley, 1994). La proteína no es desnaturalizada y la actividad enzimática es recuperada mediante la resuspensión del pellet; adicionalmente, las sales pueden estabilizar las proteínas contra la desnaturalización, la proteólisis o la contaminación bacteriana, características que hacen de este método una alternativa fácil y confiable para la separación de proteínas (Harris y Angal, 1995).

La causa de la precipitación por salado difiere a la causada por el ajuste del pH, lo que lleva a que estas técnicas sean usadas una tras otra con el fin de maximizar la purificación de las proteínas deseadas. El *salting-out* depende de la naturaleza hidrofóbica de la superficie de la proteína. Los grupos hidrofóbicos predominan en el interior de ésta, pero algunos se localizan en diferentes regiones de la superficie; el agua es puesta en contacto con la superficie, haciendo que estas regiones no queden expuestas; cuando la sal es agregada, el agua solvata los iones de la sal, y mientras la concentración de sal se

incrementa, el agua es removida de los alrededores de la proteína, eventualmente exponiendo las regiones hidrofóbicas. Dichas regiones en las proteínas pueden interactuar mutuamente o con las de otras moléculas, resultando en una aglomeración. De esta forma las proteínas con regiones hidrofóbicas más abundantes formarán agregados y se precipitarán más rápidamente que aquellas con pocas regiones resultando un fraccionamiento (Harris y Angal, 1995).

Se ha mostrado que la mejor sal para la precipitación de proteínas es el sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ . Su solubilidad es muy alta (aproximadamente 4 M en agua pura) y varía muy poco en el rango de temperaturas de 0 a 30°C. La densidad de una solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  es 1.235 g/cm<sup>3</sup>, con una diferencia suficiente a la densidad de los agregados de proteínas (1.29 g/cm<sup>3</sup> aproximadamente), posibilitando de esta manera una diferenciación de fases después de una centrifugación. Otra ventaja de emplear  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  es que los precipitados de la proteína son a menudo muy estables durante años en soluciones de sal 2 a 3 M; de hecho, muchas enzimas comerciales son normalmente vendidas en soluciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de alta molaridad. La única desventaja de la sal es que no debe ser utilizada por encima de un pH de 8.0 debido a la acción buffer del amoníaco. El citrato de sodio es muy soluble y constituye una buena alternativa cuando la precipitación se necesita realizar a un pH por encima de 8.0 (Harrison *et al.*, 2003).

El hecho de que en la literatura se reporte ampliamente el uso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en la precipitación de proteínas (Singh *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2008; Ninawe *et al.*, 2008) evidencia la veracidad de las líneas anteriores; los porcentajes de saturación reportados varían de acuerdo a la hidrofobicidad de las enzimas de interés, encontrándose valores entre el 20 y 70%.

En la totalidad de los casos encontrados, el proceso de precipitación por salado es acoplado con otros métodos de concentración de proteínas, como es el caso del protocolo implementado por Singh y colaboradores (1999), quienes utilizan la precipitación por salado como etapa preliminar del proceso downstream para la recuperación de pectinasas del *A. carbonarius* y como paso previo a la ultrafiltración, haciendo referencia a un rango muy amplio en el porcentaje de saturación de la sal (0 – 95%) pero sin reportar un valor definido para la precipitación de las poligalacturonasas.

El acoplamiento de la precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y la ultrafiltración se constituye también en la estrategia de Fang y colaboradores (2008) para la purificación y caracterización de una xilanasas del *A. carneus* M34, mientras que la purificación de la xilanasas extracelular del *S. cyaneus* SN32 (Ninawe *et al.*, 2008) se vale del proceso acoplado precipitación – cromatografía de intercambio iónico para alcanzar un rendimiento global del 43%. Para estas otras enzimas el rango reportado en porcentajes de saturación está entre el 20 y el 50%.

#### 4.5 PURIFICACIÓN DE ENZIMAS POR ULTRAFILTRACIÓN

En la ultrafiltración, el agua y otras pequeñas moléculas son pasadas a través de una membrana semi-permeable mediante una fuerza transmembranal tal como la centrifugación o las altas presiones (Harris y Angal, 1995). La superficie de estas membranas contienen poros de diámetros lo suficientemente pequeños como para distinguir los tamaños y formas de las moléculas disueltas; aquellas por encima de un rango de tamaño determinado son retenidas, mientras que aquellas por debajo de dicho rango pasan a través de la membrana junto con el flujo de solvente permeado (Schratter, 1996).

Las membranas para ultrafiltración son caracterizadas de acuerdo al peso molecular de los solutos a retener: el peso molecular de corte de la membrana (MWCO –*molecular weight cutoff*–) es el parámetro de operación más mencionado en la teoría de ultrafiltración y se define como el peso molecular de solutos globulares hipotéticos (proteínas) que serán en un 90% retenidos por la membrana en cuestión (Harris y Angal, 1995).

Sin embargo, puesto que la relación retenido:permeado no es sólo una función del tamaño físico sino también de la forma y características eléctricas de la molécula, el MWCO no pasa de ser un indicador que se encuentra basado en solutos modelo. Moléculas lineales como polisacáridos tenderán a ser permeados por la misma membrana que retendrá moléculas globulares del mismo peso molecular, razón por la cual se plantea como regla escoger una membrana cuyo MWCO sea alrededor de la mitad del valor del peso molecular de la proteína a concentrar, de manera tal que se genere un balance entre altas recuperaciones de proteína y mínimos tiempos de filtración (Schratter, 1996).

Genéricamente hablando, el tamaño de poro en membranas de ultrafiltración es considerablemente más pequeño que en las membranas de microfiltración, y el área de poro por unidad de superficie también es menor. Como consecuencia, el flujo que se maneja en una membrana de ultrafiltración es generalmente mucho más pequeño que el de las membranas de microfiltración (Weatherley, 1994). Los diámetros de poro para ultrafiltración se encuentran entre 1 y 20 nm (Harris y Angal, 1995).

Las técnicas de separación con membranas son particularmente dirigidas a la extracción o purificación parcial de biomoléculas de alto valor agregado solubles en agua, dado que no involucran agentes químicos y no generan desnaturalización térmica (Jaouen *et al*, 1999). Entre las aplicaciones en las que las membranas de ultrafiltración son utilizadas se cuentan la concentración de enzimas, antibióticos, anticuerpos y leche, la recuperación de células vegetales y la desalinización de la sangre, por lo que son usadas ampliamente en industrias de alimentos, farmacéuticas y de lácteos (Weatherley, 1994).

La ultrafiltración es una de las técnicas reportadas en la literatura para la purificación de proteínas a través de métodos acoplados. Para el caso de enzimas pécticas, se reportan muchos estudios, entre ellos la purificación de poligalacturonasas mediante ultrafiltración – cromatografía de intercambio iónico (Jacob *et al.*, 2008), la optimización de procesos downstream para la recuperación de pectinasas del *A. carbonarius* mediante precipitación – ultrafiltración (Singh *et al.*, 1999) y el acoplamiento de sistemas de bifases acuosas con ultrafiltración para la purificación de amiloglucosidasa (Tanuja *et al.*, 2000) alcanzando factores de purificación y rendimientos globales de hasta 9.4 y 91% respectivamente.

#### **4.6 SISTEMAS DE BIFASES ACUOSAS**

Los sistemas de bifases acuosas (en inglés designados como ATPS –*aqueous two-phase systems*–) se definen como aquellos que aprovechan la inmiscibilidad entre las soluciones acuosas de dos polímeros de cadena larga o de un polímero de cadena larga y una sal formada por enlace iónico (Harris y Angal, 1995).

Cada una de las dos fases formadas es rica en uno de los compuestos que originalmente se encontraban en las soluciones acuosas. En la preparación de los sistemas de bifases son utilizados polímeros hidrofílicos; el polietilenglicol (PEG) es tal vez el compuesto más comúnmente encontrado en este contexto (Weatherley, 1994). La inmiscibilidad es explicada por impedimento estérico, es decir, por la imposibilidad de que las cadenas de los polímeros involucrados coexistan (Harris y Angal, 1995).

La presencia significativa de agua en cada una de las fases en equilibrio que se generan es, entre otras, la razón por la cual estos sistemas son empleados en bioseparaciones, generalmente proteicas. El agua, presente en concentraciones de alrededor del 85-90% en cada una de las bifases inmiscibles, ofrece un ambiente factible para los procesos de aislamiento de proteínas, por cuanto es requerimiento importante para el mantenimiento de la actividad enzimática (Weatherley, 1994). Otros factores como la baja tensión superficial en la interfase del sistema y el efecto estabilizante que pueden tener los polímeros, derivan en la protección de las proteínas y en el impedimento de su desnaturalización y disminución de su actividad biológica en general (Harris y Angal, 1995).

En común con muchos procesos de extracción con solvente, el sistema de bifases acuosas es una técnica flexible de separación que permite un alto grado de control de las condiciones de extracción y recuperación mediante el control del ambiente químico; algunos parámetros importantes son el peso molecular del polímero, el pH, la concentración de sales, la temperatura y la composición relativa de cada compuesto para lograr el equilibrio y la formación de las fases. La posibilidad de variar el peso molecular del polímero es también importante en relación al control de la densidad y viscosidad de las fases, lo cual es muy relevante en los procesos de extracción líquido-líquido para una

eficiente disgregación de fases (Weatherley, 1994). El peso molecular del polímero y la viscosidad de las fases son variables directamente proporcionales (Forciniti, 2000).

El comportamiento de los sistemas bifásicos en lo que a miscibilidad se refiere puede ser representado mediante los diagramas de fases empleados en una extracción líquido-líquido. En términos generales, los puntos de operación deben estar ubicados en las composiciones intermedias del sistema bifásico que se encuentre reportado en la literatura, con el objeto de garantizar que la diferencia de densidades de las fases formadas posibilite que la separación de las mismas sea rápida y efectiva (Weatherley, 1994).

Según Tanuja y colaboradores (2000), pocos son los reportes disponibles en la literatura sobre sistemas de extracción por bifases acuosas para la recuperación y purificación de enzimas con el acoplamiento de otras técnicas de filtración, y ninguno de ellos aplica para las enzimas producidas vía fermentación en sustrato semisólido. De hecho, la fermentación en medio semisólido (designada como SLSF -*Slurry State Fermentation*-) ha sido raramente estudiada (García y Ramírez, 2008), encontrándose en la literatura sólo los reportes de De Gregorio y colaboradores (2002) y de Niture y Pant (2004), quienes trabajaron respectivamente con *A. niger* en un medio con pulpa de desecho de un proceso de extracción de jugo de limón y con *Fusarium moniliforme* NCIM 1276 en un medio semisólido con germen de trigo y pulpa de naranja.

Sin embargo, en términos generales, algunas aplicaciones exitosas de la extracción de enzimas mediante sistemas de bifases acuosas sí han sido demostradas (Kula *et al.*, 1984; Boland *et al.*, 1991). El sistema polietilenglicol – maltodextrina, por ejemplo, se perfila como alternativa factible en la extracción de amiloglucosidasa, de acuerdo con los estudios publicados de Tanuja y colaboradores (2000), además de mostrar el enfoque de los sistemas de extracción por bifases acuosas a escala industrial (Szlag *et al.* 1988). Estos investigadores estudiaron el efecto de la adición de diferentes sales en buffer (NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a la fase superior de los sistemas bifásicos –fase rica en PEG, hacia la cual “migraba” la enzima en estudio–, obteniendo incrementos considerables en el factor de purificación cuando se trabajaba con buffer fosfato de potasio. El estudio se apoya en el hecho de que el polietilenglicol y la maltodextrina son sustancias no tóxicas y han sido aceptadas para aplicaciones en industrias farmacéuticas y de alimentos (Kula, 1990; Kula *et al.*, 1982).

Por su parte, Lima y colaboradores (2002) utilizaron directamente el sistema polietilenglicol – buffer fosfato de potasio, evaluando diferentes pesos moleculares del polímero y obteniendo un rendimiento máximo en la recuperación de exopoligalacturonasas del 89.5% al trabajar con PEG-400, mientras que el mayor rendimiento en la recuperación de endopoligalacturonasas fue del 53.5% y se obtuvo al trabajar con PEG-10000, dando a notar la necesidad de recurrir a pesos moleculares extremos para incrementar la recuperación de poligalacturonasas específicas.

Complementariamente, los estudios de Pereira y colaboradores (2003) se enfocan en la extracción de endo-poligalacturonasa obtenida de la fermentación de *K. marxianus* en medio líquido mediante un sistema de bifases acuosas acoplado con una metodología para el reciclaje de uno de los polímeros utilizados, un polímero termoseparable definido como un copolímero aleatorio de óxido de etileno y óxido de propileno, manteniendo después de sus ensayos más del 95% de la actividad inicial de la enzima.

Se observa entonces que, a pesar de que el enfoque de los estudios anteriores es el tratamiento de enzimas, en ningún caso se proponen sistemas o protocolos alternativos para la extracción y purificación de enzimas provenientes de fermentaciones en medios semisólidos, como es el caso de las pectinasas contenidas en el extracto enzimático de la fermentación de *A. niger*.



## 5. DISEÑO METODOLÓGICO

### 5.1 OBTENCIÓN Y PRETRATAMIENTO DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

El proceso de fermentación desarrollado por García y Ramírez (2008) fue implementado para la obtención del extracto enzimático, utilizando *A. niger* (cepa donada por el Centro de Estudios e Investigación en Biotecnología –CIBIOT– de la Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín) en sustrato semisólido con cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*).

La fermentación se realizó empleando cáscara de naranja de la variedad Valencia ajustando el contenido de pectina a 10 g/L y a un pH inicial de 5.0; la agitación fue de 220 rpm y el proceso tardó cuatro días.

Este estudio planteaba que el producto de la fermentación fuera luego sometido a una etapa de extracción sólido-líquido empleando solución de metabisulfito de sodio (SMS) 0.1 M en una relación producto de fermentación – solvente de 1:10. Sin embargo, con el objetivo de aumentar la concentración y actividad enzimática, se definió adelantar una serie de ensayos preliminares para identificar el efecto de diferentes relaciones de extracción variando la relación mencionada, con el objeto de encontrar aquella que maximizara el arrastre de las enzimas de interés. Para estos ensayos la temperatura de operación en la fase de extracción fue entre 28 y 30°C, manteniendo la mezcla bajo agitación constante durante 15 minutos (Singh *et al.*, 1999).

Como procesos complementarios a la metodología planteada en el citado estudio y una vez sometido a la etapa de extracción, el extracto se llevó a centrifugación a 4500 rpm durante 30 min y finalmente a filtración con membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm. De esta manera se obtuvo el extracto enzimático que fue sometido a los procedimientos explicados a continuación.

### 5.2 MÉTODOS DE PRECIPITACIÓN

Inicialmente, se evaluaron los métodos de precipitación por salado y por punto isoeléctrico de manera independiente con el objeto de determinar el efecto de la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y del potencial de hidrógeno en la precipitación de las proteínas con miras a la posterior implementación de un ensayo que involucra el acople de ambas metodologías. Los ensayos que evaluaron los métodos por separado se efectuaron por triplicado, mientras que el ensayo que los acopla fue implementado por duplicado.

#### 5.2.1 Precipitación por salado

Se tomaron 5 mL de extracto enzimático y se ajustaron a una concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  variable en un rango entre el 10 y el 80% de saturación, con incrementos de 5 unidades

de porcentaje y empleando una solución saturada de sal (4 M). Las muestras resultantes se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 min; los sobrenadantes fueron separados mediante micropipetas y los pellets (producto precipitado) fueron resuspendidos en 5 mL de solución buffer acetato 0.1 M y pH 4.5. Finalmente, se procedió a realizar las pruebas pertinentes de determinación de actividad enzimática tanto a los sobrenadantes como a los pellets resuspendidos, de acuerdo a la metodología explicada en el apartado 5.5.

Se preparó una muestra correspondiente al blanco para cada valor dentro del barrido de porcentaje de saturación en estudio, adicionando los volúmenes requeridos de solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4 M a 5 mL de solución de metabisulfito de sodio 0.1 M. Todos los blancos son analizados mediante las pruebas que se aplican a los sobrenadantes y a los pellets resuspendidos.

### **5.2.2 Precipitación por punto isoelectrico**

El pH de 10 mL de extracto se varía dentro del rango 2 - 10, haciendo un barrido con incrementos de 0.5 unidades de pH. Estos experimentos se desarrollaron a una temperatura de 20 °C (temperatura promedio del laboratorio) utilizando soluciones de HCl y NaOH, ambas a una concentración 1 M. Luego de centrifugar las muestras a 4500 rpm durante 15 min, se realizaron las pruebas de actividad enzimática tanto a los sobrenadantes como a los pellets resuspendidos en 10 mL de buffer acetato.

Los blancos para cada una de estas muestras fueron preparados ajustando solución de metabisulfito de sodio 0.1 M a los pH's indicados. Los blancos también fueron analizados con las pruebas correspondientes.

### **5.2.3 Acople salado-pH**

Con esta denominación se designa al ensayo que involucra el tratamiento del extracto enzimático con una integración de las metodologías explicadas en 5.2.1 y 5.2.2.

Utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (sólido) grado reactivo se llevó 1 L de extracto enzimático al porcentaje de saturación que derivó en una mayor actividad enzimática de los pellets resuspendidos, previo análisis de resultados de la metodología explicada en 5.2.1. La solución fue centrifugada a 4500 rpm durante 15 min y los pellets obtenidos fueron recolectados y resuspendidos en 250 mL de buffer acetato, formando así una nueva solución concentrada cuatro veces que constituyó el extracto para realizar el barrido de pH, como fue explicado en 5.2.2.

La preparación de los blancos de este ensayo involucra el ajuste de solución buffer acetato a los pH's del barrido en estudio.

### 5.3 ULTRAFILTRACIÓN

La ultrafiltración se llevó a cabo en el Sistema de Ultrafiltración marca Millipore, modelo Pellicon 2, equipo que presta servicio en los laboratorios de la Universidad EAFIT. El MCWO de la membrana empleada fue de 30 kDa, en consonancia con las características de las enzimas pectinolíticas relacionadas en la tabla 1 y con los parámetros de selección de membrana explicados en el apartado 4.5

El ensayo, efectuado por duplicado, involucró la realización de las pruebas de cuantificación explicadas en el apartado 5.5 a las corrientes de retenidos y permeados resultantes de la realimentación del retenido por tres veces consecutivas. Se partió de 3 L de extracto enzimático que fueron alimentados al equipo, obteniendo al final del proceso sendas corrientes de retenido y permeado de las cuales se tomaron las muestras respectivas; posteriormente, el retenido fue realimentado al proceso para efectuar el segundo de cuatro pasos por el equipo, siendo siempre el alimento la corriente de retenido obtenida en el paso inmediatamente anterior. Se procuró mantener una caída de presión constante y alrededor de 12 psi en todas las pruebas.

### 5.4 SISTEMAS BIFÁSICOS

Se plantean sistemas bifásicos polímero-sal utilizando polietilenglicol de peso molecular 4000 y buffer fosfato. La metodología seguida para la preparación de las bifases fue congruente con las indicaciones de Forciniti (2000); dicha técnica incluye la preparación de una solución stock del polímero en el extracto enzimático que posteriormente se mezcla en proporciones definidas con el buffer fosfato (preparado también en el extracto enzimático) de manera tal que se posibilite la formación de bifases acuosas, lo cual se evidencia después de llevar los sistemas a centrifugación a 3200 rpm durante 10 min.

Para la preparación de los sistemas bifásicos se seleccionaron algunos puntos intermedios del diagrama de fases para el polímero y la sal involucrados (Harris y Angal, 1995). La tabla 2 hace referencia a las composiciones de las mezclas trabajadas, mostrando tres sistemas que fueron evaluados por triplicado.

**Tabla 2.** Preparación de los sistemas de bifases acuosas PEG-4000 y buffer fosfato.

Sistema	% w/w PEG-4000	% w/w buffer fosfato	% w/w extracto enzimático
1	11	30	59
2	12	29	59
3	13	28	59

Estas composiciones se seleccionaron debido a que con composiciones menores de PEG no se alcanzaban a formar las bifases; con composiciones mayores, la viscosidad

complicaba la manipulación de las muestras para la implementación de las pruebas de actividad enzimática.

Las muestras correspondientes al blanco de referencia fueron preparadas para cada uno de los tres sistemas reemplazando el extracto enzimático por solución de metabisulfito de sodio 0.1 M a la hora de preparar el stock de PEG-4000 y el buffer fosfato. La fase superior e inferior de cada sistema (incluyendo su blanco) que fueron obtenidas después de la centrifugación, fueron separadas y sometidas a las pruebas de cuantificación explicadas en el apartado 5.5.

## **5.5 TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

### **5.5.1 Exopoligalacturonasa (exo-PG)**

La cuantificación de exo-PG se realizó colorimétricamente a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro UV Visible Helios de Thermo Electron Corporation. Se tomaron 250  $\mu$ L de la muestra problema y se le adicionaron 250  $\mu$ L de una solución de pectina al 1% en buffer acetato 0.1 M y pH 4.5. Las muestras se llevaron a baño serológico a 45 °C durante 30 minutos y luego se procedió con la cuantificación de la liberación de azúcares reductores a través del método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) (Miller, 1959).

Una unidad de actividad exo-PG (U-exo) fue definida como la concentración de equivalentes en glucosa liberados por minuto en el proceso de hidrólisis de la pectina por acción de cada mg/L de proteína total presente, bajo las condiciones de reacción especificadas. (Debing *et al.*, 2006).

### **5.5.2 Endopoligalacturonasa (endo-PG)**

Se tomaron 2.5 mL de la muestra problema y se mezclaron con 7.5 mL de 1% (w/v) de pectina en buffer acetato 0.1 M, pH de 4.5 en un tubo de ensayo. La solución fue llevada a baño serológico a 45°C durante 10 minutos; luego se detuvo la reacción enfriando durante 2 minutos y alcanzando una temperatura de 24°C, para posteriormente medir la viscosidad haciendo uso del viscosímetro de Ostwald. El blanco o la muestra de referencia para realizar las comparaciones fue la solución obtenida al mezclar el buffer acetato con la solución de pectina.

Una unidad de actividad endo-PG (U-endo) fue definida como la cantidad de proteína total que reduce la viscosidad de la solución de pectina en un 50% por minuto bajo las condiciones mencionadas (Debing *et al.*, 2006). Bajo esta definición, se interpreta que entre más pequeño sea el valor de U-endo, menor cantidad de enzima se requiere para disminuir en mayor grado la viscosidad de la pectina, lo que se traduce en una mayor

actividad enzimática ejercida por las endopoligalacturonasas presentes en la muestra en análisis. Esta es la razón por la que, para este caso, la variable respuesta se da en términos de 1/U, de manera tal que se facilite el procesamiento y visualización de los datos experimentales.

## **5.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

El método de Bradford (Bradford, 1976) fue implementado para la estimación cuantitativa de la concentración de proteína. Esta técnica es más simple, rápida y sensible que el método de Lowry. Además, en comparación con éste último, Bradford implica menor interferencia cuando se trabaja con reactantes comunes y componentes no proteicos de muestras biológicas (Kruger, 2002).

## **5.7 CUANTIFICACIÓN DEL FACTOR DE PURIFICACIÓN**

La medida de la concentración del extracto enzimático en cada proceso de bioseparación está dada por el factor de purificación (PF por sus siglas en inglés, Purification Fold). El factor PF es cuantificado mediante la relación de la actividad enzimática obtenida en el proceso de separación efectuado respecto a la actividad al iniciar dicho proceso.

Los valores PF de los ensayos preliminares fueron calculados por la relación de las actividades enzimáticas medidas en U, unidad que lleva implícita la medida de la proteína. De otro lado, los PF de los procesos downstream evaluados se calculó con base en una relación de las actividades enzimáticas medidas como la reducción en la viscosidad (%) y liberación de equivalentes en glucosa (mg/L), para endo-PG y exo-PG, respectivamente.

## **5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO DE EXPERIMENTOS**

Se plantearon tres diseños de experimentos unifactoriales completamente aleatorios (DCA). El primero de ellos tomó lugar con el objeto de evaluar la relación producto de fermentación – solvente que maximizara el arrastre de las enzimas de interés durante la etapa de pretratamiento del extracto enzimático, siendo entonces el factor la mencionada relación y trabajando con seis niveles. Los factores de los otros dos diseños de experimentos corresponden a las variables que fueron manipuladas en rangos definidos durante la implementación de los procesos downstream. En la tabla 3 se ilustran los niveles para cada factor analizado.

**Tabla 3.** Factores, niveles y variables respuesta de los diseños de experimentos.

DCA	Factor	Variable respuesta	N° de niveles	Niveles		
1	Relación producto:solvente	U-exo	6	1:1	1:2	1:4
		(1/U)-endo		1:6	1:8	1:10
2	% saturación de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	mg/L eq-glucosa liberados	15	10	15	20
				25	30	35
				40	45	50
		% reducción viscosidad		55	60	65
		70		75	80	
3	pH	mg/L eq-glucosa liberados	17	2.0	2.5	3.0
				3.5	4.0	4.5
				5.0	5.5	6.0
		% reducción viscosidad		6.5	7.0	7.5
		8.0		8.5	9.0	
		9.5		10.0	-	

Previo a realizar los respectivos análisis de medias, se comprobó la homogeneidad de varianzas, la independencia de los errores y la distribución normal de las variables respuesta mediante la prueba de Shapiro–Wilks. Verificadas tales condiciones, se procedió a responder las respectivas pruebas de hipótesis con base en los resultados de la tabla ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Si las variables presentaban distribución normal se realizaba un análisis de medias con el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD); de lo contrario, se realizaba una prueba no paramétrica con el método de Kruskal Wallis. El software estadístico que fue empleado fue Statgraphics Plus 5.1<sup>®</sup>.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 TRATAMIENTO PRELIMINAR DEL PRODUCTO DE FERMENTACIÓN

Las fermentaciones implementadas a lo largo del proyecto fueron llevadas a cabo siguiendo el diseño metodológico planteado en el apartado 5.1 para la obtención del extracto enzimático. El producto de las primeras fermentaciones fue sometido al ensayo preliminar que se explica en el numeral 6.1.1 con el objeto de definir las condiciones de la primera etapa de pretratamiento (fase de extracción con SMS); teniendo estas condiciones definidas, el producto de las demás fermentaciones fue sometido a la fase de pretratamiento completa involucrando, además de la extracción con SMS, procesos de centrifugación (4500 rpm durante 30 min) y de microfiltración (membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ ). Se dispuso, de esta manera, de cuatro productos de fermentación pretratado para la posterior evaluación de los procesos downstream.

#### 6.1.1 Extracción con metabisulfito de sodio (SMS)

De acuerdo con la metodología explicada en el apartado 5.1, se probaron seis diferentes relaciones de producto de fermentación – solvente evaluando la actividad enzimática exo-PG y endo-PG para cada una de ellas, efectuando tales ensayos por triplicado y alimentando al software estadístico las variables respuesta U-exo y (1/U)-endo.

Con el objetivo de comprobar la distribución normal de las variables U-exo y (1/U)-endo, se realizó la prueba de Shapiro–Wilks con 95% de confiabilidad. Se encontró que ambas variables se distribuyen normalmente con p-valores calculados de 0.1467 y 0.3314 respectivamente, por lo que se realizó entonces el análisis estadístico mediante un análisis de varianza ANOVA unifactorial (anexo A), indicando que la relación producto de fermentación – solvente tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el arrastre de las enzimas con actividad exo-PG y con actividad endo-PG, con p-valores respectivos de 0.0017 y 0.0001.

El método utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD), el cual indica con una confiabilidad del 95% que la relación 1:4 deriva en una mayor actividad exo-PG del extracto enzimático, mientras que la actividad endo-PG se ve favorecida por la relación 1:6. Con el objeto de evitar incurrir en factores de dilución que dificulten la cuantificación de la actividad de las enzimas a través de los protocolos indicados en el diseño metodológico, se define trabajar en una relación producto de fermentación – solvente de 1:4.

## 6.1.2 Centrifugación y microfiltración

La tabla 4 muestra los promedio de los datos tomados por triplicado de los indicadores de actividad exo-PG y endo-PG que caracterizan al extracto enzimático procedente de la fase de extracción con metabisulfito de sodio (relación producto de fermentación – solvente = 1:4) y al obtenido después de los procesos complementarios de centrifugación (4500 rpm durante 30 min) y microfiltración (membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ ). Estos procesos fueron implementados para cada uno de los cuatro extractos enzimáticos sometidos a la extracción con SMS que fueron obtenidos en las fermentaciones llevadas a cabo durante el proyecto, por lo cual los datos compilados en la tabla son, a su vez, un promedio de los datos calculados para cada una de estos cuatro extractos.

**Tabla 4.** Valores promedio de los indicadores de actividad enzimática evaluados a los extractos enzimáticos en las diferentes fases del pretratamiento

Proceso al que es sometido el extracto enzimático	Actividad exo-PG			Actividad endo-PG		
	mg/L eq-glu liberados	U	PF	% Reducción	1/U	PF
Extracción con SMS	972.73	39.77	1.00	67.36	0.62	1.00
Centrifugación	982.32	76.54	2.20	66.75	1.02	1.89
Microfiltración	1008.40	70.24	1.96	70.48	1.02	1.75

El incremento en los parámetros de actividad enzimática asociado a la implementación del proceso de centrifugación, se explica por la remoción de gran cantidad de residuos como esporas y otros materiales insolubles procedentes del medio de cultivo que toma lugar en dicho proceso. A pesar de que este incremento no se hace notable en el extracto filtrado (última fase del pretratamiento), una apreciación cualitativa indica que la microfiltración conduce también a la remoción de otros sólidos suspendidos procedentes del medio de cultivo que por su densidad no se sedimentaron en la centrifugación y que, durante la evaluación de procesos downstream, podrían derivar en un deterioro de la membrana polimérica utilizada para el método de ultrafiltración (la más delicada).

De allí que tanto el proceso de centrifugación como el de microfiltración se consideren métodos de concentración primaria y hayan sido incluidos en la metodología final de obtención del extracto enzimático a tratar mediante los procesos downstream.

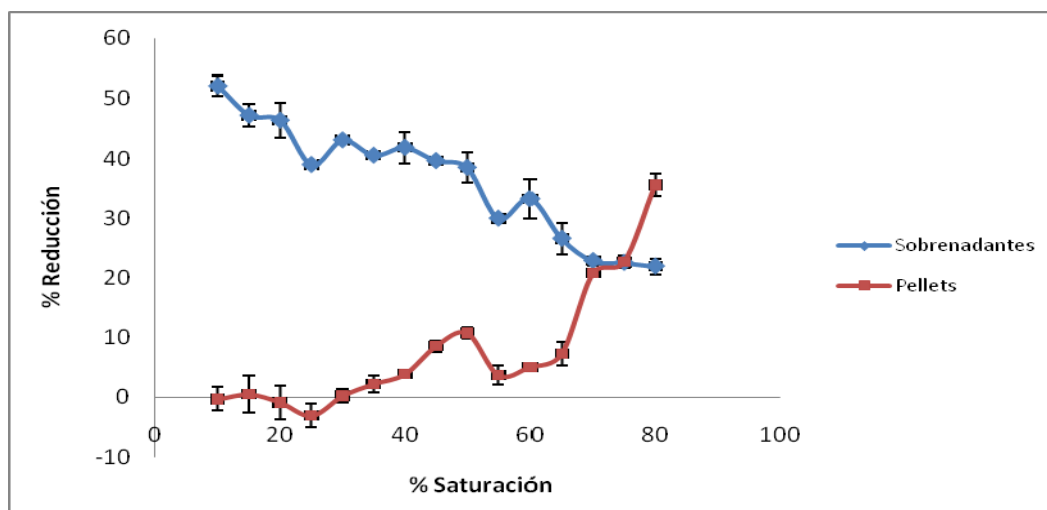
## 6.2 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR SALADO

Las muestras de sobrenadantes y pellets resuspendidos que fueron obtenidas a través de la implementación de la metodología explicada en el numeral 5.2.1 fueron analizadas con el objeto de cuantificar su actividad enzimática característica de acuerdo con los indicadores de reducción en la viscosidad (%) y liberación de equivalentes en glucosa (mg/L), para endo-PG y exo-PG, respectivamente.



La figura 1 muestra el comportamiento de la actividad endo-PG en los diferentes valores del porcentaje de saturación con solución de sulfato de amonio.

**Figura 1.** Actividad enzimática endo-PG en sobrenadantes y pellets obtenidos al realizar salting-out a diferentes concentraciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .



Se muestra que la presencia de la sal induce a la precipitación de endopoligalacturonasas, revelándose además que la actividad endo-PG en los precipitados se ve favorecida por valores altos en el porcentaje de saturación. Sin embargo, el valor más alto en el porcentaje de reducción de la viscosidad de la solución de pectina (35.58% de reducción a un 80% de saturación) es menor a la actividad de los extractos que se reporta en la tabla 4; incluso es menor al cuantificado para el producto de fermentación pretratado que fue empleado para la elaboración de esta prueba, al cual se le asociaba un porcentaje de reducción inicial del 65%.

Esta pérdida de la actividad endo-PG podría ser explicada porque hubo un período de almacenamiento entre el momento de la obtención y pretratamiento del extracto enzimático y el momento en que se iniciaron los ensayos de precipitación por salado. Ello pudo derivar en un proceso de desnaturalización parcial de las proteínas haciendo que la actividad endo-PG se redujera en un 15% aproximadamente. De otro lado, la concentración de proteína total fue de por sí muy reducida para el extracto inicial –valor promedio de 15 mg/L– y al implementar una metodología que involucraba aumentar progresivamente los factores de dilución (se utilizaba solución 4 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para realizar el barrido de porcentajes de saturación), la cuantificación de la actividad enzimática pudo verse comprometida. Ello es coherente con el hecho de que entre más diluida se encuentre la enzima, más se dificulta el hacer una cuantificación precisa de su actividad debido a la sensibilidad de los métodos.

Adicionalmente, es importante señalar que al resuspender un pellet de proteína no siempre se alcanza a recuperar toda la actividad enzimática inicial, debido a que parte de esa enzima precipitada puede haber perdido parcial o totalmente su capacidad de renaturalizarse por los daños que se hayan dado en su estructura, por tanto la actividad no se recupera al 100%.

A pesar de los puntos anteriores, la tendencia creciente resulta ser clara, sugiriendo además la alta presencia de aminoácidos hidrofílicos en la estructura primaria de las endopoligalacturonasas, lo cual explicaría la necesidad de recurrir a porcentajes altos de saturación para conseguir su precipitación (Harris y Angal, 1995). Es importante recalcar que, aunque se evidencia que los pellets resuspendidos en solución buffer no alcanzan la actividad enzimática del extracto inicial, el método toma importancia por el hecho que los volúmenes de trabajo podrían reducirse considerablemente.

Cuando Singh y colaboradores (1999) trabajaban en el proceso downstream para la recuperación de pectinasas obtenidas en la fermentación del *Aspergillus carbonarius*, se reportó un rango muy amplio de porcentajes de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0- 90%) sugiriendo que incluso los porcentajes altos de saturación contenidos en ese intervalo son utilizados para precipitar algunas pectinasas; el PF asociado a este proceso es de 1.3, después de cuantificar las actividades enzimáticas de las muestras, previamente sometidas a un proceso de diálisis (desalinización). El intervalo se estrecha cuando Schnitzhofer y colaboradores (2007) dicen que los mejores efectos de purificación de dos poligalacturonasas procedentes de la fermentación con *Sclerotium rofsii* son alcanzados al 50-95% de saturación con la misma sal, llegando a reducir la cantidad de impurezas al 42%.

Ahora bien, según la prueba de Shapiro-Wilks, los valores de porcentaje de reducción reportados para los pellets resuspendidos no provienen de una función de probabilidades con distribución normal ( $p$ -valor = 0.0002), razón por la cual se implementa una prueba no paramétrica con el método de Kruskal Wallis (anexo B), planteando con un 95% de confiabilidad que el porcentaje de saturación tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el porcentaje de reducción de viscosidad, con un  $p$ -valor de 0.0159 ( $< 0.05$ ). El posterior análisis de medianas a través del gráfico de cajas y bigotes indica que un porcentaje de saturación del 80% favorece en mayor grado la precipitación de enzimas, en concordancia con los comportamientos observados en la figura 1.

La prueba para la determinación de la actividad exo-PG también fue implementada a pellets resuspendidos y sobrenadantes. Sin embargo, dadas las condiciones descritas en párrafos anteriores, la cuantificación de la concentración de equivalentes en glucosa liberados derivó en valores cercanos a cero. Este hecho da fe de la sensibilidad inherente a la metodología de cuantificación de actividad exo-PG cuando se trabaja con muestras cuya proteína total se encuentra muy diluida (Debing *et al.*, 2006) y sugiere que las exopoligalacturonasas tienden a reducir su actividad con el transcurrir del tiempo

(almacenamiento) y con el incremento de los factores de dilución, en un grado mayor que las endopoligalacturonasas.

### 6.3 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR PUNTO ISOELÉCTRICO

Al efectuar el barrido de pH en el extracto enzimático pretratado no se observó generación de pellets en prácticamente la totalidad del barrido. Sólo al someter el extracto a los pH's más básicos (10.5, 11.0, 11.5 y 12.0) se observó cualitativamente la formación de un precipitado, hecho que contrastaba con la literatura, donde se afirma que las diferentes formas de poligalacturonasas producidas por el *Aspergillus niger* muestran puntos isoeléctricos ácidos entre 3.2 y 4.9 (Kester y Visser, 1990; Waksman *et al.*, 1991).

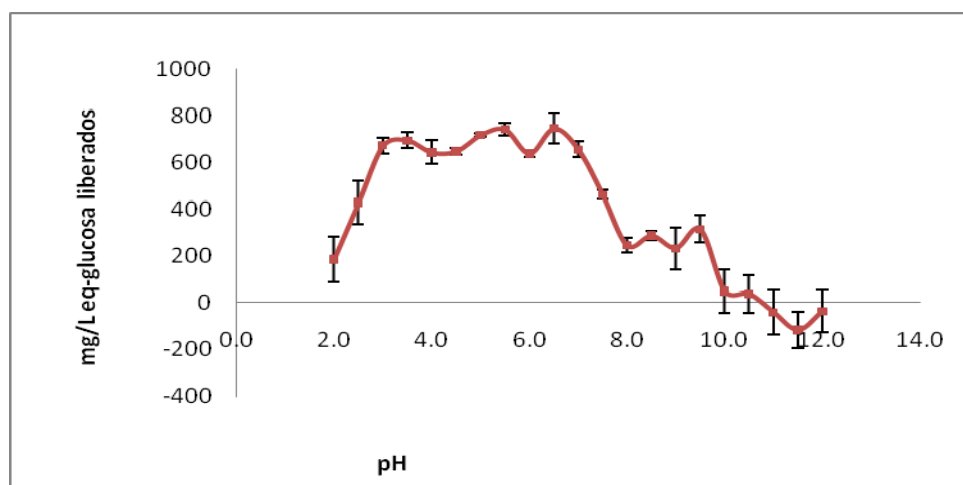
La implementación de las pruebas de actividad enzimática a los pellets obtenidos a pH's básicos derivan en valores extremadamente bajos de concentración de equivalentes en glucosa liberados y de porcentajes de reducción de viscosidad (alrededor de 11 mg/L y 0.22% respectivamente), siendo la desviación estándar alta y sugiriendo un error máximo de 79%.

Estos resultados podrían dar indicios de que los precipitados obtenidos estaban lejos de contener a las enzimas de interés; posiblemente estén constituidos por otra variante de proteínas con un punto isoeléctrico muy básico que se encontraban disueltas en el producto de fermentación. En adición a ello, se cuenta también el hecho de que los protocolos para la cuantificación de indicadores de actividad enzimática exo-PG y endo-PG detallados en 5.5 son notablemente sensibles cuando se trabaja con muestras cuya proteína total se encuentra muy diluida (Debing *et al.*, 2006).

Dada la baja concentración de proteína total en el extracto pretratado que fue empleado en esta prueba (valor promedio de 15 mg/L), la afirmación anterior cobra sentido, sumándole el hecho de que el producto de fermentación fue almacenado después de su pretratamiento durante 10 días, antes de ser utilizado para la evaluación de este método en estudio (desnaturalización de la proteína total).

A pesar de lo anterior, el análisis de los sobrenadantes, a continuación, se torna interesante. La figura 2 muestra la variación en la concentración de equivalentes en glucosa liberados para los sobrenadantes obtenidos después de realizar la precipitación con pH.

**Figura 2.** Variación de la actividad enzimática exo-PG en sobrenadantes por efectos del pH



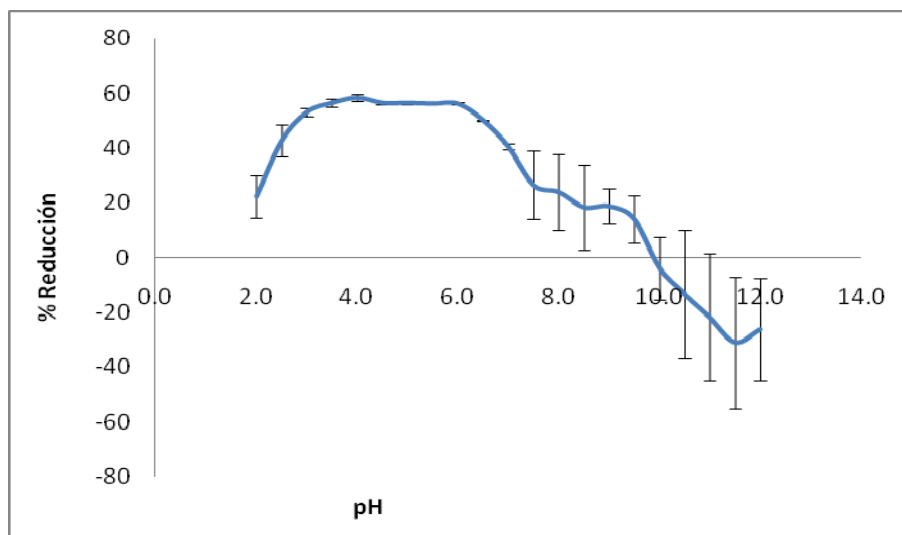
La tendencia observada en la figura 2 sugiere la existencia de un rango de pH entre 3.0 y 6.0 para el cual las exopoligalacturonas presentan una relativa estabilidad en su actividad enzimática. Esto va de acuerdo con la literatura, cuando en ella se afirma que las propiedades fisicoquímicas muestran que la mayoría de las poligalacturonas fúngicas tienen un pH óptimo entre 3.0 y 6.0 (Kester y Visser, 1990; De Lourdes *et al.*, 1991; Devi y AppuRao, 1996; Rao *et al.*, 1996; Gainvors *et al.*, 2000; Niture y Pant, 2004) Se observa también cómo por fuera de este rango, la actividad se ve comprometida, en mayor grado cuando la enzima se encuentra en un medio de pH básico.

Las barras de error, por otro lado, se hacen más notables en los pH's extremos, en consonancia con la alta inestabilidad asociada a la baja concentración de proteína; en la figura 2 se evidencia que a un pH de 8.0 la actividad de exo-PG se ha reducido cerca de un 70% y a pH 10.0 se ha perdido por completo.

La posible desnaturalización parcial de proteínas durante el período de almacenamiento del extracto enzimático pretratado podría explicar la disminución en la concentración de equivalentes en glucosa liberados con respecto a la cuantificada para dicho extracto (valor promedio de 1093.70 mg/L), por lo que, al igual que en la precipitación por salado, no podría hablarse de un factor de purificación para este estudio. No se descarta tampoco que este hecho se deba a que los precipitados obtenidos no contengan únicamente a las enzimas de interés, caso similar al que se enfrentaron Zaman y colaboradores (1999) cuando determinaron que algunos componentes del extracto de canola se precipitaban con el ajuste de pH e interferían con las pruebas de cuantificación de actividad enzimática de las lisozimas, viéndose obligados a recurrir al HPLC para la identificación de dichas enzimas en los precipitados –sin cuantificar finalmente la actividad enzimática–.

Análogamente, se presentan en la figura 3 los resultados de la evaluación de la actividad endo-PG en los mismos sobrenadantes analizados en el numeral 6.3.1, presentándose una tendencia similar a la observada en la figura 2.

**Figura 3.** Variación de la actividad enzimática endo-PG en sobrenadantes al someter el extracto enzimático a un barrido de pH



Es importante notar que los valores mayores de porcentajes de reducción –contenidos en el rango de estabilidad al que se hizo referencia en líneas anteriores (valores de pH entre 3.0 y 6.0)–, son muy cercanos al valor promedio reportado para el producto de fermentación pretratado utilizado en la implementación de esta prueba (valor promedio de 65.69% de reducción). Ello sucede a pesar de que el extracto estuvo almacenado por un período de 10 días antes de hacer las pruebas y de los factores de dilución en los que se incurre para preparar las muestras (adición de volúmenes variables de HCl y NaOH), lo cual, como ya fue planteado en la evaluación de la precipitación por salado, sugiere que las endopoligalacturonasas son menos sensibles que las exopoligalacturonasas a la pérdida de su actividad por las causas mencionadas. De igual forma, se evidencia que la actividad enzimática de endo-PG a pH 8.0 se ha reducido en un 65% y a pH 10.0 es nula.

Es posible citar autores que también reportan rangos de estabilidad para pectinasas de interés; Dogan y Tari (2008), por ejemplo, analizan los cambios en la actividad de la exopoligalacturonasa obtenida en la fermentación del *Aspergillus sojae* cuando se incubó en diferentes buffers en el rango de pH 3-12 durante 2 h a 30° C, encontrando que la enzima retiene alrededor del 73% de su actividad en el rango de pH 4.3–8.0. Cuando el pH es 9.0, ya la actividad de la enzima se ha reducido al 16%.

Cabe anotar que se encuentra reportado que este proceso de inactivación es más rápido a pH's altamente alcalinos –en consonancia con los resultados obtenidos– debido al rompimiento de puentes disulfuro que contribuyen a estabilizar muchos polipéptidos y proteínas, rompimiento que ocurre usualmente a condiciones alcalinas e incluso neutras (Silva *et al.*, 2007).

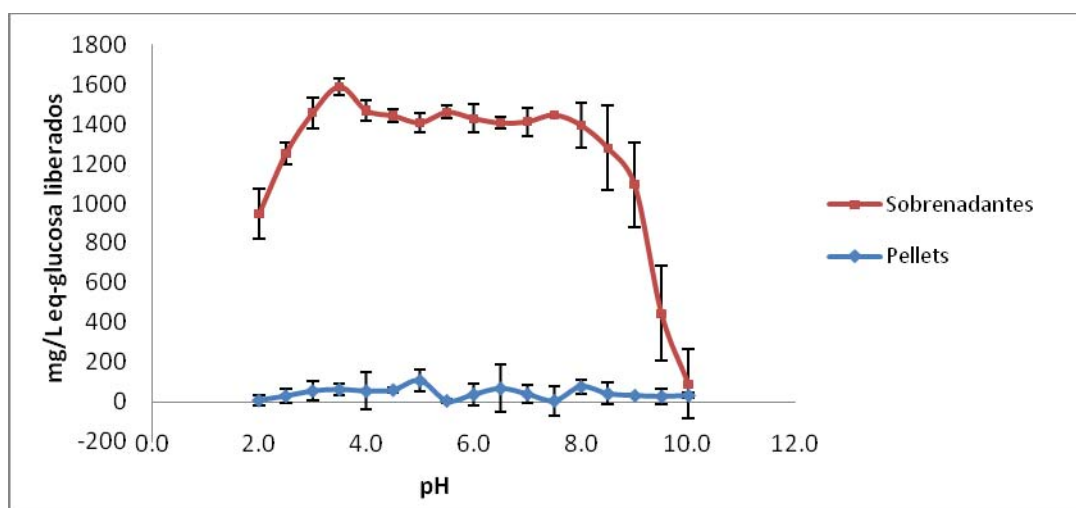
## 6.4 TRATAMIENTO DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO CON EL ACOPLE SALADO-pH

Los resultados hasta ahora obtenidos en los apartados 6.2 y 6.3 proporcionan indicios para la implementación de la metodología de acople, teniendo en cuenta las siguientes dos variantes importantes:

- A. Esta prueba se implementó inmediatamente se aplicaron los procesos de pretratamiento al producto de fermentación (el extracto enzimático no fue almacenado, fue usado de inmediato).
- B. El ajuste de porcentaje de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se realizó empleando la sal en estado sólido, evitando incurrir en factores de dilución que dificulten aún más la cuantificación de las actividades enzimáticas, evaluadas a continuación.

La figura 4 muestra los resultados de la cuantificación de la actividad enzimática exo-PG evaluada en los sobrenadantes y pellets resuspendidos que se obtuvieron después de saturar el extracto con 80% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  –porcentaje definido dados los resultados en el apartado 6.2– y someterlo a diferentes pH's.

**Figura 4.** Actividad enzimática exo-PG de las muestras obtenidas en el acople salado-pH.



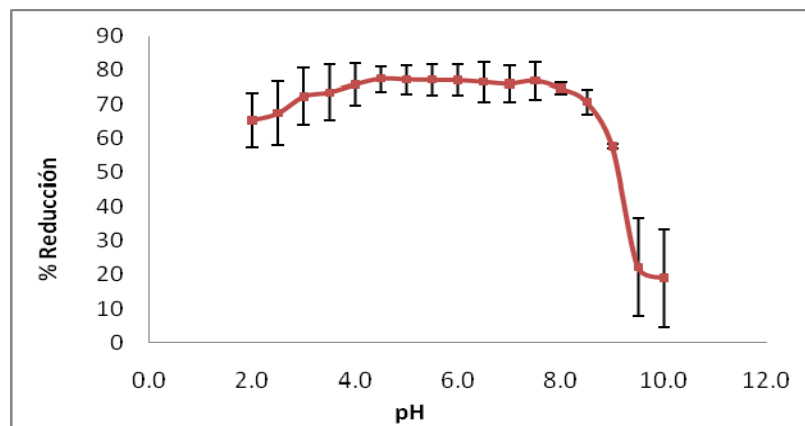
Los resultados de la prueba sugieren que las exopoligalacturonasas se concentran en los sobrenadantes obtenidos después de llevar a centrifugación las muestras ajustadas a los pH's indicados en el eje de abscisas de la figura 4, alcanzando un valor máximo de concentración de equivalentes en glucosa liberados de 1589.59 mg/L a pH 3.5. Al asociar este hecho con un análisis de la tendencia de la curva de los sobrenadantes, resulta justificable el pensar que la metodología en estudio no conduce a la obtención de perfiles de solubilidad sino a una aproximación del rango de estabilidad de las exopoligalacturonasas en el barrido de pH estudiado, tal como lo sugerían los resultados en el apartado 6.3.

Para este caso de estudio, el rango de estabilidad se presenta entre pH 3.0 y 8.0. Contrastando con resultados anteriores donde la estabilidad enzimática se alcanzó hasta pH 6.0, se observa que se amplió el rango hasta 8.0 debido posiblemente a que los restos de sal en el pellet hagan más estable la proteína, además este extracto analizado proviene de pellets resuspendidos en buffer acetato a pH 4.5, siendo éste un ambiente amortiguador. Se evidencia que en un pH superior a 9.0 se reduce a la mitad la actividad y a pH 10.0 ya se ha perdido casi por completo.

De esta manera, se reitera la hipótesis de que la estabilidad de estas proteínas se puede estar viendo afectada a pH's extremos, en concordancia con lo planteado por Fielding y Byrde (1969), quienes establecen que la endopoligalacturonasa producida en la fermentación con *Sclerotinia fructigena* muestra una actividad inusual, no sólo ante inhibidores clásicos, sino también ante valores extremos de pH. Los resultados ilustrados en la figura 4 muestran que las proteínas de interés también alcanzan cierto grado de desnaturalización al ser sometidas a pH's que se encuentran por fuera de su rango de estabilidad.

Al igual que en el caso de la cuantificación de actividad enzimática endo-PG (a continuación) se observa que a pH's superiores a 8.0 la desviación estándar se hace más grande, posiblemente debido a la inestabilidad de las enzimas en ambientes básicos (Waksman *et al.*, 1991; Niture y Pant, 2004; Niture, 2008). La figura 5 muestra los resultados de la cuantificación de la actividad enzimática endo-PG evaluada en los sobrenadantes obtenidos luego de la implementación de la misma metodología en estudio.

**Figura 5.** Actividad enzimática endo-PG de los sobrenadantes obtenidos en el acople salado-pH.



El valor máximo en el porcentaje de reducción es de 77.45% a pH 4.5. Se observa que la tendencia de la curva posibilitaría plantear un análisis análogo al planteado en la cuantificación de actividad enzimática exo-PG, dando pie para hablar nuevamente de un rango de estabilidad para las enzimas de interés y no de un perfil de solubilidad. La pendiente es muy grande entre 9 y 10, pH más hostil para la enzima. La actividad es mayor en el rango de 4 y 8. A pH 2 se reduce en un 15% la actividad.

Dado el comportamiento de las barras de error, también hay bases para afirmar que la desnaturalización de las endopoligalacturonas se “acentúa” a pH’s básicos, presentando estas enzimas un rango de estabilidad muy similar al encontrado para las exopoligalacturonas (pH’s comprendidos entre 3.5 y 8.0).

Los resultados hasta ahora mostrados sugieren que no tendría objeto reportar la actividad endo-PG de los pellets resuspendidos: los valores que reporta la figura 4 para actividad exo-PG en los pellets sugieren la poca presencia de extremos no reductores de moléculas de ácido galacturónico en el momento de poner las muestras en contacto con solución de pectina, lo cual conduce a afirmar que la acción aleatoria de las endopoligalacturonas sobre la cadena de pectina es poco significativa, dejando muy pocos extremos reductores para que las exopoligalacturonas actúen.

Ahora bien, el factor de purificación es calculado cuando se relacionan el promedio de la actividad enzimática exo-PG y endo-PG del producto de fermentación que fue destinado para los ensayos realizados durante la evaluación de esta metodología con las actividades máximas promedio obtenidas en las pruebas para los sobrenadantes después de hacer el barrido de pH. La tabla 5 resume entonces los resultados de la prueba:

**Tabla 5.** Efecto del acople salado-pH en la actividad enzimática del extracto.

Actividad enzimática	Extracto inicial	Sobrenadantes obtenidos	pH	PF
Exo-PG*	886.80	1589.59	3.5	1.79
Endo-PG**	66.27	77.45	4.5	1.17

\*Expresada en mg/L de equivalentes en glucosa liberados

\*\*Expresada en porcentaje de reducción de viscosidad de solución de pectina

El PF indica la cantidad en que la actividad de la enzima fue incrementada. Es muy importante hacer énfasis en el hecho de que el aumento de los indicadores de actividad enzimática que se hizo notable en esta prueba, obedece al efecto de concentración de la proteína precipitada en un factor aproximado de cuatro veces que involucra la metodología de la misma. Tal efecto posibilita que los protocolos de actividad enzimática ya no sean tan sensibles, al trabajar con muestras donde la proteína total ya no se encontrara tan diluida.

Sin embargo, el hecho de que la proteína total haya sido concentrada cuatro veces no implica que los indicadores de actividad enzimática se cuadrupliquen con respecto a los valores reportados para el extracto inicial. Dentro de esas proteínas se encuentran también otras que no son de interés y que, por ende, no responden a los protocolos de cuantificación de actividad, añadiendo además la posibilidad de que el sustrato utilizado en las pruebas (solución de pectina) haya sufrido una hidrólisis completa de los grupos reductores de ácido galacturónico o equivalentes en glucosa.



Casos en los que se haga referencia a este efecto de concentración incluyen el de Schnitzhofer y colaboradores (2007) cuando estudian la precipitación por salado de dos poligalacturonasas del *S. rolfssii*, y aunque no revelan la relación de volumen entre el extracto inicial y el buffer que utilizan para resuspender los precipitados, reportan haber conseguido un rendimiento de las poligalacturonasas recuperadas de más del 97% gracias en mayor medida a este efecto de concentración.

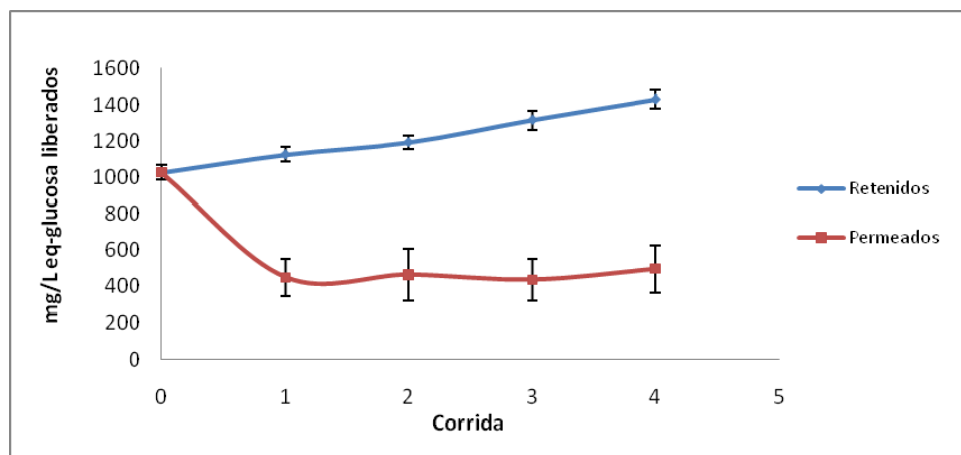
Al alimentar el software estadístico con los valores reportados de concentración de equivalentes en glucosa liberados en función del pH, se encuentra que los datos no provienen de una función de probabilidad con distribución normal, por lo cual se recurre a la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Según esta prueba, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los datos de concentración, sugiriendo que el factor pH no ejerce un efecto significativo en los indicadores de actividad exo-PG (p-valor = 0.0752 > 0.05). Lógicamente, este resultado estadístico no tiene sentido práctico (el amplio rango de estabilidad de la actividad enzimática es interpretado por el software como un efecto poco significativo del pH en la variable respuesta), razón por la cual se decide incluir en el reporte la gráfica de medias, donde sí se hace evidente que los pH's extremos derivan en una disminución de la actividad (anexo C).

Al tener la misma tendencia, caso análogo toma lugar para los valores reportados de porcentaje de reducción de viscosidad en función del pH.

## 6.5 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE ULTRAFILTRACIÓN

La figura 6 muestra el comportamiento de la actividad exo-PG analizado para las corrientes de retenido y permeado obtenidas en cada uno de los cuatro pasos por el equipo de ultrafiltración, utilizando una membrana con un MWCO de 30 kDa.

**Figura 6.** Actividad enzimática exo-PG de los retenidos y permeados procedentes del proceso de ultrafiltración



Puede observarse en la figura 6 cómo la concentración de equivalentes en glucosa liberados se hace cada vez mayor en la corriente de retenidos cuando ésta es pasada por el equipo de manera sucesiva en tres ocasiones, sugiriendo un aumento en la actividad enzimática de las exopoligalacturonasas y alcanzando un máximo promedio de 1428.05 mg/L al final del ensayo.

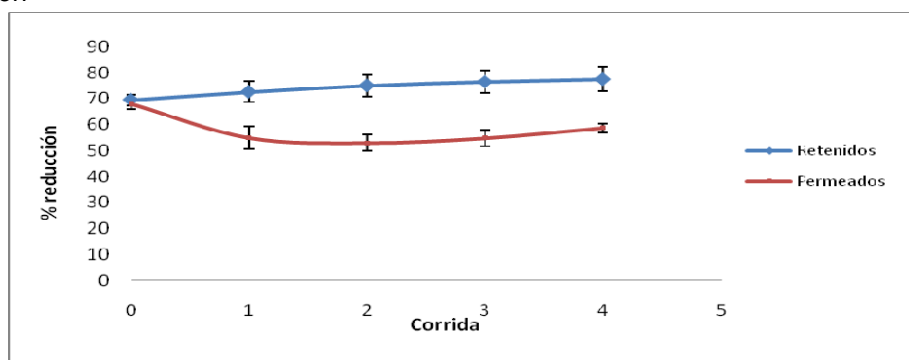
El permeado obtenido después del primer paso del extracto enzimático por el equipo presenta una disminución de cerca del 60% de la actividad exo-PG con respecto a la que presenta el extracto que se alimenta inicialmente, mientras que en ese mismo paso la corriente del retenido revela un incremento de aproximadamente un 12% en dicha actividad, incremento que se mantiene constante a través de sus realimentaciones sucesivas.

En ello juega un papel importante el efecto de concentración inherente a la prueba, puesto que el volumen de retenido que se obtiene de una corrida y se alimenta en la siguiente es cada vez menor; sería entonces coherente que dicho efecto de concentración también pueda considerarse como constante, y de hecho lo es, puesto que al tener en cuenta los respectivos factores de dilución (calculados como el cociente entre el volumen de retenido y el volumen de alimento en las corridas respectivas), la concentración de equivalentes en glucosa liberados resulta ser constante para la corriente de retenidos en cada uno de los cuatro pasos por el equipo (se calcula un valor promedio de 880.30 mg/L con una desviación estándar igual a 24.17 y un error del 2.75%). Este valor en mg/L es menor en un 14% a la concentración promedio que se reportaba para el extracto inicial (el alimentado en la primera corrida), lo cual se explica posiblemente al tener en cuenta el efecto de las pérdidas de volumen (aproximadamente 100 mL de líquido quedaban atrapados en las mangueras del equipo después de cada corrida).

Se observa también en la figura 6 que la actividad exo-PG en los permeados muestra una tendencia constante una vez se alimenta por primera vez el extracto enzimático al equipo, ratificando que la recuperación asociada a la ultrafiltración es uniforme.

Es sabido que la mayoría de poligalacturonasas fúngicas presentan un peso molecular en el rango de 25 a 82 kDa (Kester y Visser, 1990; Polizeli *et al.*, 1991; Barense *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2002). Ahora bien, cuando Presey y Avants (1993) reportan que los pesos moleculares de la exopoligalacturonasas y de la endopoligalacturonasas son 68 y 41 kDa respectivamente, es de esperar que éstas últimas requieran una membrana de MWCO menor para que sean recuperadas en la corriente de retenido. Ello explica por qué en la figura 7 se presentan incrementos en la actividad enzimática endo-PG de corrida en corrida que son menores a los observados en la figura 6.

**Figura 7.** Actividad enzimática endo-PG de los retenidos y permeados procedentes del proceso de ultrafiltración



Un porcentaje de reducción máximo de 77.43% se alcanza al final del proceso cuando se analiza la corriente de retenidos, mientras que la curva de permeados muestra una tendencia ligeramente creciente en la actividad endo-PG, sugiriendo que la presencia de endopoligalacturonas se incrementa levemente en los últimos permeados del ensayo. Lo anterior va de acuerdo con los reportes de Schratte (1996) cuando afirmaba que debido a que la relación retenido:permeado no es sólo una función del tamaño físico sino también de la forma y características eléctricas de las moléculas, se plantea como regla escoger una membrana cuyo MWCO sea alrededor de la mitad del valor del peso molecular de la proteína a concentrar.

Teniendo entonces en cuenta los valores de peso molecular de las endopoligalacturonas y el MWCO de la membrana empleada en estos ensayos (41 y 30 kDa, respectivamente), podría entonces explicarse el hecho de que la membrana haya permeado cada vez más moléculas de endopoligalacturonas de corrida en corrida, añadiendo el hecho de que a la membrana no se le hacían lavados antes de cada paso por el equipo, por lo que una parte de las enzimas de interés que quedan retenidas en una corrida se permea en la siguiente por efectos de la presión del flujo.

La tabla 6 resume los resultados de la prueba, reportando los PF de la corriente de retenidos obtenida en el último paso por el equipo. Al igual que en el caso del acople salado-pH, es muy importante hacer énfasis en el hecho de que el aumento de los indicadores de actividad enzimática, obedece al efecto de concentración de la proteína.

**Tabla 6.** Efecto de la ultrafiltración en la actividad enzimática del extracto.

Actividad enzimática	Extracto inicial	Retenido, corrida 4	PF
Exo-PG*	1026.54	1428.05	1.39
Endo-PG**	68.01	77.43	1.14

\*Expresada en mg/L de equivalentes en glucosa liberados

\*\*Expresada en porcentaje de reducción de viscosidad de solución de pectina

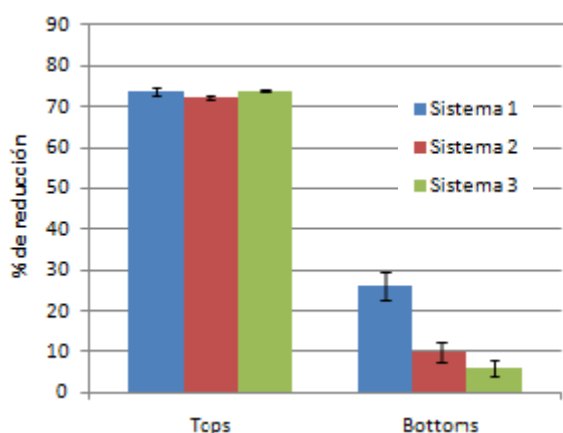
Estos resultados contrastan con los de Jacob y colaboradores (2008), quienes al hacer pasar el crudo filtrado que obtuvieron por fermentación en estado sólido de *Streptomyces lydicus* por un equipo de ultrafiltración Amicon con una membrana de MWCO de 10 kDa, calcularon un PF de 6.0. En su estudio, la enzima purificada era una exopoligalacturonasa con un peso molecular de 43 kDa, 4.3 veces más el MWCO de la membrana utilizada.

10 kDa es también el MWCO de la membrana que utilizaron Celestino y colaboradores (2006) en el equipo de ultrafiltración Amicon que emplearon en la purificación de una pectinasa de peso molecular 35 kDa y que fue obtenida en la fermentación con *Acrophialophora nainiana*. Manteniendo una presión constante de 2.0 kgf/cm<sup>2</sup>, los investigadores lograron concentrar la enzima hasta llegar a un PF de 10. La actividad enzimática fue encontrada sólo en la corriente de retenidos.

## 6.6 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR BIFASES ACUOSAS

La actividad enzimática endo-PG fue cuantificada para las fases superior e inferior de tres sistemas bifásicos obtenidos al preparar mezclas con diferentes composiciones en peso de PEG-4000 y buffer fosfato (ver tabla 2), y los resultados se ilustran en la figura 8.

**Figura 8.** Actividad enzimática endo-PG de tres sistemas preparados de bifases acuosas.

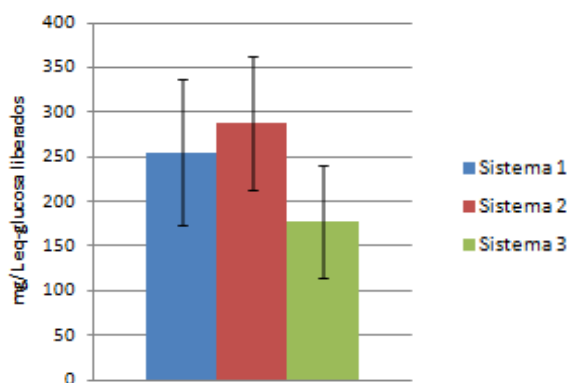


En consonancia con la literatura (Kula *et al.*, 1984; Boland *et al.*, 1991; Tanuja *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2002), las enzimas pécticas sienten afinidad por la fase superior, rica en el polímero. Aunque se observa que no hay una diferencia significativa en los porcentajes de reducción de viscosidad cuando se trabaja con los diferentes sistemas (promedio de 73.27% de reducción, desviación estándar de 0.90 unidades de porcentaje), el comportamiento de las fases inferiores sugiere que hay una mayor partición en la medida en que el sistema bifásico tenga una composición en peso de polietilenglicol mayor, lo cual va de acuerdo con las consideraciones de afinidad mencionadas.

Se nota que la desviación estándar en las pruebas correspondientes a las fases inferiores es mayor a las de las fases superiores. Nuevamente, los reportes de Debing y colaboradores (2006) son tomados como punto de referencia cuando hablan de la sensibilidad inherente a la metodología de cuantificación de actividad enzimática cuando se trabaja con muestras cuya proteína total se encuentra muy diluida.

Como ya se ha mencionado, dicha sensibilidad se torna mucho mayor a la hora de implementar las pruebas de actividad enzimática exo-PG, siendo la figura 9 una muestra de ello.

**Figura 9.** Actividad enzimática exo-PG de las fases superiores obtenidas en la preparación de tres sistemas de bifases acuosas.



Desviaciones estándar alrededor de 80 mg/L se hacen apreciables en la cuantificación de actividad exo-PG de las fases superiores de los tres sistemas preparados, la cual no llega en ninguno de los casos a 300 mg/L de equivalentes en glucosa liberados. En relación con el extracto inicial empleado, la actividad enzimática se redujo tres veces, sugiriendo una inhibición por efecto de fuerzas iónicas. Muchos estudios muestran que varias poligalacturonasas fúngicas son inhibidas por la presencia de iones metálicos (Cananne y Doneche, 2002; Mohamed *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007), y ello no excluye al ion potasio presente en el buffer fosfato que se utiliza en la preparación de las bifases.

De esta manera, sólo tendría sentido hablar de un factor de purificación (PF) para el caso de las endopoligalacturonasas, según se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7.** Efecto de la extracción por bifases acuosas en la actividad enzimática del extracto.

Actividad enzimática	Extracto inicial	Fase superior del sistema bifásico	PF
Exo-PG*	886.80	287.31	-
Endo-PG**	66.27	73.27	1.11

\*Expresada en mg/L de equivalentes en glucosa liberados

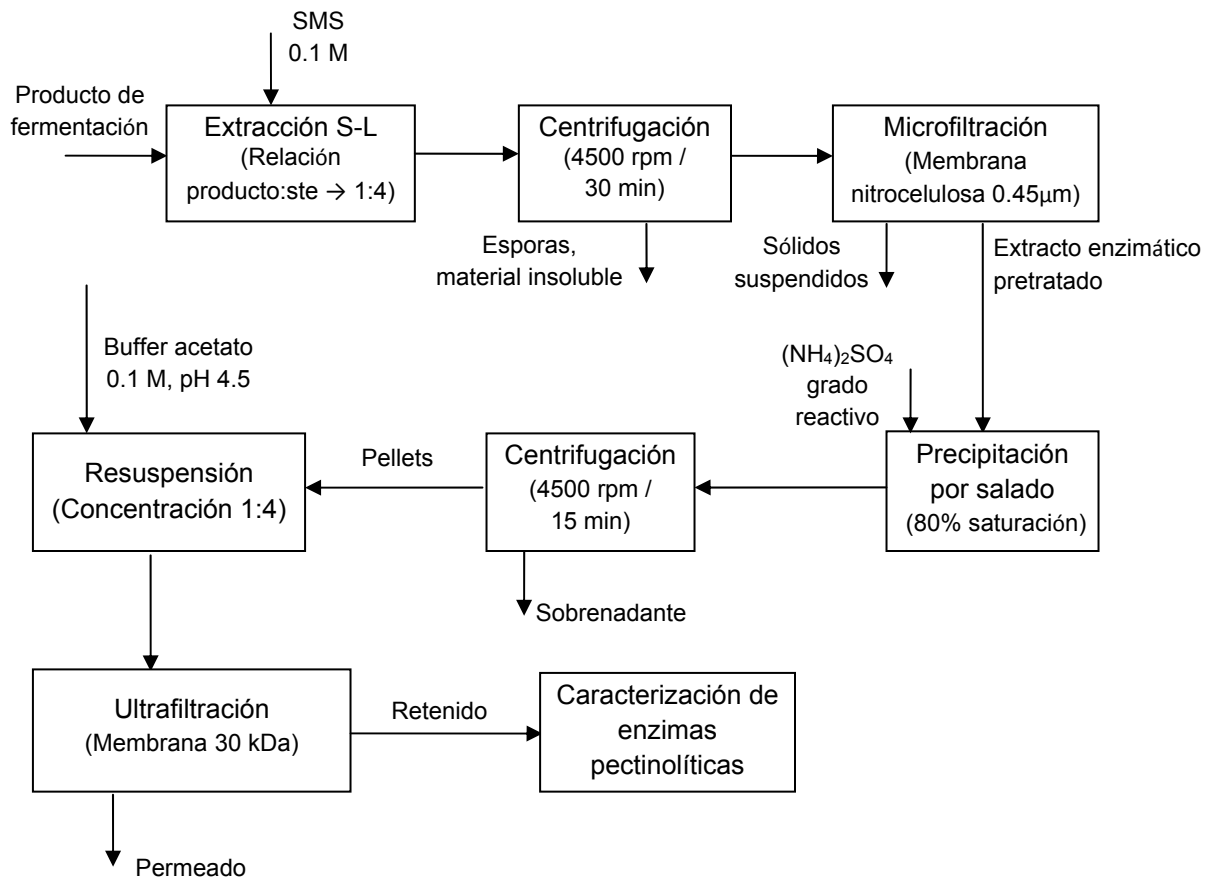
\*\*Expresada en porcentaje de reducción de viscosidad de solución de pectina

Los resultados contrastan con los de Lima y colaboradores (2002) quienes reportan factores de purificación de 8.27 y 1.46 para la endo-PG y exo-PG respectivamente al trabajar con PEG-3350 y buffer fosfato a 4 °C y pH 7.0 Los investigadores partían de una enzima comercial (Pectinex-3XL®) donada por New Nordisk (Araucária, Brasil) que, de acuerdo con el fabricante contenía pectinestearasa, pectinliasa, exo-PG y endo-PG.

## 6.7 ESQUEMATIZACIÓN, POSIBLE RUTA DE PURIFICACIÓN

La figura 10 esquematiza la ruta de purificación propuesta de acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de los procesos downstream en estudio.

**Figura 10.** Ruta de purificación propuesta para la purificación de las enzimas pectinolíticas.



## CONCLUSIONES

El extracto enzimático obtenido en la fermentación de *Aspergillus niger* en medio semisólido que fue sometido a una etapa de pretratamiento y luego empleado en la evaluación de procesos downstream presenta una concentración muy baja de proteínas, de manera tal que el efecto de la precipitación por salado, ultrafiltración y extracción por bifases acuosas no se hace muy notable cuando se realiza el contraste con la literatura.

En el presente estudio se constata que al someter el extracto enzimático a porcentajes de saturación altos de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , los pellets revelan actividad enzimática exo-PG y endo-PG siempre y cuando sean resuspendidos en un volumen menor al del extracto inicial y tenga por ende lugar un efecto de concentración. En caso de no concentrar las enzimas, sólo la endo-PG alcanza a mostrar una actividad baja.

Las enzimas pectinolíticas en estudio presentan un rango de pH en el cual su actividad enzimática es estable. Si las enzimas son sometidas a un pH por fuera de ese rango, ocurre una desnaturalización que deriva en una pérdida de su actividad enzimática, ocurriendo una inhibición total a pH 10 y superiores.

El proceso de precipitación por punto isoeléctrico de las enzimas endo-PG y exo-PG obtenidas en el proceso de fermentación implementado en este estudio no resulta ser aplicable puesto que no deriva en un perfil de solubilidad característico.

El proceso de ultrafiltración se perfila como una alternativa atractiva para la recuperación de las enzimas pectinolíticas en estudio, mientras el sistema de bifases acuosas preparado con polietilenglicol de peso molecular 4000 y buffer fosfato se considera, bajo las condiciones estudiadas, como un posible método para el incremento del factor de purificación (PF) de las endo-PG.

La implementación de una ruta de purificación para las enzimas pectinolíticas ha de incluir las etapas que condujeron a los PF más altos, siendo requeridos los efectos de la concentración para maximizar la recuperación de las enzimas. Cada etapa debe por ende alimentarse con un volumen menor al alimentado en la etapa inmediatamente anterior.

## RECOMENDACIONES

Dadas las diferencias en los pesos moleculares de las enzimas exo-PG y endo-PG se recomienda que, en el proceso de ultrafiltración, sea instalada una membrana diferente de acuerdo a la proteína que se desee recuperar, siendo en lo posible mucho más pequeño el peso molecular de corte de la membrana que se utilice para retener las endo-PG.

Un sistema de bifases acuosas que no implique la presencia de iones metálicos en el medio podría conllevar a maximizar el PF para las endo-PG y posibilitar que la actividad enzimática exo-PG sea percibida por las pruebas de cuantificación aquí implementadas. El sistema polietilenglicol – maltodextrina es, en este sentido, sugerido por la literatura; un trabajo posterior involucraría entonces la estandarización de pruebas de cuantificación de actividad enzimática en las que la presencia de azúcares reductores como la maltodextrina no se constituya en una interferencia que imposibilite la aplicación de tales pruebas a las muestras en estudio.

Tanto las observaciones anteriores como la ruta de purificación propuesta derivarían, por supuesto, en resultados más interesantes en el momento en que las proteínas del crudo enzimático inicial no se encuentren tan diluidas. Al respecto se plantea la posibilidad de omitir la fase de extracción sólido-líquido con metabisulfito de sodio y trabajar entonces con el producto de fermentación filtrado a través de bomba de vacío, centrifugado y sometido a la etapa de microfiltración, evitando de esta manera incurrir en factores de dilución que dificulten la determinación de la actividad enzimática y que hagan los procesos downstream estudiados más efectivos.

Debe tenerse en cuenta desde la implementación de la fermentación que en la ruta de purificación la etapa de ultrafiltración presenta altos requerimientos de volúmenes. De allí que se haga necesario disponer de alrededor de 3.5 L de producto de fermentación pretratado.



## ANEXO A:

### Resultados del diseño unifactorial para el estudio de la relación producto-solvente en la fase de pretratamiento del extracto enzimático

Análisis de la Varianza para U exo - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Relación	1.0196	5	0.203921	7.87	0.0017
RESIDUOS	0.310819	12	0.0259016		
TOTAL (CORREGIDO)	1.33042	17			

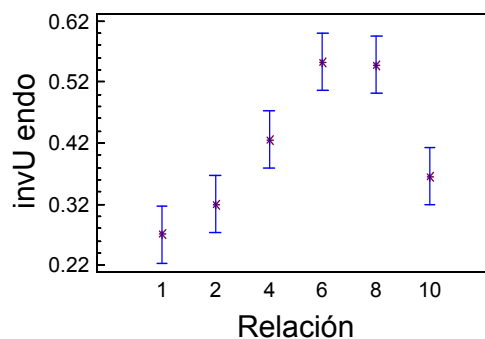
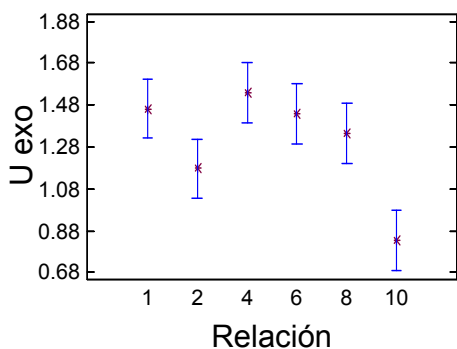
Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Análisis de la Varianza para invU endo - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Relación	0.206602	5	0.0413205	14.92	0.0001
RESIDUOS	0.0332249	12	0.00276874		
TOTAL (CORREGIDO)	0.239827	17			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

### Medias y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD Medias y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



Contraste Múltiple de Rangos para U exo según Relación

Método: 95.0 porcentaje LSD

Relación	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	3	0.831462	0.0929186	X
2	3	1.17564	0.0929186	X
8	3	1.34303	0.0929186	XX
6	3	1.44062	0.0929186	XX
1	3	1.46333	0.0929186	X
4	3	1.53787	0.0929186	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*0.287692	0.286311
1 - 4	-0.0745358	0.286311
1 - 6	0.0227118	0.286311
1 - 8	0.120303	0.286311
1 - 10	*0.631872	0.286311
2 - 4	*-0.362228	0.286311
2 - 6	-0.26498	0.286311
2 - 8	-0.167389	0.286311
2 - 10	*0.344179	0.286311
4 - 6	0.0972476	0.286311
4 - 8	0.194839	0.286311
4 - 10	*0.706407	0.286311
6 - 8	0.0975913	0.286311
6 - 10	*0.60916	0.286311
8 - 10	*0.511568	0.286311

\* indica una diferencia significativa.

#### Contraste Múltiple de Rangos para invU endo según Relación

Método: 95.0 porcentaje LSD

Relación	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	3	0.271159	0.0303795	X
2	3	0.320268	0.0303795	XX
10	3	0.36507	0.0303795	XX
4	3	0.425667	0.0303795	X
8	3	0.547425	0.0303795	X
6	3	0.553089	0.0303795	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	-0.0491094	0.0936087
1 - 4	*-0.154508	0.0936087
1 - 6	*-0.281931	0.0936087
1 - 8	*-0.276267	0.0936087
1 - 10	*-0.0939116	0.0936087
2 - 4	*-0.105399	0.0936087
2 - 6	*-0.232821	0.0936087
2 - 8	*-0.227157	0.0936087
2 - 10	-0.0448022	0.0936087
4 - 6	*-0.127422	0.0936087
4 - 8	*-0.121758	0.0936087
4 - 10	0.0605968	0.0936087
6 - 8	0.00566409	0.0936087
6 - 10	*0.188019	0.0936087
8 - 10	*0.182355	0.0936087

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO B:

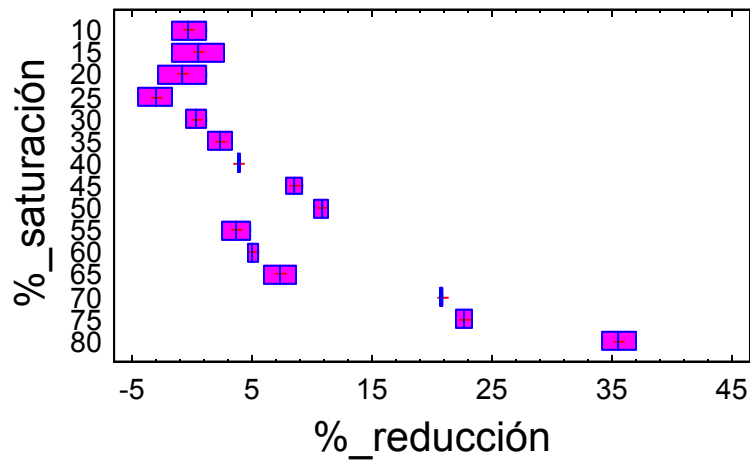
Resultados del diseño unifactorial para el estudio del efecto de los porcentajes de saturación en la precipitación de endopoligalacturonasas

Contraste de Kruskal-Wallis para %\_reducción según %\_saturación

%_saturación	Tamaño muestral	Rango Promedio
10	3	5.75
15	3	7.75
20	3	5.0
25	3	3.0
30	3	7.0
35	3	11.5
40	3	14.5
45	3	21.0
50	3	23.5
55	3	14.0
60	3	17.0
65	3	20.0
70	3	25.5
75	3	27.5
80	3	29.5

Estadístico = 27.6404 P-valor = 0.0158742

### Gráfico de Cajas y Bigotes



### ANEXO C:

#### Resultados del diseño unifactorial para el estudio del efecto del pH en la actividad enzimática de las muestras del acople salado-pH

Contraste de Kruskal-Wallis para egglucosa\_liberados según pH

pH	Tamaño muestral	Rango Promedio
2	2	6.0
2.5	2	10.0
3	2	23.5
3.5	2	33.5
4	2	24.0
4.5	2	22.0
5	2	20.0
5.5	2	24.0
6	2	23.0
6.5	2	21.0
7	2	21.0
7.5	2	22.5
8	2	19.5
8.5	2	14.5
9	2	8.0
9.5	2	3.0
10	2	2.0

Estadístico = 24.7059 P-valor = 0.075181

Contraste de Kruskal-Wallis para %\_reducción según pH

pH	Tamaño muestral	Rango Promedio
2	2	11.0
2.5	2	16.0
3	2	17.0
3.5	2	18.0
4	2	20.75
4.5	2	25.0
5	2	26.0
5.5	2	26.0
6	2	24.25
6.5	2	23.5
7	2	20.0
7.5	2	24.5
8	2	20.5
8.5	2	14.0
9	2	6.0
9.5	2	3.0
10	2	2.0

Estadístico = 20.1132 P-valor = 0.215167

Gráfico de Cajas y Bigotes

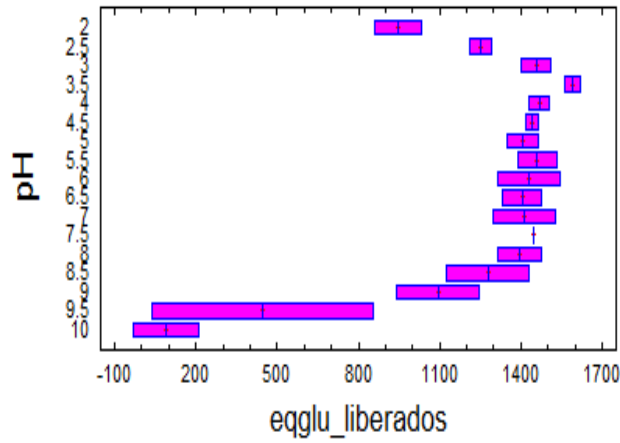
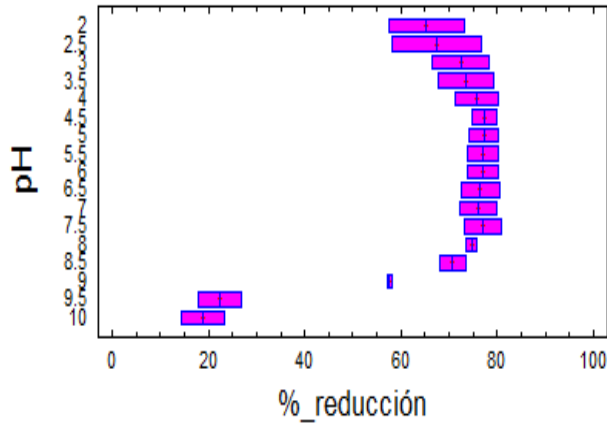
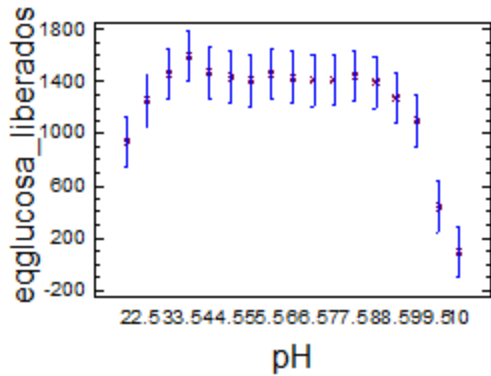


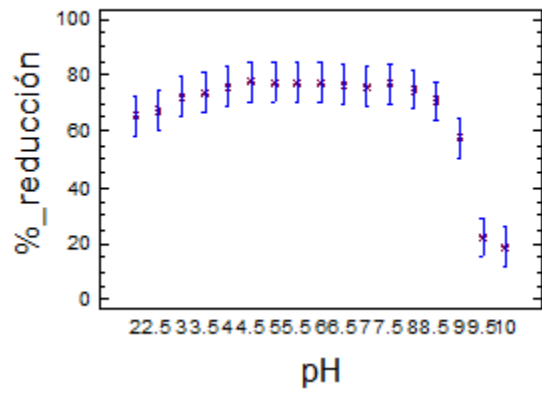
Gráfico de Cajas y Bigotes



Medias y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



Medias y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



## BIBLIOGRAFÍA

- ALMEIDA, C., BRÁNYIK, T., MORADAS-FERREIRA, P., TEIXEIRA, J. (2003) Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **6**: 513-518.
- ANDUAGA, W., SVENSSON, I., ADLERCREUTZ, P., MATTIASSON, B. (1999) Partial purification and characterization of Acylester Hydrolase from *Lupinus mutabilis*. *JAOCS*, **76**: 1157–1162
- BARENSE, R.I., CHELLEGATTI, M.A., FONSECA, M.J., SAID, S. (2001) Partial purification and characterization of exopolygalacturonase II and III of *Penicillium frequentans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **32**: 327-330
- BOLAND, M.J., HESSELINK, P.G.M., PAPAMICHAEL, N., HUSTEDT, H. (1991) Extractive purification of enzymes from animal tissue using aqueous two-phase systems: pilot scale studies. *Journal of Biotechnology*, **19**: 19.
- BRADFORD, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- CABANNE, C., DONECHE, B. (2002) Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea*. Effect of calcium ions on polygalacturonase activity. *Microbiol Res.*, **157**: 183-189
- CARRERA, J. (2003) Producción y aplicación de enzimas industriales. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, **1**: 10-15.
- CASTILHO, L., MEDRONHOB, R., ALVES, T. (2000) Production and extraction of pectinasas obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *A. niger*. *Bioresource Technology*, **71**: 45-50.
- CELESTINO, M., DE FREITAS, M., MEDRANO, J., VALLE DE SOUSA M. (2006) Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. *Journal of Biotechnology*, **123**: 33–42
- DE GREGORIO, A., MANDALARI, G., ARENA, N., NUCITA, F., TRIPODO, M.M., LO CURTO, R.B. (2002) SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresource Technology*, **83**: 89-94.

- DE LOURDES M., POLIZELI, T.M., TEREZI, H.F. (1991) Pectinase production by *Neurospora crassa*: Purification and biomedical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *Genetical Microbiology*, **137**: 1815-1823
- DEBING, J., PEIJUN, L., STAGNITTI, F., XIANZHE, X., LI, L. (2006) Pectinase production by solid fermentation from *A. niger* by a new prescription experiment. *Ecotoxicology and Environmental*. **64**: 244-250.
- DEMIR, N., ACAR, J., MUTULU, M. (2001) The use of commercial pectinase in the fruit juice industry, part 2: Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase. *Journal of Food Engineering*, **47**: 271-274.
- DEVI, N.A., APPURAO, A.G. (1996) Fractionation, purification and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. *Enzym Microb. Technol.*, **18**: 59-65
- DOGAN, N., TARI, C. (2008) Characterization of three-phase partitioned exopolygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. *Biochemical Engineering Journal*, **39**: 43-50.
- FANG, H., CHANG, S., LAN, C., FANG, T. (2008) Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus carneus* M34 and its potential use in photoprotectant preparation. *Process Biochemistry*, **43**: 49-55.
- FIELDING, A.H., BYRDE, J.W. (1969) The Partial Purification and Properties of Endopolygalacturonase and  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase secreted by *Sclerotinia fructigena*. *Journal of General Microbiology*, **58**: 73-84
- FORCINITI, D. (2000) Preparation of Aqueous Two-Phase Systems. *Methods in Biotechnology*, Vol. 11: Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- GAINVORS, A., NEDJAOUM, N., GOGNIES, S., MUZART, M., NEDJMA, M., BELARBI, A. (2000) Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1 1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett*, **183**: 131-135
- GARCÍA, A., RAMÍREZ Y. (2008) Evaluación de la producción de pectinasas a partir de *A. niger*. Tesis de pregrado. Universidad EAFIT, Departamento de Ingeniería de Procesos, Área de Biotecnología. Medellín.
- GUSTAFSON, M.E., CLAYTON, R.A., LAVRIK P.B., JOHNSON G.V., LEIMGRUBER R.M., SIMS S.R., BARTNICKI, D.E. (1997) Large-scale production and characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* insecticidal protein from *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **47**: 255-261

- HADJ-TAIEB, N., AYADI, M., TRIGUI, S., BOUABDALLAH, F., GARGOURI, A. (2002) Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*. *Enzyme and Microbial Technology*, **30**: 662-666.
- HARRIS, E. L. V., ANGAL, S. (1995) Protein purification methods. A practical approach. 6<sup>th</sup> edition, Oxford University Press, New York, p. 151-156.
- HARRISON, R., TODD, P., RUDGE, S., PETRIDES, D. (2003) Bioseparations Science and Engineering. Oxford University Press, New York, p. 243-265.
- HUSTEDT, H., KRONER, K.H., PAPAMICHAEL, N. (1988) Continuous cross-current aqueous two-phase extraction of enzymes from biomass. *Process Biochemistry*, **23** (5): 129-137.
- JACOB, N., POORNA, A., PREMA, P. (2008) Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresource Technology*, **99**: 6697–6701.
- JAOUEN, P., BERTRAND L., ROSSIGNOL, N., ROYER, R., QUÉMÉNEUR, F. (1999) Clarification and concentration with membrane technology of a phycocyanin solution extracted from *Spirulina platensis*. *Biotechnology Techniques*, **13**: 877-881.
- KASHYAP, D.R., VOHRA, P.K., CHOPRA, S., TEWARI, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, **77**: 215-227.
- KESTER, H.C., VISSER, J. (1990) Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **12**: 150-160.
- KRUGER, N. (2002) The Bradford Method for Protein Quantitation. The Protein Protocols Handbook. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- KULA, M.R., KRONER, K.H., HUSTEDT, H., GRANDA, S., STACH, W. (1984) German Patent. **4**: 144.
- KULA, M.R., KRONER, K.H., HUSTEDT, H. (1982) Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *Advance Biochemical Engineering*, **24**: 73
- KULA, M.R. (1990) Trends and feature prospects of aqueous two-phase extraction. *Bioseparations*, **1**: 181.
- LEE, J. M. (1992). Biochemical Engineering. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, p. 320
- LEE, W., YUSOF, S., HAMID, N., BAHARIN, B. (2006) Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Engineering*, **73**: 55-63.



- LIENQUEO, M., ASENJO, J. (2000) Use of expert systems for the synthesis of downstream protein processes. *Computers and Chemical Engineering*, **24**: 2339–2350.
- LIMA, A., ALEGRE, R., MEIRELLES, A. (2002) Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*, **50**: 63-68.
- MARTINS E.S., SILVA, D., LEITE, R.S., GOMES, E. (2007) Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **91**: 291-299.
- MILLER, G. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, **31**: 426-428.
- MOHAMED S.A., FARID N.M., HOSSINY, E.N., BASSUINY, R.L. (2006) Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. *J. Biotechnol.*, **127**: 54-64
- NINAWA, S., KAPOOR, M., KUHAD, R. (2008) Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology*, **99**: 1252–1258.
- NITURE, S. (2008) Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia*, **63**: 1-19.
- NITURE, S. K., PANT, A. (2004) Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Process Biochemistry*, **159**: 305-314.
- PEREIRA, M., WU, Y., VENANCIO, A., TEIXEIRA, J. (2003) Aqueous two-phase extraction using thermoseparating polymer: a new system for the separation of endopolygalacturonase. *Biochemical Engineering Journal*, **15**: 131-138.
- PILNIK, W., VORAGEN, A.G.J. (1993) Pectic enzymes in fruit juice and vegetable juice manufacture. *Food and Science Technology*, **17**: 363-399.
- POLIZELI, M., JORGE, J., TERENCEZI, H. (1991) Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *J. Gen. Microbiol.*, **137**: 1815-1823
- PRESEY, R., AVANTS, J.K. (1993) Separation and Characterization of Endopolygalacturonase and Exopolygalacturonase from Peaches. *Plant Physiol.*, **52**: 252-256
- RAO, M. N., KEMBHAVI, A. A., PANT, A. (1996) Implication of tryptophan and histidine in the active site of endo-polygalacturonase from *Aspergillus ustus*: elucidation of the reaction mechanism. *Biochim. Biophys.*, **1296**: 167-173.

- SAKAMOTO T., BONNIN E., QUEMENER B., THIBAUT, J.F. (2002) Purification and characterisation of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. *Biochim. Biophys. Acta*, **1572**: 10-18.
- SCHNITZHOFFER, W., WEBER, H., VRSANSKÁ, M., BIELY, P., CAVACO, A., GUEBITZ, G. (2007). Purification and mechanistic characterisation of two polygalacturonases from *Sclerotium rolfsii*. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**: 1739–1747
- SCHRATTER, P. (1996) Purification and Concentration by Ultrafiltration. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 59: Protein Purification Protocols. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, p. 115-134
- SILVA, D., SILVA, E., RIBEIRO, R., DA SILVA, R., FERREIRA, V., GOMES, E. (2007) Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **42**: 1237–1243
- SINGH, A. S., RAMAKRISHNA, M., RAO, A. (1999) Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. *Process Biochemistry*, **35**: 411-417.
- SZLAG, D.C., GULIANO, K.A. (1988) A low cost aqueous two-phase system for enzyme extraction. *Biotechnology Techniques*, **2**: 227-235.
- TANUJA, S., SRINIVAS, N.D., GOWTHAMAN, M.K., ROGHAVARAO, K.S.M.S. (2000) Aqueous two-phase extraction coupled with ultrafiltration for purification of amyloglucosidase. *Bioprocess Engineering*, **23**: 63-68.
- WAKSMAN, G., KEON, J.P.R., TURNER, G. (1991) Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**: 43-48
- WEATHERLEY, L. R. (1994) *Engineering Processes for Bioseparations*. Butterworth-Heinemann, Oxford, p. 73-90; 202-216.
- ZAMAN, F., KUSNADI, A., GLATZ, C. (1999) Strategies for recombinant protein recovery from canolaby precipitation. *Biotechnol. Prog*, **15**: 488-492

## CIBERGRAFÍA

ALADI. 50 Principales productos de importación de Colombia. 2001.

En: [www.economia-montevideo.gob.mx/Oferta\\_Exportable/colombia.pdf](http://www.economia-montevideo.gob.mx/Oferta_Exportable/colombia.pdf). (Marzo, 2009).

Banco de Datos de Comercio Exterior BACEX. 2008

En: [www.mincomercio.gov.co/eContent/newsdetail.asp?id=525&idcompany=1](http://www.mincomercio.gov.co/eContent/newsdetail.asp?id=525&idcompany=1). (Abril, 2009)

DE GUZMAN, D. Innovation drives growth for enzymes in food application. 2005.

En: [www.chemicalmarketreporter.com](http://www.chemicalmarketreporter.com). (Febrero, 2009).