



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

***Aplicación de pectinasas a procesos industriales que
involucran la producción frutihortícola:
PPasa-SE de Geotrichum klebahnii, PGI de Aspergillus
kawachii y PGzyme de Asperillus sojae***

Tesista: Ing. María Luisa Franchi

Director: Dr. Sebastián Fernando Cavalitto

Codirectora: Dra. Graciela Noemí Pose

Año: 2016

Universidad Nacional de la Plata

Facultad de Ciencias Exactas



**Aplicación de pectinasas a procesos industriales que
involucran la producción frutihortícola:**

**PPasa-SE de *Geotrichum klebahnii*, PGI de *Aspergillus
kawachii* y PGzyme de *Asperillus sojæ***

María Luisa Franchi

Tesis Doctoral

2016



Aplicación de pectinasas a procesos industriales que involucran la producción frutihortícola: PPasa-SE de *Geotrichum klebahnii*, PGI de *Aspergillus kawachii* y PGzyme de *Asperillus sojae*

El presente trabajo de tesis, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en la Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente Sede Alto Valle de la Universidad Nacional de Río Negro en colaboración con el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), con el financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Tesista: Ing. María Luisa Franchi

Director: Dr. Sebastián Fernando Cavalitto

Co-director: Dra. Graciela Noemí Pose

Parte de los resultados obtenidos con el presente trabajo de tesis han sido publicados en Revistas Científicas:

Internacionales:

Evaluation of enzymatic pectin extraction by a recombinant polygalacturonase (PGI) from apples and pears pomace of Argentinean production and characterization of the extracted pectin. M L Franchi; M B Marzialetti; G N Pose; S Cavalitto. Journal of Food Processing & Technology.: OMICS groups. 2014 vol.5 n°. p1 - 4. issn 2157-7110.

Nacionales:

Producción Nacional de pectinasas de origen fúngico y su aplicación al procesamiento frutihortícola. Franchi M.L., Fratebianchi de la Parra D., Pose G., Cavalitto S. SNS – SENASA. Vol 5-6: 36-42. 2014. issn 2314-2901.

Evaluación del contenido de pectina en manzanas, peras y membrillos de la producción frutícola en el Alto Valle de Río Negro. Franchi M.L., Faría C.M., Segura A., Pose G., Cavalitto S. ("La Alimentación Latinoamericana. Publitec S.A. Vol N° 305: 60-63, 2013. issn 0325-3384).

A Maxí y Amelie

Por ser los amores de mi vida

AGRADECIMIENTOS

Esta etapa de mi vida fue muy importante y con muchos cambios, cambios de lugar de trabajo, lugar de residencia y porque además me convertí en madre... quiero agradecer a las personas que de alguna u otra manera estuvieron conmigo apoyándome.

En principio, y fundamentalmente, a Sebastián Cavalitto (Tato), mi Director, ya que sin él nada de esto hubiera sido posible. Por su apoyo incondicional, por tener siempre una palabra de aliento que aclaraba todos los posibles problemas que iban surgiendo, por tranquilizarme, por aceptarme y acompañarme siempre, por brindarme tantas oportunidades y conocimientos...GRACIAS.

A Graciela Pose, mi Co-Directora, y a Juan Segura, por haber pensado en mi para formar parte de este laboratorio y de esta subsele de la UNRN en Villa Regina. Por darme este espacio para crecer profesionalmente, por enseñarme tantas cosas y por estar en cada momento de esta etapa, en lo profesional como en lo personal.

A Claudio Voget del CINDEFI por haberme ayudado en los comienzos de este trabajo, muchas gracias.

A los chicos del laboratorio de Villa Regina. A Eli, Majo, Mónica, Carmen y Carlos, por su apoyo y compañía, porque fuimos aprendiendo juntos y porque nos damos fuerzas todos los días para seguir y por divertirnos cuando nos relajamos...A Caro mi amiga del alma de este lugar al que vine a parar, por escucharme taaaannntaaasss veces, sin su apoyo no hubiera podido llegar al final, pero tampoco hubiera sido posible sin Belén y Marga, mis becarias, mis amigas, mis compañeras...por bancarme y aprender conmigo. A Kevin. Más lejanamente a Macerla y a Juampi, por haberse embarcado en esta idea e incentivar a embarcarme también...

A los chicos del CINDEFI, Lore, Juliana x 2, Mariana, Cristian, Ana y especialmente Ivana...por recibirme, por hacerme un lugar, por brindarme sus conocimientos cada vez que iba, por incluirme, muchas gracias.

Y a muchas personas que sabiendo o sin saberlo han pasado por estos años y me han ayudado enormemente con sus investigaciones y sabidurías.

A mis amigas de toda la vida, a quienes amo profundamente...Gabi, Jose, Maga, Luli, Emi y Mavi...GRACIAS TOTALES, por apoyarme, escucharme, bancarme y especialmente por darme fuerzas en lo profesional como en lo personal...por darme tantas alegrías y por siempre querer que vuelva! Y a mi ángel de la guarda, Caro, que al compartir esta profesión me guiaste tanto, me escuchaste, me ayudaste, me aconsejaste...porque sin vos no hubiera podido.

A mis amigas de Regina, Belén, Sabri, Juli, Fer y Cande...por divertirnos, por juntarnos, por acompañarnos y aconsejarnos...a Lochi por cuidar mi más preciado tesoro y yo poder irme tranquila sabiendo que está en buenas manos!

A mis amigos de la facu, con quienes empezamos esta etapa de conocimientos y formación y quienes a pesar de estar lejos siguen presentes...por haberme dado tanta felicidad en aquellos años!

A mi familia, mis papás Cristina y Luis, mis hermanos Paula, Nina y Pancho (gracias por hacerme tía), a Adriana y a Isabel...por bancarme en TODAS, por aceptar mis decisiones, por tener que aprender a estar lejos, y en especial por estar siempre a mi lado.

A Maxi, doy gracias por haberte conocido, por compartir esta profesión, por ser mi apoyo incondicional, mi compañero en las buenas y en las malas, y por sobre todo por haberme dado lo más lindo de mi vida, nuestra hija AMELIE...quien es mi fuerza, mi pasión, mi felicidad. Los amo. Y gracias por haberme dado a mi familia política, quienes siempre nos reciben con alegría y nos hacen tan felices cada vez que estamos juntos.

Por último, quiero mencionar a mis abuelos, a los que ya no están Alfredo y Blanca, y especialmente a mi abuela María que sigue en este mundo y quien me ha enseñado las cosas importantes de la vida, quien me ha marcado para siempre...me enseñó a ser trabajadora, valiente y por sobre todo fuerte para poder sobrellevar los obstáculos que fueron surgiendo en mi vida...

Hoy es siempre todavía, toda la vida es ahora. Y ahora, es el momento de cumplir las promesas que nos hicimos, porque ayer no lo hicimos, porque mañana es tarde, AHORA.

Ismael Serrano

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
CAPÍTULO 1. Introducción General	
1.1. Pared celular vegetal	6
1.2. Pectina	8
1.2.1. Características generales	8
1.2.2. Aplicaciones industriales	11
1.3. Enzimas pécticas	13
1.3.1. Generalidades	13
1.3.2. Aplicación de las enzimas pécticas	14
1.4. Protopectinasa-SE de <i>Geotrichum klebahnii</i>	17
1.5. Poligalacturonasa ácida (PGI) de <i>Aspergillus kawachii</i>	20
1.6. PGzyme de <i>Asperillus sojæ</i>	22
1.7. Procesos de extracción de pectina	23
1.7.1. Técnicas de extracción	23
1.7.2. Extracción enzimática de pectina	25
1.8. Maceración de tejidos vegetales	26
1.9. Clarificación de bebidas	27
1.10. Objetivos	29
1.11. Plan de trabajo	30
1.12. Referencias bibliográficas	32

CAPÍTULO 2. Optimización de la producción de PGI recombinante en lote alimentado mediante diferentes perfiles de alimentación

Resumen	45
2.1 Introducción	46
2.2 Materiales y métodos	50
2.2.1 Reactivos químicos	50
2.2.2 Microorganismo y mantenimiento de la cepa	50
2.2.3 Medios de cultivo	50
2.2.4 Obtención de galactosa a partir de la hidrólisis enzimática de lactosa	52
2.2.5 Cultivos en biorreactor en sistema tipo lote alimentado	53
2.2.6 Medida de la actividad enzimática	56
2.2.7 Determinación de biomasa	57
2.2.8 Determinación de glucosa	57
2.2.9 Determinación de galactosa	58
2.3 Resultados y discusión	59
2.3.1 Obtención de galactosa a partir de la hidrólisis enzimática de lactosa	59
2.3.2 Producción de PGI recombinante en sistema de cultivo tipo lote alimentado	60
2.4 Conclusiones	74
2.5 Referencias bibliográficas	76

**CAPÍTULO 3. Extracción de pectina a partir de tejidos de manzana y pera:
Aplicación de PGI de *A. kawachii*, PPasaSE de *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojæ*.**

Resumen	82
3.1. Introducción	83
3.2. Materiales y métodos	85
3.2.1. Reactivos químicos	85
3.2.2. Fuentes de enzima	85
3.2.3 Evaluación del contenido de pectina de los frutos de producción regional y parcial caracterización de los mismos	86
3.2.3.1 Tejidos vegetales	86
3.2.3.2 Madurez de los frutos	87
3.2.3.3 Extracción fisicoquímica de pectina	87
3.2.4 Evaluación de la aplicación de PGI, PPasa-SE y PGzyme al proceso de extracción de pectina a partir de tejidos de fruta regional	88
3.2.4.1 Tejidos vegetales	88
3.2.4.2 Extracción enzimática de pectina por parte de las pectinasas en estudio	88
3.2.4.3 Extracción enzimática de pectina por parte de las pectinasas comerciales	89
3.2.4.3 Extracción fisicoquímica de pectina	89
3.2.5 Medida de la actividad enzimática	89
3.2.6 Caracterización parcial de la pectina extraída	90
3.2.6.1 Determinación de ácidos urónicos	90
3.2.6.2 Determinación del grado de esterificación (GE)	90

3.2.7 Método estadístico	90
3.3 Resultados y discusión	92
3.3.1 Evaluación del contenido de pectina de los frutos de producción regional y parcial caracterización de los mismos	92
3.3.2 Evaluación de la aplicación de PGI, PPasa-SE y PGzyme al proceso de extracción de pectina a partir de tejidos de fruta regional	99
3.4 Conclusiones	106
3.5 Referencias bibliográficas	107

CAPÍTULO 4. Maceración de tejidos de zapallo y manzana: Aplicación de PPasaSE de *G. klebahnii* Y PGzyme de *A. sojae*.

Resumen	114
4.1 Introducción	116
4.2 Materiales y métodos	118
4.2.1 Reactivos químicos	118
4.2.2 Fuentes de enzimas	118
4.2.3 Tejidos vegetales	118
4.2.4 Evaluación de la capacidad de maceración de PPasaSE de <i>G. klebahnii</i> y de PGzyme de <i>A. sojae</i> sobre tejidos de zapallo y manzana	119
4.2.4.1 Efecto de la concentración enzimática sobre el proceso de maceración	119
4.2.4.2 Comparación con la capacidad de maceración de pectinasas comerciales	120
4.2.5 Medida de la actividad enzimática	120

4.2.6 Análisis de la calidad de los productos obtenidos a partir de la maceración enzimática y mecánica	121
4.2.6.1 Maceración mecánica	121
4.2.6.2 Determinación de Ácidos urónicos	121
4.2.6.3 Evaluación de la actividad antioxidante por el método del radical ABTS ^{•+}	121
4.2.6.4 Determinación de Fenoles totales	122
4.2.6.5 Determinación de Azúcares reductores	123
4.3 Resultados y discusión	124
4.3.1 Evaluación de la capacidad de maceración de PPasaSE de <i>G. klebahnii</i> y de PGzyme de <i>A. sojae</i> sobre tejidos de zapallo y manzana	124
4.3.1.1 Efecto de la concentración enzimática sobre el proceso de maceración	125
4.3.1.2 Comparación con la capacidad de maceración de pectinasas comerciales	129
4.3.1.3 Análisis de la calidad de los productos obtenidos a partir de la maceración enzimática y mecánica	134
4.4 Conclusiones	145
4.5 Referencias bibliográficas	147

**CAPÍTULO 5. Clarificación de jugo de manzana para la elaboración de sidra:
Aplicación de PPasaSE de *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae*.**

Resumen	153
5.1 Introducción	154
5.2 Materiales y métodos	156
5.2.1 Reactivos químicos	156
5.2.2 Fuentes de enzimas	156
5.2.3 Productos a clarificar	156
5.2.4 Clarificación enzimática sobre jugo de manzana para la elaboración de sidra	156
5.2.5 Comparación con la capacidad de clarificación de pectinasas comerciales	157
5.2.6 Comparación con la clarificación mediante procesos tradicionales	157
5.2.7 Medida de la actividad enzimática	157
5.2.8 Análisis de jugos clarificados	158
5.2.8.1 Medida de la turbidez	158
5.2.8.2 Determinación de sólidos solubles (Ss)	158
5.2.8.3 Determinación de pH	158
5.2.9 Descripción del diseño estadístico Doehlert	159
5.3 Resultados y discusión	162
5.3.1 Clarificación enzimática sobre jugo de manzana para la elaboración de sidra	162
5.3.2. Comparación con la capacidad de clarificación de pectinasas comerciales y mediante procesos tradicionales	165

5.3.3. Análisis de los jugos clarificados	168
5.4 Conclusiones	170
5.5 Referencias bibliográficas	171
Conclusiones Generales	175

LISTA DE ABREVIATURAS

A₆₆₀ Absorbancia medida a 660 nm

ABTS 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio

AGA Acido galacturónico

APG Ácido poligalacturónico

BCP *Buffer* ácido cítrico (25 mM) – fosfato di-básico de Na (6.25 mM)

DO Densidad óptica

FCE Fuente de Carbono y Energía

FN Fuente de Nitrógeno

Gal Galactosa

GE Grado de esterificación

Glu Glucosa

HG Homogalacturonano

HM Pectina de alto metoxilo

HPLC High Performance Liquid Chromatography

IC₅₀ Concentración inhibitoria del 50 %

LM Pectina de bajo metoxilo

MIE Material insoluble en etanol

PeL Pectinliasa

PG Poligalacturonasa

PGasa Poligalacturonasa

PL Pectatoliasa

PME Pectinmetilesterasa

PPasa Protopectinasa

RG Ramnogalacturonano

S Sobrenadante

SC Medio definido para *Saccharomyces cerevisiae*

Ss Sólidos solubles

TEAC Actividad antioxidante en equivalentes de Trolox

TM Tejido macerado

TNM Tejido no macerado

T₄₄₀ Transmitancia medida a 440 nm

RESUMEN

En el marco del desarrollo de mi plan de tesis doctoral se ha trabajado en la producción y aplicación de pectinasas a diferentes procesos industriales que involucran la producción frutihortícola del Alto Valle de Río Negro.

En principio, se pusieron a punto los cultivos alimentados como estrategia para mejorar la producción de la poligalaturonasa PGI recombinante de *A. kawachii* clonada en *S. cerevisiae*. La condición de la alimentación en dos etapas con una inducción a 8,8 ml/h para la segunda etapa resultó ser la condición de mayor producción de enzima obteniéndose una actividad final de 77 U/ml y una productividad de 2,40 U/mlh. Además, considerando que una de las fuentes de carbono que usa el medio sintético de cultivo utilizado para expresar a PGI sufrió un fuerte incremento en el precio, la galactosa, se ha trabajado a fin de optimizar los costos de la producción de dicha enzima. Para ello se realizó en el medio de cultivo el reemplazo de galactosa comercial por galactosa obtenida a partir de la hidrólisis enzimática de lactosa. Los productos de reacción obtenidos fueron aproximadamente de un 50% de glucosa, un 45% de galactosa y un 5% de oligosacáridos (calculado por diferencia). La reacción se completó en promedio en un 96%. Al realizar el sistema de lote alimentado con el reemplazo de la galactosa obtenida mediante la hidrólisis de la lactosa, se obtuvo un óptimo crecimiento de *S. cerevisiae* y producción enzimática a un menor costo.

También se estudió la posibilidad de reutilizar los grandes volúmenes de subproductos que generan las industrias frutícolas del Alto Valle de Río Negro para una posterior extracción de pectina con el objetivo de ampliar la gama de productos de alto valor agregado a la oferta local. Considerando que si bien existían datos bibliográficos respecto del contenido de pectina de diversos frutos, pero no estudios referentes a la evaluación del contenido de pectina de los frutos de producción local, el estudio consistió inicialmente en evaluar, mediante extracción química, el contenido de pectina en distintas variedades de manzanas (Gala, Red Delicious, Granny Smith y Pink Lady), peras (Williams, Red D'anjou y Winter Bartlett) y membrillo (Smyrna) de producción en el Alto Valle de Río Negro. Los porcentajes de pectina obtenidos para estos frutos están dentro de los rangos reportados para otros cultivares en otras partes del mundo y pusieron de manifiesto que los frutos podrían ser un buen sustrato para la extracción de pectina con distintos fines. Se analizó la extracción enzimática de pectina por las enzimas de *A.*

kawachii, de *G. klebahnii* y de *A. sojae* sobre manzanas y peras regionales. Para evaluar el rendimiento del proceso, se compararon los rendimientos obtenidos con las enzimas en estudio con los obtenidos por tres pectinasas comerciales y con el obtenido por medio de la extracción química. Las enzimas estudiadas se comportaron de igual o mejor forma que las comerciales y se observó que PGI posee mejor capacidad para la extracción de pectina, extrayendo en manzanas un 25%, un 40% y un 60% más que la extracción química, PPasaSE y PGzyme, respectivamente. Y en peras extrajo un 80% más que en la extracción química y que con ambas enzimas. Por último, se caracterizó parcialmente la pectina extraída; mostrando un GE > 50% (pectinas de HM). En cuanto al contenido de ácidos urónicos (principalmente AGA) en el MIE sólo pudo determinarse en el caso de la enzima PGI resultando en aproximadamente 70 y 50% en manzanas y peras, respectivamente.

Por otra parte, se realizaron ensayos de maceración por enzimas de *G. klebahnii* y *A. sojae* sobre tejidos de zapallo y manzana de la región. En primera instancia, se evaluó el efecto de la concentración enzimática sobre el proceso, encontrándose como actividad final óptima 40 U en la mezcla de reacción tanto para PPasaSE como para PGzyme. Estas enzimas se comportaron de igual o mejor forma que las enzimas comerciales, alcanzándose con ambas un rendimiento en el proceso de ~ 35% y 20% en la fracción de tejido macerado (TM) para los zapallos y manzanas, respectivamente. Debido al creciente interés sobre los compuestos fitoquímicos, que presentan beneficios directos sobre la salud, se decidió determinar la composición y actividad antioxidante de los productos obtenidos en el TM y en el sobrenadante (S). Los resultados mostraron un mayor contenido de azúcares reductores y ácidos urónicos (sustancias pécticas) en el S en todos los casos. El TM de zapallo mostró una actividad antioxidante y un contenido en fenoles totales mayor en el S, demostrando tener una mayor proporción de células dañadas. La actividad antioxidante y el contenido en fenoles totales en las fracciones de TM y S para manzana resultaron similares. Esto indicaría que una fracción alta de células mantuvo su estructura intacta. A partir de estos resultados, puede concluirse que la manzana es mejor sustrato para utilizarlo en la maceración enzimática otorgando un producto de buena calidad nutricional. Se comprobó que las maceraciones mecánicas produjeron con ambos vegetales, productos de baja calidad nutricional, dejando en evidencia las bondades de los procesos enzimáticos.

Para el proceso de clarificación de jugo de manzana para la elaboración de sidra mediante el uso de las enzimas PPasaSE y PGzyme, se evaluaron diferentes condiciones de temperatura, concentración de enzima y tiempo mediante el diseño estadístico Doehlert. PPasaSE no presentó una buena capacidad de clarificación, por lo tanto, los cálculos se

realizaron con los resultados obtenidos por PGzyme. Las condiciones óptimas resultaron: 20 °C, Enz. 2.2 U/ml y 4.5 hs. Se realizó un análisis comparativo bajo esas condiciones de los rendimientos obtenidos con las enzimas en estudio y con los obtenidos a partir de la aplicación de las enzimas comerciales. Los resultados obtenidos para la clarificación enzimática en porcentaje de clarificación (%C) fueron 56.5 con PPasaSE, 99.4 con PGzyme, 96.5 con BA, 97.6 con J1 y 98.6 con J2. También se comparó la capacidad de clarificación de PGzyme con el proceso tradicional de clarificación de sidras que utiliza bentonita enológica como agente clarificante. Para la clarificación con bentonita el %C fue 76.1 a los 15 días y 99.6 a las 4.5 hs con Bentonita + Enzima (PGzyme). PGzyme demostró excelentes condiciones para su aplicación en procesos de clarificación de jugos, demostrando ser igual o mejor que las enzimas comerciales y mejor que los procesos tradicionales con bentonita, otorgando mejores resultados en menores tiempos. Además, se analizaron los °Brix y pHs de los jugos previamente a la clarificación y posteriormente. La medición de estos parámetros no mostró ningún cambio significativo en el jugo al aplicar el proceso.

De esta manera queda demostrado que las pectinasas de producción nacional provistas por el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Poligalacturonasa (PGI) de *A. kawachii*, PPasa-SE de *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae*, presentan un amplio potencial de aplicación a diferentes procesos industriales y de particular interés a aquellos que involucran la producción frutihortícola de la región del Alto Valle de Río Negro tales como extracción de pectina, maceración de tejidos, clarificación de jugos y sidra.

CAPITULO 1

INTRODUCCION GENERAL

1.1. Pared celular vegetal

La pared celular es una estructura compleja y dinámica que rodea las células vegetales. Su composición y propiedades son constantemente adaptadas al crecimiento, diferenciación y variaciones medioambientales (Somerville y col. 2004).

Se pueden reconocer tres capas: lamina media, pared celular primaria y pared celular secundaria. La proporción de pectina en cada capa descende en ese orden (Northcote 1986). En la pared celular secundaria la cantidad de pectina es prácticamente nula. El conocimiento de la estructura de la lamina media es aún parcial, pero se sabe que consiste principalmente de sales de pectato de calcio (Ishii 1976, Keijbets *et al.* 1976, Selvendran 1985, Selvendran y O'Neil 1987). En la Fig. 1.1 se muestra un esquema que representa células vegetales adultas y las capas de la pared celular. Se puede observar que la lámina media es el material intercelular que mantiene unidas las células formando el tejido denominado “material cementante”.

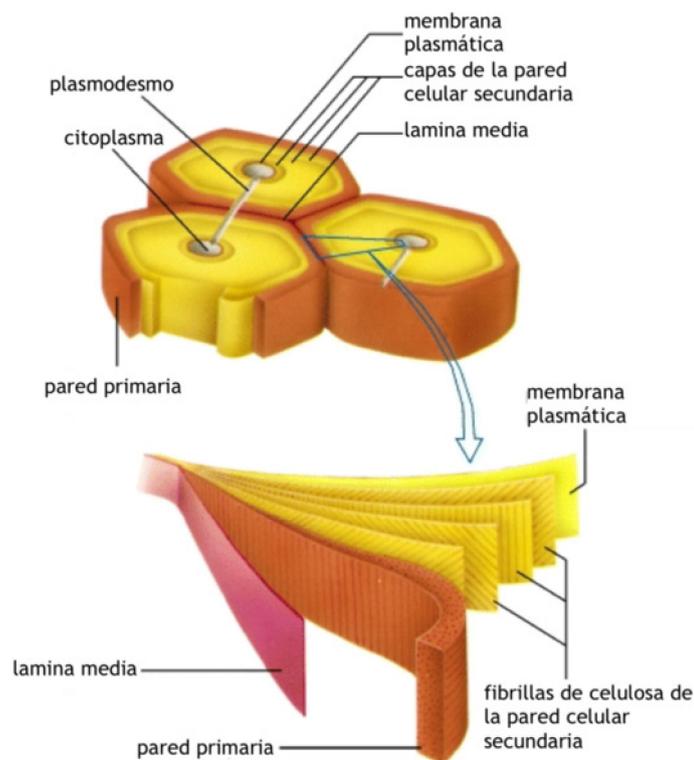


Figura 1.1. Esquema de la estructura de la pared celular de células vegetales adultas.

La pectina es uno de los polisacáridos constituyentes de la pared celular de plantas superiores. Además de pectina, la pared celular posee celulosa, xiloglucanos, xilanos, arabinoxilanos, arabinanos, arabinogalactanos, galactanos, glucanos, glicoproteínas, (galacto)-glucomananos y lignina. Estos polisacáridos, en conjunto, son los compuestos orgánicos encontrados en mayor cantidad en la naturaleza, y pueden ser clasificados dentro de tres grupos principales: celulosa, hemicelulosa y pectina (Aspinall 1980, McNeil *et al.* 1984).

La celulosa constituye cuantitativamente la mayor fracción en la pared celular, y consta de cadenas lineales (no ramificadas) de glucosa, con uniones β -1,4. Las cadenas de celulosa están ordenadas en fibras y son las responsables de mantener la rigidez estructural de la pared celular.

La hemicelulosa es un grupo más heterogéneo de polisacáridos y es el segundo en cantidad. Los componentes principales de la hemicelulosa varían dependiendo del tipo de vegetal al que pertenezcan (Timell 1967, Wilkie y Woo 1977).

El tercer grupo de polisacáridos de la pared celular está constituido por las sustancias pécticas, las cuales están formadas por un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (AGA) unidos en enlaces α -1,4. Esta cadena de ácido poligalacturónico (APG) está interrumpida por residuos de ramnosa unidos por enlaces α -1,2. Estos residuos de ramnosa suelen tener unidas largas cadenas laterales de azúcares neutros. En algunas pectinas (provenientes de remolacha y manzana) las cadenas laterales suelen terminar en ácido ferúlico (Aspinall 1980, Van Buren 1991, Sakai *et al.* 1993).

Los polisacáridos constituyentes de las paredes celulares vegetales determinan gran parte de los atributos de calidad de frutas y vegetales frescos, como así también su comportamiento durante el proceso de manufactura de alimentos. Constituyen además una fuente renovable de energía ya que pueden ser convertidos por vía microbiana en compuestos valiosos como etanol. Los residuos vegetales tal cual o algunos polisacáridos extraídos de ellos como la pectina, son utilizados en diversos procesos industriales, cumpliendo funciones como material de relleno, por ejemplo, en la elaboración de textiles, fibra dietética, piensos y papel o bien como aditivo en la elaboración de alimentos, pinturas, cosméticos y productos farmacéuticos. Tales aplicaciones dependen de las propiedades físico-químicas y biológicas de los polisacáridos (Voragen *et al.* 2001).

1.2. Pectina

1.2.1. Características generales

Entre los principales constituyentes de la pared celular de las plantas se encuentran las sustancias pécticas, una mezcla de polímeros ácidos y neutros altamente ramificados, denominadas genéricamente pectinas. Estas constituyen aproximadamente el 30% del peso seco de la pared celular primaria de células vegetales o el 0,5-4,0% del peso fresco de material vegetal (De Vries *et al.* 1982, Kashyap *et al.* 2001, Sakai *et al.* 1993). En la Tabla 1.1. se observa la composición de pectina en diferentes frutas y vegetales.

Tabla 1.1. Composición de pectina en diferentes frutas y vegetales (Ranveer *et al.* 2005).

Fruta/ Vegetal	Tejido	% Sustancias Pécticas
Manzanas	Fresco	0.5–1.6
Bananas	Fresco	0.7–1.2
Duraznos	Fresco	0.1–0.9
Frutillas	Fresco	0.6–0.7
Cerezas	Fresco	0.2–0.5
Peras	Fresco	0.9–1.4
Zanahorias	Materia seca	6.9–18.6
Pulpa de naranjas	Materia seca	12.4–28.0
Papas	Materia seca	1.8–3.3
Tomates	Materia seca	2.4–4.6
Pulpa de remolacha azucarera	Materia seca	10.0–30.0

Las pectinas son heteropolisacáridos complejos que contienen dos regiones bien definidas (De Vries *et al.* 1982). La primera es la región denominada “lisa” o también homogalacturonano (HG) que está compuesta principalmente por los esqueletos de restos de AGA unidos mediante enlaces glucosídicos α -1,4 (Yapo *et al.* 2007). Los grupos carboxilos del AGA pueden estar parcialmente esterificados con metanol, y parcial o completamente

neutralizados por una ó más bases. La Fig. 1.2 muestra una porción de la región del esqueleto del HG.

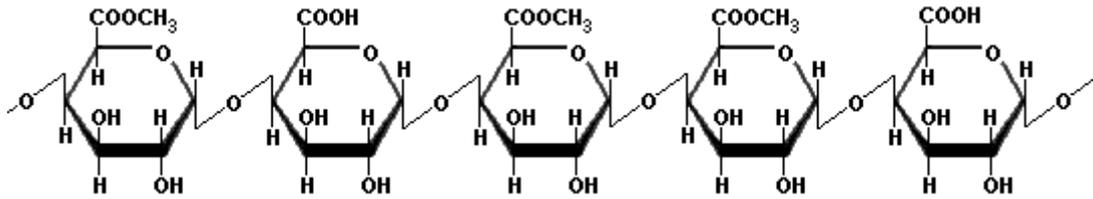


Figura 1.2. Estructura normal del homogalacturonano encontrado en las regiones lisas de la pectina. El número de restos metilados y/o acetilados depende de la fuente de la cual se obtuvo la pectina.

Existen numerosas maneras de clasificar a las sustancias pécticas. De acuerdo a la American Chemical Society (EE.UU.) la denominación general de las sustancias pécticas abarca a los ésteres de metoxilos (la pectina), las cadenas no metoxiladas (los ácidos pécticos) y las sales (los pectatos), junto con ciertos polisacáridos neutros (arabinanos, arabinogalactanos y galactanos) que no poseen el esqueleto de poligalacturonano pero que están normalmente asociados a la pectina. Otro término definido dentro de las sustancias pécticas es el de la protopectina, una sustancia péctica insoluble en agua que está presente en tejidos vegetales, la cual origina pectina o pectatos solubles y que puede ser obtenida mediante depolimerización controlada (Jayani *et al.* 2005).

La esterificación con metanol es una característica muy importante que modifica las propiedades estructurales y funcionales de la pectina. El porcentaje de restos de AGA esterificados varía enormemente dependiendo de la fuente de la cual se haya extraído, e incluso dentro del mismo tejido vegetal (Iglesias y Lozano 2004).

Como parámetro de la cantidad de grupos esterificados con metanol se usan alternativamente dos criterios distintos, a saber: el grado de esterificación (GE) y el contenido de metoxilos. El GE se define como la cantidad de grupos carboxilos pertenecientes a los restos de AGA esterificados, en relación a su número total. El contenido de metoxilos se calcula relacionando la masa total de grupos metoxilos con la masa total de restos de AGA (esterificados o no). Un GE de 100 % (todos los grupos carboxilos neutralizados con metanol) corresponde a un contenido de metoxilo de 16,32 % (Taylor 1991). En relación a esta propiedad se diferencian dos categorías de pectinas: las que poseen un contenido de metoxilos mayor del 8 % (GE > 50 %) son denominadas

pectina de alto metoxilo (HM), y las que presentan un contenido de metoxilos menor que 8 % ($GE < 50\%$), son llamadas pectinas de bajo metoxilo (LM) (Sakai *et al.* 1993). Las pectinas HM sólo gelifican en presencia de concentraciones relativamente altas de azúcar y en medio ácido. Por el contrario, las pectinas LM la gelificación se produce en ausencia de azúcar, pero en presencia de concentraciones de iones, particularmente divalentes (por ejemplo, Ca^{+2}).

Una segunda región definida dentro de la estructura de la pectina es la región “pilosa”, también denominada ramnogalacturonano (RG), dentro de la cual a su vez pueden distinguirse dos tipos de estructuras diferentes.

a) El RG tipo I es una región que se caracteriza por la presencia de dímeros de AGA unidos entre sí por enlaces α -1,4, en unión α -1,2 con L-ramnosa (forma piranósica) (Aspinall 1980, McNeil *et al.* 1984). Entre el 20-80% de estos residuos de ramnosa pueden estar unidos a cadenas de D-galactosa unidas por enlaces β -1,4, o cadenas de L-arabinosa, unidas por enlaces α -1,5 (Pérez-Martínez *et al.* 2013, Voragen *et al.* 2009, Izydorczyk *et al.* 2005). A partir de estos azúcares pueden originarse otras ramificaciones del mismo tipo, o en ocasiones formadas por otros azúcares como D-xilosa, D-glucosa, D-manosa, L-fucosa y ácido D-glucurónico, dependiendo del vegetal de origen de la pectina. Estas ramificaciones representan un 20-40 % de la cadena total (Darvill *et al.* 1978, Darvill *et al.* 1980, McNeil *et al.* 1984).

b) El RG tipo II lo conforman cadenas laterales de diferentes azúcares unidos directamente a los residuos de AGA (Aspinall 1980, McNeil *et al.* 1984). El RG tipo II puede ser considerado incluso como una modificación estructural del HG y normalmente está en una posición adyacente al RG tipo I.

Típicamente, el porcentaje de HG es de aproximadamente 65%; RG-I es de 20-35% y el resto es RG-II (Mohnen 2008). En la Fig. 1.3 se muestra la estructura esquemática de la pectina, y se identifican claramente las regiones principales que la conforman.

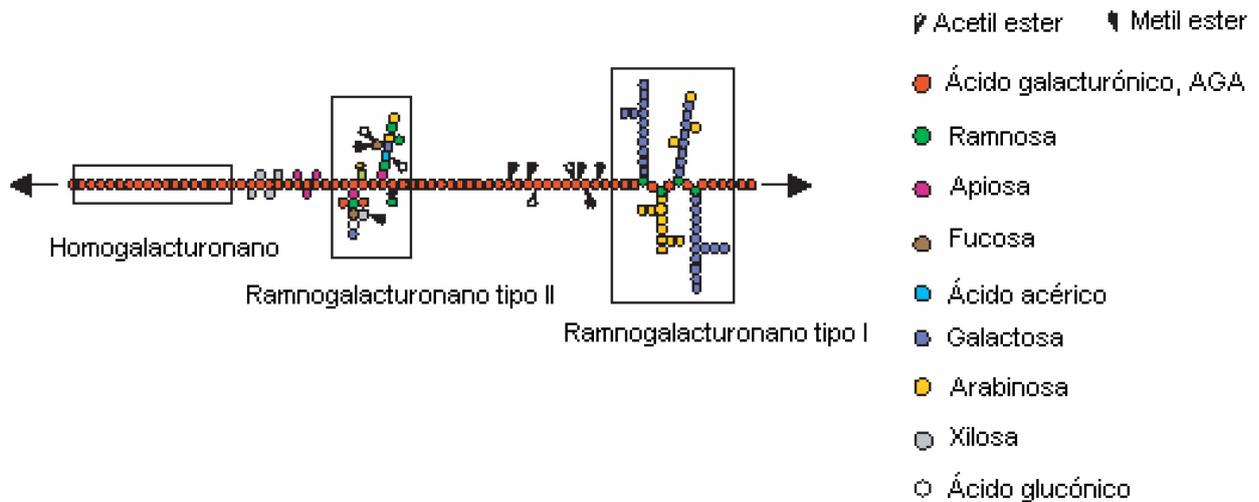


Figura 1.3. Estructura esquemática de la pectina (Willats *et al.* 2006).

1.2.2. Aplicaciones industriales

Las sustancias pécticas presentan un variado campo de aplicación en la industria. Tienen como principal propiedad la de absorber una gran cantidad de agua (Nwanekezi y Alawuba 1994, Srinrangarajan and Shikhand 1979), por lo tanto, se la utiliza para estabilizar y modificar la textura (aumento de viscosidad, gelificación, etc.) de los alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos (Ridley *et al.* 2001, Rolin 1993). La pectina también se ha utilizado en el desarrollo de películas biodegradables, espumas, plastificantes, adhesivos, y en los sistemas de administración de fármacos (Mohnen 2008).

En particular, en la industria alimentaria se la utiliza como agente gelificante, aunque en la actualidad también es considerada una fuente importante de fibra nutricional (Alkorta *et al.* 1998, Jayani *et al.* 2005, Baig and Cerda 1980). El gel de pectina se forma cuando las porciones de HG están unidas y entrecruzadas formando una red cristalina tridimensional en donde el agua y los solutos quedan atrapados. Son varios los factores que determinan las propiedades de los geles de pectina formados, entre los que se incluyen el tipo y el grado de esterificación con metanol y de acetilación de la pectina, el pH y la temperatura del medio, presencia, tipo y concentración de azúcares y otros solutos y, finalmente, la presencia de iones divalentes, particularmente, de Ca^{+2} (Willats *et al.* 2006). El peso molecular es también un factor importante en la funcionalidad de la pectina. La

capacidad para aumentar la viscosidad de una solución y la resistencia del gel tienden a aumentar a medida que la pectina aumenta el peso molecular (Brenjholt 2010). Se han hecho muchos estudios con el propósito de mejorar la propiedad de gelificación de las pectinas y de esta forma aumentar sus posibilidades de aplicación (Bernhard Wehr *et al.* 2004). Alrededor del 80 % de la producción mundial de pectina altamente metoxilada (HM) es utilizada en la manufactura de mermeladas y jaleas, con el fin de corregir la deficiencia natural de pectina de algunas frutas (Sakai 1992, Sakai *et al.* 1993, Voragen *et al.* 1995, Alkorta *et al.* 1998, Willats *et al.* 2006). Además, por su gran capacidad de estabilizar emulsiones, suspensiones y espumas, la pectina resulta ser de gran utilidad en la producción de bebidas frutales concentradas (Sakai *et al.* 1993).

En el sector farmacéutico, se utiliza la pectina debido a la capacidad que presenta para aumentar la viscosidad y estabilizar diversas emulsiones y suspensiones. Se la utiliza como ingrediente en preparaciones de fármacos como antidiarreicos, desintoxicantes, entre otros. Además, reduce la intolerancia a la glucosa en pacientes diabéticos e incluso baja el nivel de colesterol sanguíneo y de la fracción lipoproteica de baja densidad (Guzmán 1990). Es importante por su acción detoxificante en metales, la cual probablemente pueda ser atribuida a su capacidad como agente quelante. También puede ser utilizado como transportador de fármacos, disminuyendo así la toxicidad de los mismos y prolongando su actividad debido a una liberación prolongada sin la disminución de su efecto terapéutico (Sakai *et al.* 1993, Rolin *et al.* 1998, Wicker *et al.* 2014). Se han desarrollado microglóbulos de pectina con potencial uso en quimioterapia de algunos tipos de cáncer, como sistema biodegradable de liberación intravascular de drogas (Coffin y Fishman 1994). Por otra parte, la pectina, como toda fibra nutricional, no puede ser digerida en el tracto gastrointestinal; sin embargo, se ha comprobado que puede ser degradada y fermentada por microbiota colónica, lo que ayuda a reducir el riesgo de cáncer de colon (Wicker *et al.* 2014).

En cuanto a cosmética, la pectina se utiliza debido a su propiedad de gelificar. A partir de estos geles se elaboran productos comerciales, como por ejemplo cremas y emulsiones para cabellos (Sakai y Okushima 1978).

Las principales fuentes de pectinas son las cáscaras de frutos cítricos y el orujo de manzana, conteniendo cerca de 25% y de 15 a 18% de sustancias pécticas respectivamente. Sin embargo, la creciente demanda de este tipo de compuesto ha llevado a explorar nuevas fuentes de pectina, como la remolacha azucarera, las cáscaras de mango, y las cabezas de girasol (Voragen *et al.* 2009, Willats *et al.* 2006, Haddad y Millán *et al.* 1975).

1.3. Enzimas pécticas

1.3.1. Generalidades

Debido a la gran complejidad química de la pectina y a su abundancia en la naturaleza, los microorganismos poseen una gran variedad de enzimas capaces de degradarla de alguna forma a fin de metabolizarla. Estas enzimas pectolíticas o pécticas, son llamadas comúnmente pectinasas, constituyen un complejo sistema que incluye hidrolasas, liasas y oxidasas, que intervienen en la degradación o modificación de la pectina. Se encuentran en la mayoría de las plantas superiores y son producidas también por hongos filamentosos (McFeeters *et al.* 1992), bacterias (Collmer y Keen 1986, Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 1996) y algunas levaduras (Biely y Kremnicky 1998) e insectos (Pilnik y Voragen 1970). En general, estas enzimas son de tipo inducible y su síntesis responde a la presencia extracelular del sustrato. La degradación enzimática total de la pectina origina primordialmente AGA y ramnosa, junto a cantidades menores de galactosa, arabinosa, metanol, acetatos y trazas de otros azúcares tales como xilosa, fucosa, apiosa, etc. Estos productos de degradación pueden ser metabolizados durante el crecimiento microbiano dependiendo del microorganismo en cuestión.

No existe un único criterio para clasificar a las enzimas que actúan sobre la pectina. Una posibilidad es diferenciarlas según el tipo de acción catalítica que realizan sobre la misma. De esta forma pueden encontrarse dos grandes grupos: a) las enzimas desesterificantes y b) las enzimas depolimerizantes. Las enzimas desesterificantes, a su vez, pueden ser clasificadas según la naturaleza del grupo éster que hidrolicen (metil, acetyl, o feruloil). Las enzimas depolimerizantes, poseen una amplia gama de acción, pueden atacar preferentemente a las zonas lisas (HG) o a las pilosas (RG) y pueden ser divididas según al menos tres criterios: 1) El tipo de sustrato que prefieran; protopectina, pectina, ácidos pécticos u oligo-D-galacturonanos, 2) Tipo de reacción, bien sea por hidrólisis o por transeliminación (β -eliminación), y 3) El sitio de corte, aleatoriamente dentro de la cadena (tipo endo) o desde el extremo de la misma (tipo exo) (Jayani *et al.* 2005).

1.3.2. Aplicación de las enzimas pécticas

La Ingeniería Genética ha provocado una revolución en las industrias relacionadas con procesos microbiológicos, debido a la posibilidad de clonar y expresar en forma heteróloga los genes de estas enzimas consiguiendo cantidades y purzas imposibles de alcanzar por métodos convencionales. Esto ha permitido diseñar mezclas de enzimas óptimas para cada uno de los procesos en los que se vea involucrado su uso (Cavalitto *et al.* 2000).

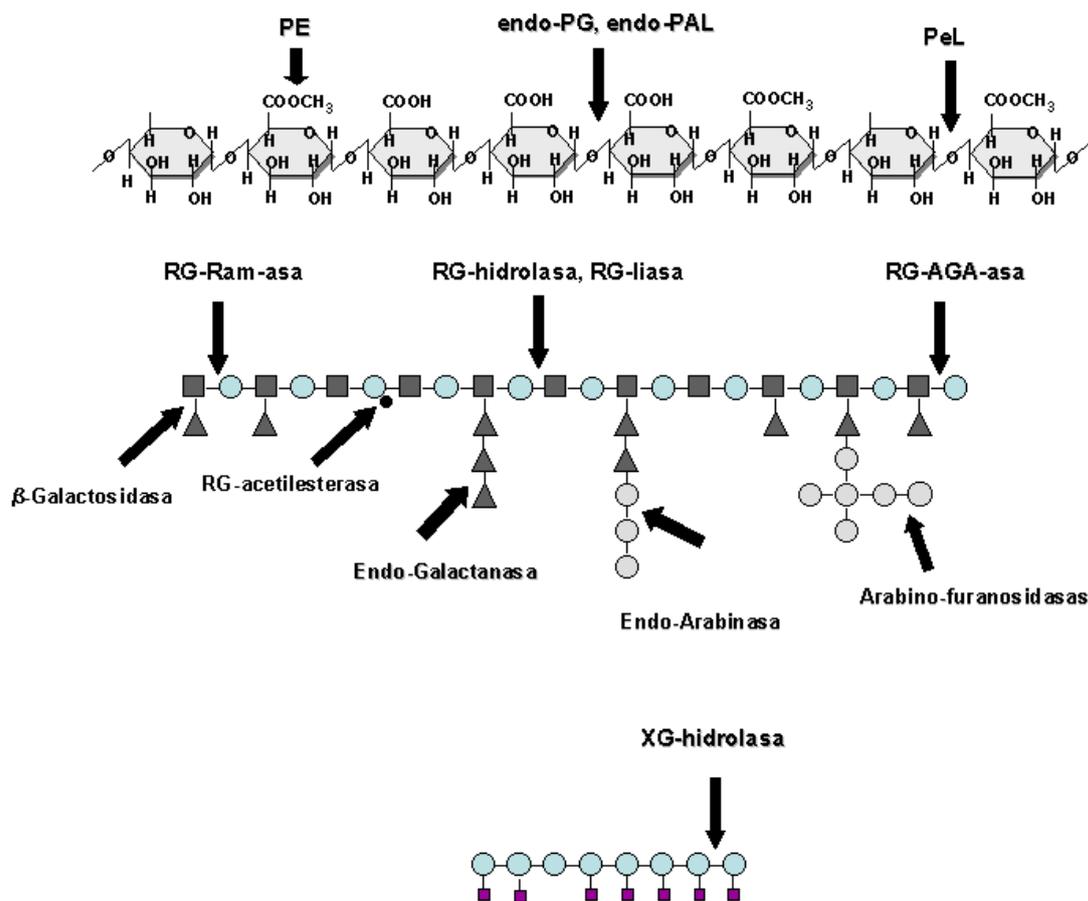


Figura 1.4. Degradación de fragmentos de sustancias pécticas y sitio de ataque de enzimas pectolíticas (Voragen *et al.* 2001).

Las enzimas pécticas han sido utilizadas en diversas industrias desde hace más de medio siglo. La industria que más se ha beneficiado de ellas es la industria alimentaria (extracción de aceites, procesamiento de café y de té, etc.) aunque también han sido utilizadas como auxiliares tecnológicos para el desgomado y biorefinado (bioscoursing) de

fibras textiles, producción de papel, tratamiento de madera, alimentación animal, producción de detergentes, tratamiento de aguas residuales, entre otras (Shivakumar y Nand 1995, Hoondal *et al.* 2002, Rättö y Viikari 1996, Soresen *et al.* 2000, Sarioglu *et al.* 2001, Jayani *et al.* 2005). Son también empleadas como herramientas analíticas en fitoquímica, en particular en estudios sobre la estructura de la pared celular vegetal, química de polisacáridos, y para la producción de oligosacáridos y polisacáridos con propiedades farmacológicas (McCleary 1986, Yamada 1994).

En cuanto a la industria alimentaria, la mayor aplicación de las pectinasas se encuentra en la industria procesadora de jugos de frutas. Juegan un papel crucial en la clarificación (Kobayashi *et al.* 2001), en la extracción para aumentar el rendimiento y en la reducción de la viscosidad del jugo (Sánchez y Demain 2002). Con la ayuda de otro tipo de enzimas como por ejemplo las amilasas, contribuyen a optimizar los procesos de filtración y clarificación (Pilnik & Rombouts 1979, Kashyap *et al.* 2001, Da Silva *et al.* 2005, Jayani *et al.* 2005, Landbo *et al.* 2007). Los jugos que habitualmente se someten al proceso de clarificación son aquellos cuyas características organolépticas y su aceptación por el público mejoran por el hecho de ser transparentes. Tal es el caso, por ejemplo, del jugo de manzana, de pera y el de uva. Contrariamente, en los jugos cítricos, el proceso de clarificación ocurre espontáneamente ya que la pectina que se solubiliza durante la extracción del jugo, es deseterificada por las pectin metil esterases propias del fruto. Los grupos carboxilos liberados por la enzima reaccionan con iones divalentes y precipitan. Este proceso le da al jugo mal aspecto por lo que se le agregan pectato liasas o pectin liasas que rompen parcialmente las cadenas de pectina evitando que precipiten.

A través de la acción combinada de pectinasas y celulasas se puede lograr la degradación completa de la pared celular dando lugar a la lisis y la consiguiente liberación del jugo celular. Este proceso conocido como licuefacción se aplicó a la producción de jugos de frutas difíciles de filtrar como mango, banana o guayaba. Este proceso presenta una restricción importante, el uso de celulasas purificadas en la elaboración de alimentos no es aceptado por las agencias regulatorias. Un proceso alternativo muy difundido es el llamado licuefacción del orujo (pomace liquefaction), que involucra el prensado de la pulpa y la obtención de jugo y el respectivo orujo. Luego el orujo se diluye en agua, se licuefacta y se vuelve a filtrar obteniéndose un segundo jugo. Esta alternativa es corrientemente empleada en la elaboración de jugos de manzana y ananá (Contreras Esquivel 2003).

La acción de las PPasas sobre protopectina permite también su aplicación para la extracción de pectina (Contreras Esquivel *et al.* 1997, Zapata Zapata *et al.* 2008) y la maceración de tejidos vegetales (Nakamura *et al.* 1995, Zapata Zapata *et al.* 2007). En este último caso, la gran ventaja de este proceso enzimático es que el alimento conserva una gran proporción de células intactas con su contenido intracelular de pigmentos y vitaminas, ya que en su mayor parte no salen de las células evitando ser degradados en el ambiente.

Otra aplicación es el llamado enzimado de pulpa (pulp enzyming). En este caso, las pectinasas se adicionan a la masa prensada de frutas, las que generalmente contienen mucha pectina, por ejemplo: frutillas, cerezas, grosellas, frambuesas e incluso manzanas y uvas. Las pectinasas degradan la pectina que causa la gelificación de la pulpa, facilitando el proceso de filtración. Este proceso se ha aplicado también para aumentar el rendimiento del prensado en la producción de aceites de oliva, palma y coco (Contreras Esquivel 2003).

En la Tabla 1.2. se detallan algunas de las pectinasas comerciales que se encuentran en el mercado.

Tabla 1.2. Pectinasas comerciales (Modificado de Soriano Lasheras 2004).

Distribuidor	Localización	Nombre
C. H. Boehringer Sohn	Ingelheim, Alemania	Panzym
A. G. Ciba-Geigy	Bazel, Suiza	Ultrazyme
Grinsteelvaeket	Aarhus, Dinamarca	Pectolase
Kikkoman Shoyu, Co.	Tokio, Japón	Sclase
A. G. Schweizerische Ferment	Suiza	Pectinex
Societe Prapidase S.A.	Seclin, Francia	Rapidase, Clarizyme
Wallerstein, Co	Des Plaines, USA	Klerzyme
Novo Nordisk	Dinamarca	Flaxzyme
GmbH. Rohm	Darmstadt, Alemania	Pectinol, Rohament
Lyven	Colombelles, Francia	Polygalacturonase

1.4. Protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii*

Sakai *y col.*, en la Universidad Prefectural de Osaka (Japón), iniciaron la búsqueda de microorganismos productores de protopectinasas con el fin de poder utilizar dichas enzimas en la extracción enzimática de pectina (Sakai y Okushima 1978). El término protopectinasa (PPasa) se aplica a las enzimas que hidrolizan o disuelven protopectina liberando así pectina soluble, y ocasionando de forma paralela la separación de las células vegetales. Este tipo de enzimas son catalogadas como un grupo heterogéneo de enzimas que poseen diferentes actividades catalíticas, liasas e hidrolasas, todas con actividad tipo endo. La primera PPasa fue aislada a partir del hongo levaduriforme *Trichosporon penicillatum* SNO-3, el cual posteriormente fue reclasificado como *Geotrichum klebahnii* ATCC 42397. Los miembros de este género son hongos levaduriformes caracterizados por hifas estrechas con ramificaciones escasas y cortas. La Fig. 1.5. muestra una microfotografía donde se aprecia la morfología característica del *G. klebahnii* creciendo en medio líquido.

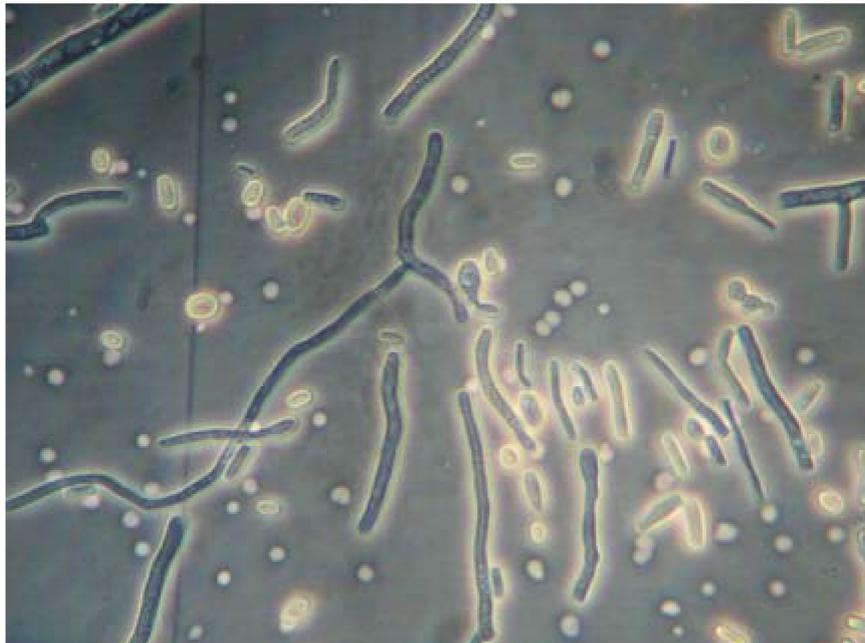


Figura 1.5. Microfotografía de *Geotrichum klebahnii* (400×) (Zapata Zapata 2008)

Este microorganismo presenta un crecimiento rápido en medio YPD sólido, con la formación de colonias blancas, secas, con aspecto algodonoso. En medios ricos, al final de la fase de crecimiento, genera un fuerte aroma a fruta (Sutton *et al.* 1988, Larone 1995).

Geotrichum klebahnii posee un pool pobre de enzimas hidrolíticas extracelulares. Sólo se ha reportado y caracterizado la presencia de PPasa-SE (Sakai y Okushima 1982). Desde el punto de vista químico, PPasa-SE es una glicoproteína con un peso molecular de 40 kDa (determinado por SDS-PAGE) que el microorganismo secreta directamente al medio de cultivo. La misma fue purificada, parcialmente caracterizada e identificada como una endo-PGasa (EC 3.2.1.15). Resulta interesante mencionar que PPasa-SE presenta mayor afinidad (menor K_M) sobre sustratos en forma insoluble (protopectina) que sobre los sustratos equivalentes en forma soluble (APG, pectina) (Sakai y Okushima 1978, Sakai y Okushima 1982).

A pesar de generar una enzima liberadora de pectina, no puede crecer en medios de cultivo conteniendo pectina, pectatos u oligogalacturonanos. Esta característica es muy común en levaduras (Rexova-Benková y Markovic 1976, Luh y Phaff 1951, Schwam y Rose 1994, Blanco *et al.* 1997, Donaghy y McKay 1994), e indica que *G. klebahnii* no utiliza la enzima para consumir pectinas de los frutos sino como una herramienta biológica para colonizar el tejido vegetal a fin de acceder a los azúcares solubles que éste posee (Rojas *et al.* 2008). Esto se debe a que las levaduras en general secretan una o a lo sumo dos enzimas pectolíticas y éstas suelen ser endopoligalacturonasas (Blanco *et al.* 1994, Schwam y Rose 1994, Donaghy y McKay 1994). Las endo-PGasas son hidrolasas que actúan sobre APG o ácidos pécticos, produciendo en primera instancia cadenas de menor peso molecular. (Rexova-Benková y Markovic 1976, Jayani *et al.* 2005). Si no producen exopoligalacturonasas, no pueden degradar, en general, a las pectinas y pectatos hasta un grado tal que sea asimilable por el microorganismo como FCE (en este proceso AGA), como es el caso de *G. klebahnii* que sólo produce PPasa-SE (Luh y Phaff 1951, Schwam y Rose 1994, Blanco *et al.* 1997). Si producen exopoligalacturonasa, como *Geotrichum lactis* (Pardo *et al.* 1991), pueden crecer sobre pectina o APG obteniéndose niveles de biomasa final similares a los obtenidos con AGA.

A diferencia de este comportamiento, los hongos suelen tener pools bastante ricos, los cuales incluyen endo y exopoligalacturonasas, pectín y pectato liasas y pectinesterasas (Cavalitto *et al.* 1996, Aguilar *et al.* 1991, Solis-Pereira *et al.* 1993, Taragano y Pilosof 1999, Mikhailova *et al.* 1994, Urbanek y Zalewska-Sobczar 1975, Rexova-Benková y Tibensky 1972). Esta colección de enzimas les permite crecer sobre materiales pécticos más frecuentemente que a las levaduras (Takahashi y Koshijima 1988, Solis-Pereira *et al.* 1993, Mikhailova *et al.* 1994, Rexova-Benková y Tibensky 1972, Aguilar y Huitrón 1990). Como ya se ha mencionada, este no es el caso de *G. klebahnii*.

Comercialmente, la PPasa-SE producida por *G. klebahnii* fue denominada Pectinase-SE (Shikibo Ltd., Japan). Su uso está recomendado para facilitar la filtración y clarificación de jugos de frutas, manufactura de alimentos a base de macerados de vegetales como por ejemplo la maceración de los tejidos de patata para obtener alimentos de una sola célula (Nakamura et al. 1995, Zapata Zapata *et al.* 2012), extracción de pectina a partir de cáscaras de cítricos (Sakai y Okushima 1980, Rojas *et al.* 2008, Zapata Zapata *et al.* 2009), aislamiento de protoplastos vegetales, etc.

Diferentes autores han encontrado varias enzimas con actividad PPasa, las cuales han sido aisladas, purificadas y clasificadas en dos tipos, dependiendo de su mecanismo de acción. Las PPasas del tipo A son aquellas que reaccionan sobre una región específica del homogalacturonano (región lisa) de la protopectina, liberando pectina de alto peso molecular por depolimerización restringida. Las PPasas del tipo B son las que actúan sobre las cadenas de azúcares neutros que conectan la región del ramnogalacturonano (región ramificada) con los demás constituyentes de la pared celular, liberándose por lo tanto pectina con un mayor peso molecular que en el caso particular de las PPasas tipo A (Contreras Esquivel *et al.* 1997). Particularmente la PPasa-SE ha sido clasificada como de tipo A. En la Fig. 1.6. se muestra un esquema de la estructura de la protopectina, y se representan los productos de las diferentes formas de acción de las PPasas.

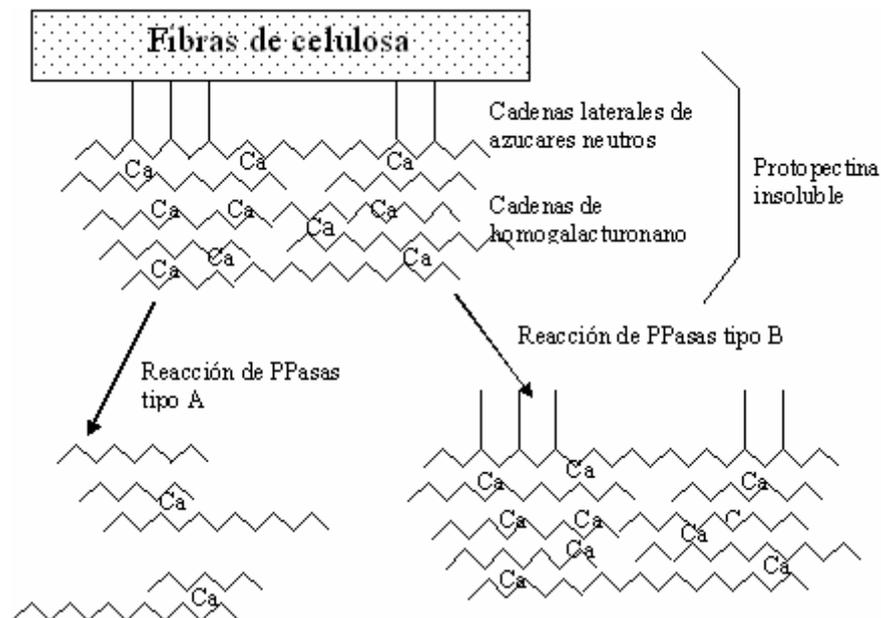


Figura 1.6. Estructura esquemática de la protopectina y acción de las diferentes protopectinasas (Zapata Zapata 2008).

1.5. Poligalacturonasa ácida (PGI) de *Aspergillus kawachii*

La fuente principal de la producción de enzimas pécticas son hongos del género *Aspergillus* (Voragen y Pilnik 1989). Estos microorganismos, como otros, producen diferentes enzimas pécticas en respuesta a las condiciones de cultivo, obteniéndose al final de la fermentación un cultivo que contiene una mezcla compleja de enzimas que degradan tanto pectina como otros polisacáridos de la pared celular.

Aspergillus kawachii es un hongo filamentoso empleado tradicionalmente para la producción de shochu (aguardiente japonés). Se distingue por ser un hiper productor de ácido cítrico y se emplea, además, en la elaboración de vinos (Toyama y Toyama 1997, Lee 2001). En la Tabla 1.3. se indican los procesos en los cuales *A. kawachii* se emplea como iniciador de la fermentación. El objeto de la acción fúngica es degradar los polisacáridos de los granos para producir el sustrato (mosto) el cual es luego inoculado para la fermentación alcohólica.

Tabla 1.3. Empleo de *A. kawachii* como iniciador de fermentación en la elaboración de bebidas y alimentos en China, Corea y Japón (Contreras Esquivel 2003).

Producto	Nombre popular	País	Iniciador*	Ingrediente principal	Referencia
Vino	Shochu	Japón	Shochu-koji	Arroz, cebada o batata.	Teramoto <i>et al.</i> 1994 Obayashi y Uchi 1999 Setoguchi <i>et al.</i> 1999
Cerveza	Takju	Corea	<i>A. kawachii</i> -Nuruk	Arroz, trigo.	So <i>et al.</i> 1999
Sazonador	Mirin	Japón	Shohu-koji	Arroz	Nunokawa <i>et al.</i> 1982
Pasta soja	Kochujang	Corea	<i>A. kawachii</i> -Meju	Soja, ají o chile	Lee <i>et al.</i> 1984
Vino	Tipo sake	Japón	Shochu-koji	Arroz	Kawai <i>et al.</i> 1977 Chiyogiku 1982 Shimamura <i>et al.</i> 2001
Vino	-	China	<i>A. kawachii</i>	Jugos, ácido acético.	Zhang y Yang, 2001

* Iniciador: nombre dado al hongo de acuerdo a la región y tipo de producto.

El proceso principal durante la preparación de shochu-koji es la degradación enzimática (sacarificación) de los polisacáridos del grano. Debido al carácter ácido de la fermentación (pH 2.0-3.5), *A. kawachii* se caracteriza por producir enzimas extracelulares con la interesante propiedad de ser activas y estables a pH más ácidos que sus equivalentes producidas por otros microorganismos (Contreras Esquivel *et al.* 1999). Varias de ellas (xilanasas, amilasas) han sido purificadas y parcialmente caracterizadas bioquímica y genéticamente (Mikami *et al.* 1987, Ito *et al.* 1992).

A. kawachii posee un sistema pectolítico constituido fundamentalmente por poligalacturonasas (PGasas), pectin-liasa (PeL), pectin-metilesterasa (PME) y un conjunto de glicosidasas. Se ha determinado que produce, según las condiciones de cultivo, al menos 4 distintas PGasas (Contreras Esquivel *et al.* 2004) que poseen propiedades bioquímicas ligeramente distintas. También se determinó actividad protopectinasa (PPasa) la cual se atribuyó a la acción de las PGasas.

Una endo-poligalacturonasa que despertó gran interés debido a que mostró un máximo de actividad a pH 2.0; fue purificada y denominada PGI. Se determinó que es una glicoproteína que posee actividad PPasa y que su peso molecular es de 60 kDa. PGI hidroliza sustratos solubles e insolubles a $\text{pH} \leq 3.0$ y es prácticamente inactiva a pH 5.0, propiedad que la diferencia de la mayoría de las PGasas fúngicas conocidas. La enzima degrada APG y pectina por un mecanismo endo y muestra preferencia por sustratos de bajo grado de esterificación. La actividad PPasa sobre protopectina de limón a pH 2.0-2.5 resultó estable a 50°C y fue capaz de solubilizar pectina de cáscaras de limón con aceptable rendimiento. Este fue el primer resultado reportado de solubilización de pectina en dicho rango de pH (Contreras Esquivel 1999). Por otra parte, se determinó la secuencia N-terminal del polipéptido maduro (S-T-C-T-F-T-D-A-A-T-A-S-E-S-K) (Contreras Esquivel 2003).

La productividad de PGasas que produce *A. kawachii* es muy baja aun luego de la optimización de los medios de cultivo (con lo que puede aumentarse en 10 o 20 veces) (Cavalitto y Mignone 2007) por lo que se dificulta la aplicación industrial de las mismas. Una alternativa para subsanar este déficit, es clonar a la proteína en un vector de expresión heterólogo y sobreexpresarla. El uso de levaduras como hospedadores del vector de expresión es una opción interesante, ya que estos microorganismos son fácilmente cultivables en medios semi-sintéticos, poseen rendimientos celulares elevados (obteniéndose concentraciones finales de más de 20 g/l) y producen altas concentraciones de la proteína de interés. En particular, *Saccharomyces cerevisiae* ha demostrado ser un

muy buen sistema de expresión de enzimas hidrolíticas fúngicas incluidas varias enzimas de *A. kawachii* y poligalacturonasas de otros orígenes (Hirose et al. 1998, Lang et al. 1997, Crous et al. 1995, Sakamoto et al. 1995, Suykerbuyk et al. 1995, Ito et al. 1992). Teniendo en cuenta que las enzimas producidas tienen un mercado directo en la industria alimentaria, la categoría de GRAS (generalmente reconocido como seguro) de *Saccharomyces* es una ventaja adicional.

El gen que codifica para PGI de *A. kawachii* fue clonado y sobreexpresado en un sistema de expresión heteróloga en un vector inducible (pYES2) para *S. cerevisiae*. Se obtuvo una actividad enzimática de alrededor de 1,5-2 U/ml, cantidades equivalentes a 70 veces la alcanzada con la enzima silvestre de *A. kawachii* (Rojas 2009).

1.6. PGzyme de *Asperillus sojæ*

Aspergillus sojæ ATCC 20235 es un importante hongo filamentoso en Biotecnología debido a su uso en diversos procesos fermentativos para la producción de productos alimenticios. Como *Aspergillus oryzae*, *A. sojæ* es ampliamente utilizado para la producción de alimentos y bebidas orientales como salsa de soja, sake (vino de arroz) y miso (pasta de soja) (Ushijima 1990). También ha sido extensamente utilizado en Japón para la producción de koji (Crespo *et al.* 2014).

Por otra parte, estos hongos tienen la capacidad de secretar grandes cantidades de enzimas hidrolíticas. Diversas proteínas homólogas y heterólogas se han expresado en *A. sojæ* (Heerikhuisen 2008), y se ha demostrado su potencial para la producción de enzimas comercialmente importantes como pectinasas (Heerd 2012), mananasas (Ozturk 2010) o glutaminasas (Ito 2013). Su estatus GRAS ha sido ventajoso sobre otros hongos filamentosos toxigénicos (productores de aflatoxina) para muchas aplicaciones de bioprocesos (Matsushima 2001).

PGzyme, es una endopoligalacturonasa producida por *A. sojæ* que recientemente está siendo estudiada en el CLICAP. Posee características bioquímicas que la hacen apta para el procesado de vegetales y ha demostrado ser útil en la industria vitivinícola. Para la evaluación de su expresión, se realizaron ensayos en medios conteniendo cáscara de pomaza de damasco y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como única FCE y FN respectivamente. Los valores de actividad obtenidos en medio líquido resultaron relativamente altos, permitiendo

seleccionar al residuo pomasa de damasco como un sustrato capaz de ser utilizado para la producción de enzima (Crespo *et al.* 2014).

1.7. Procesos de extracción de pectina

1.7.1. Técnicas de extracción

Las pectinas pueden ser extraídas de los tejidos vegetales por procedimientos físicoquímicos, microbiológicos o enzimáticos. En todos los casos el proceso consta básicamente de dos fases, la primera es la depolimerización restringida de la protopectina y la segunda consiste en la difusión de la pectina solubilizada desde la matriz del tejido hacia la solución extractante (Contreras Esquivel *et al.* 1997, Turakhodhaev y Khodzaev 1993, Hwang 2001). Comercialmente la pectina industrial se obtiene por extracción química a partir de bagazo (pomaza) de manzana o cáscaras de cítricos, ya que estos son residuos de bajo costo y contienen una alta proporción de sustancias pécticas (May 1990). Las extracciones microbiológicas y enzimáticas se conocen como métodos biológicos de extracción.

Típicamente, la extracción se lleva a cabo con ácido para inactivar enzimas endógenas degradativas, prevenir la desesterificación (desmetoxilación) y la degradación alcalina que ocurre por beta eliminación. El método químico emplea ácidos fuertes (clorhídrico, sulfúrico o nítrico, pH 1.0 a 3.0), altas temperaturas (80-95°C) y tiempos relativamente cortos de extracción (30-120 minutos). Normalmente una fracción de la pectina solubilizada se degrada simultáneamente en componentes de menor peso molecular, cuya presencia hace que tanto el rendimiento como las propiedades del producto obtenido sean negativamente afectadas (Contreras Esquivel *et al.* 1997, Marry *et al.* 2000, Canteri-Schemin *et al.* 2005, Zhongdong *et al.* 2006). La extracción ácida genera grandes problemas de efluentes y requiere el empleo de materiales resistentes a agentes corrosivos, lo cual aumenta los costos del proceso (Sakai *et al.* 1993). El uso de ácidos débiles como agentes extractores, tales como cítrico y tartárico, es poco habitual debido a los bajos rendimientos y su alto costo. Sin embargo, existen reportes en literatura donde su efectividad de extracción es comparable a la de los ácidos fuertes (Pruthi 1965, Rodríguez-Jasso 2003).

La extracción microbiológica de pectina se basa en el cultivo de microorganismos productores de PPasas en medios conteniendo como sustrato la materia prima que es fuente

de pectina. Tradicionalmente se usan hongos y levaduras (*G. klebahnii*, *Kluyveromyces marxianus* y *Endomicopsis capsulares*). Aunque con este método se pueden obtener pectinas de mejor calidad, se genera un aumento en el consumo de energía del biorreactor ya que se requiere mantener las condiciones de agitación y aireación adecuadas para el microorganismo (Sakai y Okushima 1980). La Fig. 1.7. muestra un esquema de un proceso de extracción de pectina a escala industrial usando el método microbiológico.

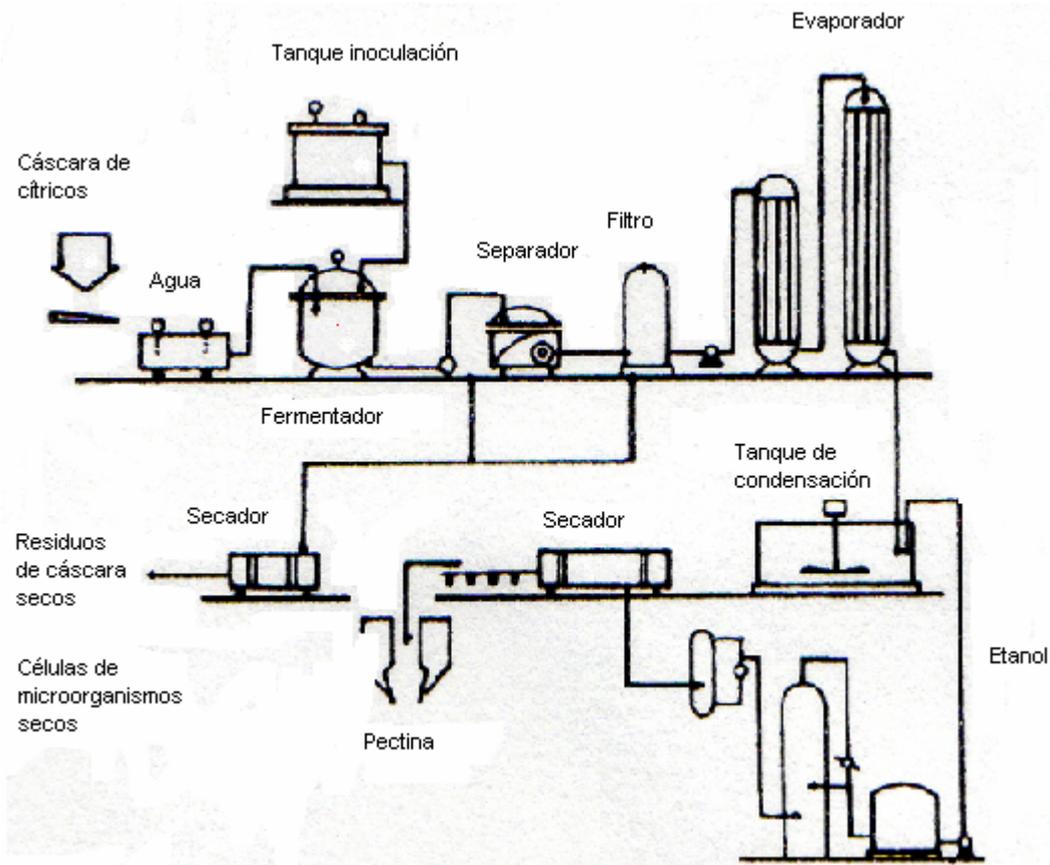


Figura 1.7. Esquema de producción de pectina a escala industrial usando el método microbiológico (Sakai y Okushima 1980).

Recientemente están siendo estudiados métodos alternativos de extracción de pectina, que incluyen ultrasonido (Zhang *et al.* 2013), microondas (Fishman y Cooke 2009, Fredes *et al.* 2009) y agua subcrítica (Ueno *et al.* 2008).

1.7.2. Extracción enzimática de pectina

La extracción de pectina por vía enzimática no necesariamente implica el uso exclusivo de enzimas pécticas, ya que se ha reportado el empleo conjunto de pectinasas con otras depolimerasas como celulasas o hemicelulasas, para potenciar el proceso extractivo (Choi y Cho 2000).

Para la extracción se utiliza algún tipo de enzima (PPasa) producida por microorganismos, pero sin la presencia de ellos. Esta enzima, cuando proviene de hongos filamentosos productores de complejos enzimáticos, suele usarse en forma pura para evitar la presencia de otro tipo de enzimas que puedan dañar de alguna manera la estructura de la pectina. No obstante, cuando se utilizan extractos provenientes de bacterias o levaduras, no siempre es necesario un proceso de purificación, ya que algunos de estos microorganismos no producen enzimas que puedan afectar la estructura de la pectina extraída (Sakamoto *et al.* 1995, Shkodina *et al.* 1998, Contreras Esquivel 2003).

Dicha extracción es un proceso de catálisis heterogénea, donde una enzima soluble actúa sobre un sustrato insoluble, generalmente particulado. Diferentes situaciones pueden presentarse con este tipo de sistemas heterogéneos: a) la enzima puede penetrar (difundir) dentro de la partícula y b) la enzima solo puede actuar sobre la superficie de la partícula (McLaren y Packer 1970). En el primer caso los procesos de difusión de la enzima al material son muy importantes para entender la cinética del proceso. En el segundo caso, el cual es más común en este tipo de sistemas, por ejemplo PPasa-SE – protopectina (Cavalitto *et al.* 1999), la acción de la enzima sobre el sustrato sólido se ve fuertemente influenciada por la adsorción de la misma al sustrato, para lo cual se requiere del conocimiento de la micro-estructura de la materia prima.

Los principales estudios acerca de los procesos de catálisis enzimática heterogénea han sido realizados sobre el sistema formado por celulosa – celulasa (Sun Bok Lee y Dewey 1982, Movagarnejad *et al.* 2000, Gan *et al.* 2003, Al-Zuhair 2007). En este sistema se ha detectado que la adsorción de las moléculas de enzima a la partícula sólida depende de factores estructurales como el área superficial y la porosidad de la partícula (Sun Bok Lee y Dewey 1982, Tanaka *et al.* 1988, Gama *et al.* 1994, Missang 1999, Boussaid y Saddler 1999, Al-Zuhair 2007). De igual manera estos estudios han permitido encontrar que las enzimas son más afines a la región amorfa de la partícula y menos a la región cristalina (Tatsumi *et al.* 2006).

En algunos procesos enzimáticos en fase heterogénea (enzima soluble - sustrato insoluble) se ha encontrado también que el modelo cinético de Michaelis-Menten, el cual es generalmente aplicado para sistemas de reacción homogéneos (enzima soluble - sustrato soluble), responde adecuadamente a la modelación del proceso (Sun Bok Lee y Dewey 1982, Movagarnejad *et al.* 2000, Gan *et al.* 2003).

1.8. Maceración de tejidos vegetales

La maceración, un proceso utilizado en la industria de alimentos, consiste en la desintegración de tejidos vegetales con el objeto de producir pulpas de frutas y vegetales para ser utilizados como ingredientes en alimentos, fundamentalmente para bebés y ancianos. Diferentes técnicas de maceración han sido utilizadas, entre las cuales la maceración enzimática tiene gran importancia, ya que permite la obtención de células independientes que conservan en gran medida su integridad, manteniendo en su interior los nutrientes propios del tejido natural. Por el contrario, los procesos de maceración química o mecánica provocan un alto rompimiento celular, lo que implica que las propiedades nutritivas de los tejidos se vean afectadas negativamente (Zapata Zapata 2012).

En general, los preparados enzimáticos encargados de separar los tejidos vegetales pueden clasificarse en dos tipos. El primer grupo es capaz de degradar las cadenas de APG y lograr la desintegración total del tejido vegetal. Ellos son utilizados mayoritariamente en la elaboración de alimentos con una alta proporción de sólidos solubles, *i.e.* puré de tomate, y para mejorar el rendimiento en la obtención de jugos de frutas. Generalmente, son utilizadas una combinación de enzimas celulolíticas y pectinolíticas para lograr una completa degradación. El segundo grupo actúa preferentemente sobre la laminilla media del tejido vegetal y algunas porciones de la pared celular primaria, sin dañar la pared celular secundaria, como por ejemplo las PPasas que actúan específicamente sobre la protopectina. Por esta razón, las celulasas son indeseables en esta mezcla enzimática (Nakamura *et al.* 1995). Dado que generan suspensiones de células libres y/o pequeños cúmulos celulares, estos procesos proveen una nueva clase de ingredientes de uso en la formulación de alimentos (bases de néctares, puré de vegetales y alimentos para bebés y ancianos) (Rombouts y Pilnik 1978, Voragen y Pilnik 1989, Sakai *et al.* 1993, Biely y Kremmicky 1998).

Diferentes trabajos se han realizado con el propósito de evaluar el efecto de diversos preparados enzimáticos sobre la maceración de tejidos vegetales. De la misma manera, el estudio de las condiciones de operación (pH, temperatura, composición del medio, agitación, etc.) que promuevan mejores resultados, han sido estudiadas (Bateman 1968, Sato 1968, Ishii 1984, Nakamura *et al.* 1995, De Bruijn y Biekman 1998, Salvador *et al.* 2002).

Muchas de las células vegetales aisladas por métodos enzimáticos son capaces de sobrevivir con la pared celular intacta. Así mismo, al ser células individuales, son capaces de volver a crecer para dar una nueva planta si se las incuba bajo condiciones adecuadas. Esto es posible ya que las condiciones de aislamiento no son agresivas y preservan las funciones biológicas de la célula. En este caso, el sabor, los pigmentos, y los nutrientes como las vitaminas presentes en el vegetal original son mayoritariamente preservados en los preparados de células simples (Sakai *et al.* 1993). Las PPasas de *G. klebahnii*, *Aspergillus awamori* y *Bacillus subtilis* son útiles para este propósito. Los componentes de las células simples son más estables que aquellos preparados obtenidos por ruptura mecánica de tejidos.

1.9. Clarificación de bebidas

A excepción de los jugos cítricos, la mayoría de las bebidas procesadas industrialmente a base de fruta, incluyendo tanto los jugos de frutas como los vinos, se clarifican durante el procesamiento a fin de evitar la turbidez indeseable y los sedimentos en los productos finales.

La turbidez inmediata en jugos de fruta recién exprimidos se considera generalmente que es el resultado de las partículas en suspensión de pectina derivados de las paredes celulares de la planta, además de pared de células rotas y otros materiales celulares (Weiss 1987, Binning y Possmann 1993). Se generan complejos formados por proteínas positivamente cargadas rodeadas de una capa de pectina con carga negativa. La repulsión de estos complejos entre si los mantiene en suspensión (Pilnik y Rombouts 1979). Estos complejos proteína-pectina no precipitan debido a repulsiones de tipo electrostáticas y le confieren al jugo un aspecto poco atractivo, provocando la formación de la “nube” (Grampp 1976).

Las preparaciones comerciales de pectinasas para la clarificación de jugos de fruta contienen generalmente una mezcla de pectinesterasa (PE), poligalacturonasa (PGasa) y pectin liasa (PL) (Dietrich *et al.* 1991). El agregado de las mismas promueve la degradación de la capa externa de pectina permitiendo la exposición sobre la superficie de las partículas de las proteínas contenidas en su interior. Esto genera la desestabilización electrostática de la suspensión, causando zonas de carga positivas y zonas de carga negativa sobre las partículas promoviendo la interacción y precipitación de las mismas. Así, las partículas pueden ser eliminadas por centrifugación o filtración del jugo (Endo 1965, Konja y Lovric 1993, Grassin y Fauquembergue 1996).

1.10. OBJETIVOS

Las pectinasas poseen varias aplicaciones en la industria de alimentos, en particular en la industria procesadora de frutas y vegetales. En Argentina no hay una importante producción de enzimas a escala industrial, siendo estas en su mayoría importadas, convirtiéndose este hecho en un fuerte componente que recae sobre los costos de producción. Por otra parte, el Alto Valle de Río Negro es una zona frutícola por excelencia, donde también se cultivan hortalizas. Esta producción genera toda una rama de industrias relacionadas (sidreras, jugueras, bodegas, etc.) para las cuales las pectinasas son un factor fundamental.

La enzima PPasa-SE de *G. klebahnii* ha sido objeto de diferentes tipos de estudio desde hace varios años, tanto por Sakai y cols. (Japón), como por distintos grupos del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI). Estos trabajos han demostrado que las propiedades de la PPasa-SE, así como su alta capacidad de expresión por parte de *G. klebahnii* y la capacidad de no requerir procesos de purificación ya que se presenta en el medio como una única enzima, la convierten en una enzima con alto potencial de aplicación industrial. Lo mismo ocurre con la Poligalacturonasa (PGI) de *A. kawachii* la cual es activa sobre sustratos solubles e insolubles a valores bajos de pH (2.0-3.0), además de haber sido clonada y expresada en un vector inducible (pYES2) para *S. cerevisiae* con lo que se obtienen cantidades equivalentes a 70 veces la alcanzada con la enzima silvestre. En estos estudios no se llevaron a cabo mejoras respecto a la expresión de la PGI recombinante. Por último la enzima PGzyme de *A. sojae* está siendo actualmente estudiada y ha demostrado ser útil en la industria vitivinícola. Las tres enzimas han demostrado poseer características bioquímicas que las hacen aptas para el uso y el procesado de vegetales y en este ámbito los estudios han sido muy escasos.

Considerando este panorama, y que el grupo de trabajo CINDEFI ha logrado la producción de estas pectinasas (Poligalacturonasa (PGI) de *A. kawachii*, Protopectinasa SE de *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae*), además de que la Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente Sede Alto Valle de la Universidad Nacional de Río Negro se encuentra emplazada en una zona productora frutícola por excelencia y donde además se cultivan hortalizas se decidieron plantear los siguientes objetivos:

- Estudiar la optimización de la producción de PGI recombinante de *A. kawachii* clonada en *S. cerevisiae* desarrollando cultivos alimentados.

- Evaluar la potencial aplicación de Poligalacturonasa (PGI) de *A. kawachii*, Protopectinasa SE (PPasa-SE) de *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae* a tres procesos industriales que involucran la producción frutihortícola de la región: extracción de pectina, maceración de tejidos y clarificación de jugos y sidras.
- Analizar los productos obtenidos (pectina extraída, tejido macerado y jugos para elaboración de sidras clarificados) a partir de la aplicación de pectinasas de *A. kawachii*, de *G. klebahnii* y de *A. sojae* a los tres procesos industriales.
- Comparar los rendimientos y la calidad de los productos obtenidos con la aplicación de dichas enzimas y los obtenidos a partir de pectinasas comerciales y con procesos tradicionales.

1.11. PLAN DE TRABAJO

1. Búsqueda bibliográfica. Estudio y análisis del estado del arte sobre los diferentes aspectos a desarrollar.
2. Optimización de la producción de PGI recombinante de *A. kawachii* clonada en *S. cerevisiae* en sistemas de cultivo por lotes alimentados bajo diferentes condiciones de cultivo/inducción. Estudio de la expresión de la enzima mediante el reemplazo de galactosa (inductor) por lactosa hidrolizada enzimáticamente a fin de evitar su uso debido a su alto costo.
3. Extracción de pectina a partir de tejidos de manzana y pera: Aplicación de PGI de *A. kawachii*, PPasa-SE de *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae*. Cálculo de rendimientos en la extracción de pectina. Comparación de los rendimientos, con los obtenidos con pectinasas comerciales y con extracción química. Caracterización parcial de la pectina extraída (grado de esterificación y contenido de ácido galacturónico).
4. Maceración de tejidos de zapallo y manzana: Aplicación de PPasa-SE de *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae*. Estudio del efecto de la concentración de las enzimas sobre el rendimiento del proceso. Cálculo de rendimientos en la maceración de los tejidos. Determinación de la composición y actividad antioxidante en el sobrenadante y en el tejido macerado analizando su capacidad nutracéutica. Comparación de los rendimientos y de la calidad de los productos obtenidos, con los obtenidos con pectinasas comerciales y con técnicas de maceración mecánica.

5. Clarificación de jugo de manzana para la elaboración de sidra: Aplicación de PPasa-SE de *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae*. Estudio del efecto de las condiciones de concentración de enzima, temperatura y tiempo de operación, sobre el rendimiento del proceso. Determinación del grado de clarificación. Comparación del grado de clarificación y de la calidad de los productos obtenidos, con los obtenidos con pectinasas comerciales y con técnicas tradicionales de clarificación.

1.12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, G., & Huitrón, C. (1990). Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 on different carbon source. *Biotechnology Letters*, 12(9), 655-660.
- Aguilar, G., Trejo, B. A., García, J. M., & Huitrón, C. (1991). Influence of pH on endo-and exo-pectinase production by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. *Canadian journal of microbiology*, 37(12), 912-917.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., & Serra, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 33(1), 21-28.
- Al-Zuhair, S. (2007) The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 99, 4078-4085.
- Aspinall, G. O. (1980). Chemistry of cell wall polysaccharides. *The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise (USA)*. 473-500.
- Baig, M. M., & Cerda, J. J. (1980). Studies on the role of citrus in health and disease. *Citrus Nutrition and Quality*. S. Nagy, J.A. Attaway (Eds.) *ACS symposium series American Chemical Society*. 25-41.
- Bateman, D. F. (1968). The enzymatic maceration of plant tissue. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 74, 67-80.
- Bernhard Wehr, J., Menzies, N. W. & Blamey, F. P. C. (2004). Alkali hydroxide-Induced gelation of pectin. *Food Hydrocolloids*, 18, 375-378.
- Blanco, P., Sieiro, C., Diaz, A., & Villa, T. G. (1994). Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(11), 974-977.
- Blanco, P., Sieiro, C., Di, A., & Villa, T. G. (1997). Differences between pectic enzymes produced by laboratory and wild-type strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(6), 711-712.
- Biely, P. and Kremnický, L. (1998). Yeast and their enzyme systems degrading cellulose, hemicellulose and pectin. *Food Technol. Biotechnology*, 36:305-312.
- Binning, R., & Possmann, P. (1993). Apple juice. *Fruit Juice Processing Technology. Agscience*.
- Boussaid, A., & Saddler, J. N. (1999). Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3), 138-143.
- Brejnholt, S. M. (2010). Pectin. *Food stabilisers, thickeners and gelling agents*. Imeson A. (Ed.). Wiley-Blackwell. 13: 234-262.
- Canteri-Schemin, M. H., Fertoni, H. C. R., Waszczyński, N., & Wosiacki, G. (2005). Extraction of pectin from apple pomace. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2), 259-266.

- Cavalitto, S. F., Areas, J. A., & Hours, R. A. (1996). Pectinase production profile of *Aspergillus foetidus* in solid state cultures at different acidities. *Biotechnology Letters*, 18(3), 251-256.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Mignone, C. F. (1999). Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnology Techniques*, 13, 385-390.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Mignone, C. F. (2000). Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, 260-265.
- Cavalitto, S. F., & Mignone, C. F. (2007). Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Process Biochemistry*, 42(2), 175-179.
- Chiyogiku, K.K. (1982). Manufacture of wine-like sake. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 82 02,676.
- Choi, H. S., Song, H. S., Ukeda, H. & Sawamura, M. (2000). Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 4156-4161.
- Coffin, D.R. and Fishman, M.L. (1994). Mechanical properties of pectin-starch films. *Polymers from Agricultural Coproducts*. ACS Symposium Series 575. American Chemical Society, 82-91.
- Collmer, A. and Keen, N.T. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review Phytopathology*, 24:383-409.
- Contreras Esquivel, J. C., Hours, R. A., Aguilar, C., Reyes Vega, M. L. & Romero, J. (1997). Revisión: Extracción microbiológica y enzimática de pectina. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 47, 208-216.
- Contreras Esquivel, J. C., Hours, R. A., Voget, C. E., & Mignone, C. F. (1999). *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *Journal of bioscience and bioengineering*, 88(1), 48-52.
- Contreras Esquivel, J. C. (2003). Purificación y caracterización de enzimas solubilizadoras de pectina de *Aspergillus kawachii*. (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata).
- Contreras Esquivel, J.C. and Voget, C.E. (2004). Purification and characterization of endopolygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal of Biotechnology*, 110:21-28.
- Crespo, J. M.; Fratebianchi de la Parra, D., Cavalitto, S. (2014). Producción de poligalacturonasa por *Aspergillus sojae* en cultivos batch utilizando residuos agroindustriales. SAPROBiO: Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos.
- Crous, J.M.; Pretorius, I.S. & Van Zyl, W.H. (1995). Cloning and expression of an *Aspergillus kawachii* endo-1,4- β -xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 28:467-473.
- Darvill, A. G., McNeil, M. & Albersheim, P. (1978). Structure of plant cell walls VIII: a new pectic polysaccharide. *Plant Physiology*, 62, 418.

- Darvill, A. L. A. N., McNeil, M., Albersheim, P., & Delmer, D. P. (1980). The primary cell walls of flowering plants. *The biochemistry of plants*, 1, 91-162.
- Da Silva, E. G., Borges, M., Medina, C., Piccoli, R. H. & Schwan, R. F. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*., 5, 859-865.
- De Bruijn, J., & Biekman, E. (1998). Maceración enzimática de papas: influencia de las condiciones de reacción. *Agro-Ciencia*. v, 14(2), 245-250.
- De Vries, J. A., Rombouts, F. M., Voragen, A. G. & Pilnik, W. (1982). Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydrate Polymers*, 2, 25-33.
- Dietrich, H., Patz, C., Schoepplein, E., & Will, F. (1991). Problems in evaluation and standardization of enzyme preparations. *Fluessiges Obst*. 58(8), 131-134.
- Donaghy, J. A., & McKay, A. M. (1994). Pectin extraction from citrus peel by polygalacturonase produced on whey. *Bioresource technology*, 47(1), 25-28.
- Endo, B. Y. (1965). Hostological responses of resistant and susceptible soybean varieties, and backcross progeny to entry and development of *Heterodera glycines*. *Phytopath*, 55, 375-81.
- Fishman, M. L., & Cooke, P. H. (2009). The structure of high-methoxyl sugar acid gels of citrus pectin as determined by AFM. *Carbohydrate research*, 344(14), 1792-1797.
- Fredes Monsalves, C., Loyola López, N., & Muñoz Cruz, J. C. (2009). Extracción de pectinas de vitis labrusca cv. Concord para producir jaleas. *Idesia (Arica)*, 27(3), 9-14.
- Gama, F. M., Teixeira, J. A. & Mota, M. (1994). Cellulose Morphology and Enzymatic Reactivity: A Modified Solute Exclusion Technique. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 381-387.
- Gan, Q., Allen, S. J. & Taylor, G. (2003). Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulase: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*, 38, 1003-1018.
- Grampp, E. A. (1976). New process for hot clarification of apple juice for apple juice concentrate. *Fluss. Obst*, 43, 382-388.
- Grassin, C., & Fauquembergue, P. (1996). Application of pectinases in beverages. *Progress in Biotechnology*, 14, 453-462.
- Guzmán, P. (1990). Cultivo de la parchita. *Espasan*. 27-32.
- Haddad, O., & Millán, M. (1975). La Parchita Maracuyá (*passiflora edulis* F. *Flavicarpa* Degener). Publicación del fondo de desarrollo frutícola. *Boletín Técnico*, (2).
- Heerd, D., Yegin, S., Tari, C., & Fernandez-Lahore, M. (2012). Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus spp.* in solid-state fermentation: A comparative study. *Food and bioproducts processing*, 90(2), 102-110.
- Heerikhuisen, M., Hondel, C., & Punt, P. (2008). Protein production in *Aspergillus sojae*. *Protein Science Encyclopedia*, 191-214.

- Hirose, N., Kishida, M., Kawasaki, H., & Sakai, T. (1998). Molecular cloning and expression of a polygalacturonase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of fermentation and bioengineering*, 86(3), 332-334.
- Hoondal, G.S.; Tiwari, R.P.; Dahiya, N.; Dahiya, N. & Beg, Q.K. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59409:409-418.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Condemine, G.; Nasser, W. and Reverchon, S. (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review Microbiology*, 50:213-257.
- Hwang, J.-K. (2001). Production of functional carbohydrates by the extrusion reactor. *Food Science and Biotechnology*, 10:455-459.
- Iglesias, M. T. & Lozano, J. E. (2004). Extraction and characterization of sun ower pectin. *Journal of Food Engineering*, 62, 215-223.
- Ishii, S. (1976). Enzymatic maceration of plant tissues by endo-pectin lyase and endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. *Phytopathology*, 66, 281.
- Ishii, S. (1984). Cell wall cementing materials of grass leaves. *Plant Physiology*, 76, 959-961.
- Ito, K., Ogasawara, H., Sugimoto, T., & Ishikawa, T. (1992). Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(4), 547-550.
- Ito, K., Koyama, Y., & Hanya, Y. (2013). Identification of the glutaminase genes of *Aspergillus sojae* involved in glutamate production during soy sauce fermentation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(9), 1832-1840.
- Izydorczyk, M., Cui, S. W., & Wang, Q. (2005). Polysaccharide gums: structures, functional properties, and applications. *Food carbohydrates: Chemistry, physical properties, and applications*, 293-299.
- Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource technology*, 77(3), 215-227.
- Kawai, S.; Takahashi, K. and Tamaki, Y. (1977). Production of citron-sake. III. *Nippon Jozo Kyokai Zasshi*, 72:680-681.
- Keijbets, M. J., Pilnik, W., & Vaal, J. F. A. (1976). Model studies on behaviour of pectic substances in the potato cell wall during boiling. *Potato Research*, 19(3), 289-303.
- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K., & Honda, C. (2002). Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 215(6), 924-933.
- Konja, G., & Lovric, T. (1993). Berry fruit juices. *Fruit juice processing technology*, 436-514.

- Landbo, A., Kaack, K. & Meyer, A. S. (2007). Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 135-142.
- Lang, S., & Wullbrandt, D. (1999). Rhamnose lipids–biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1), 22-32.
- Larone, D. H. (2011). *Medically important fungi: a guide to identification*. American Society of Microbiology.
- Lee, T. S., Chun, M. S., & Oh, K. H. (1984). Effect of Kojis on the Component of Kochujang. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 13(3), 238-246.
- Lee, C. H. (2001). Korea, the land of soybean fermentation. *Fermentation Technology in Korea*. Lee, C. H. (Ed.). Korea University Press, 70-91.
- Luh, B. S., & Phaff, H. J. (1951). Studies on polygalacturonase of certain yeasts. *Archives of biochemistry and biophysics*, 33(2), 212-227.
- Majdoub, H., Roudesli, S., Picton, L., Le Cerf, D., Muller, G., & Grisel, M. (2001). Prickly pear nopals pectin from *Opuntia ficus-indica* physico-chemical study in dilute and semi-dilute solutions. *Carbohydrate polymers*, 46(1), 69-79.
- Marry, M., McCann, M. C., Kolpak, F., White, A. R., Stacey, N. J., & Roberts, K. (2000). Extraction of pectic polysaccharides from sugar-beet cell walls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(1), 17-28.
- Matsushima, K., Yashiro, K., Hanya, Y., Abe, K., Yabe, K., & Hamasaki, T. (2001). Absence of aflatoxin biosynthesis in koji mold (*Aspergillus sojae*). *Applied microbiology and biotechnology*, 55(6), 771-776.
- May, C.D. (1990). Industrial pectins: sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers* 12:79-99.
- McCleary, B.V. (1986). Enzymatic modification of plant polysaccharides. *International Journal Biol. Macromol.* 8:354-349.
- McFeeters, R. F., Hankin, L., & Lacy, G. H. (1992). Pectinolytic and pectolytic microorganisms. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Vanderzant C., Splittstoesser D. F. (Eds.). American Public Health Association, 3:195-199.
- McLaren, D. & Packer, L. (1970). Some aspects of enzyme reactions in heterogeneous systems. *Advances in Enzymology*. John Wiley & Sons. 245-308.
- McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C., & Albersheim, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual review of biochemistry*, 53(1), 625-663.
- Mikami, S., Iwano, K., Shiinoki, S., & Shimada, T. (1987). Purification and some properties of acid-stable. α -amylases from shochu koji (*Aspergillus kawachii*). *Agricultural and biological chemistry*, 51(9), 2495-2501.

- Mikhailova, R. V., Sapunova, L. I., & Lobanok, A. G. (1994). Biosynthesis of pectinlyases in *Penicillium adametzii*, *P. citrinum* and *P. janthinellum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10(4), 457-461.
- Missang, C. E. (1999). Study of diffusion and adsorption processes during the maceration apple tissue by polygalacturonases. *Food Biotechnology*, 13, 67-91.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 266-277.
- Movagarnejad, K., Sohrabi, M., Kaghazchi, T. & Vahabzadeh, F. (2000). A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid-liquid systems. *Biochemical Engineering Journal*, 4, 197-206.
- Nakamura, T., Hours, R. A. & Sakai, T. (1995). Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science*, 60, 468-472.
- Northcote, D. H. (1986). Control of pectin synthesis and deposition during plant cell wall growth. In *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)*. 0-134.
- Nunokawa, Y., Shiinoki, S., & Hirotsune, M. (1982). Production of mirin with use of shochu-koji. *Quality improvement of mirin (II)*. 77:123-125.
- Nwanekezi, E. C., Alawuba, O. C., & Mkpolulu, C. C. (1994). Characterization of pectic substances from selected tropical fruits. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 31(2), 159-161.
- Obayashi, A. & Uchi, S. (1999). Manufacture of shochu from sweet potatoes. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 4 pp. JP 11032751.
- Ozturk, B., Cekmecelioglu, D., & Ogel, Z. B. (2010). Optimal conditions for enhanced β -mannanase production by recombinant *Aspergillus sojae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(3), 135-139.
- Pardo, C., Lapeña, M. A., & Gacto, M. (1991). Purification and characterization of an extracellular exopolygalacturonase from *Geotrichum lactis*. *Canadian journal of microbiology*, 37(12), 974-977.
- Pérez-Martínez, J. D., Sánchez-Becerril, M., de Jesús Ornelas-Paz, J., González-Chávez, M. M., Ibarra-Junquera, V., & Escalante-Minakata, P. (2013). The effect of extraction conditions on the chemical characteristics of pectin from *Opuntia ficus indica* cladode flour. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(4), 1040-1051.
- Pilnik, W., & Voragen, A. G. J. (1970). Pectic substances and other uronides. *Biochemistry of fruits and their products*, v. 1, 53-87.
- Pilnik, W. and Romboust, F.M. (1979). Utilization of pectic enzymes in food production. In: *Food Science and Technology*. Chiba, H.; Fujimaki, M.; Iwai, K.; Mitsuda, H. and Morita, Y. (Eds.). Elsevier Scientific Publishing Company. 7: 269-277.
- Pilnik, W., & Rombouts, F. M. (1981). Pectic enzymes. *Enzymes and food processing*, 105-128.
- Pruthi, J. S. (1965). Studies on isolation, characterisation and recovery of pectin from purple passion fruit waste (rind). *Chemistry & industry*, 13, 555.

- Rättö, M., & Viikari, L. (1996). Pectinases in wood debarking. *Progress in Biotechnology* 14 (*Pectins and Pectinases*). Voragen, A.G.J., Visser, J. (Eds.) The Netherlands. 979-982.
- Rexova-Benkova, L., & Tibenský, V. (1972). Selective purification of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase by affinity chromatography on cross-linked pectic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 268(1), 187-193.
- Rexova-Benkova, L. & Markovic, O. (1976). Pectic enzymes. *Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.* Tipson & Horton D. (Eds.).
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929-967.
- Rodriguez, Jasso, R.M. (2003). Desarrollo de una metodología alternativa para la extracción de pectina de cáscara de limón mexicano mediante un tratamiento termoquímico. (Grade Dissertation, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, México).
- Rojas, N. L., Cavalitto, S. F., Mignone, C. F., & Hours, R. A. (2008). Role of PPase-SE in *Geotrichum klebahnii*, a yeast-like fungus able to solubilize pectin. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(1), 126-133.
- Rojas, N. L. (2009). Enzimas fúngicas extremófilas de aplicación biotecnológica: producción y caracterización de ramnosidasas alcalofílicas de *Acremonium murorum* y *Acrostalagmus luteo-albus* y poligalacturonasa acidofílica de *Aspergillus kawachii* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina).
- Rolin, C. (1993). Pectins. *Polysaccharides and their Derivates*. Wishler, R.L., BeMiller, J. (Eds.). Academic Press. 3: 257-293.
- Rolin, C.; Nielsen, B.U. y Glahn, P.-E. (1998). Pectin. *Polisaccharides. Structural diversity and function versatility*. S. Dumitriu (Ed.). Mercel Dekker. 377-431.
- Rombouts, F. M. & Pilnik, W. (1978). Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochemistry*, 13, 9-13.
- Sakai, T. & Okushima, M. (1978). Protopectin solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agriculture and Biological Chemistry*, 42, 2427-2429.
- Sakai, T. & Okushima, M. (1980). Microbial production of pectin from citrus peel. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 908-912.
- Sakai, T. & Okushima, M. (1982). Purification and crystallization of protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agriculture and Biological Chemistry*, 46, 667-676.
- Sakai, T., & Winkelmann, G. (1992). Degradation of pectins. *Microbial degradation of natural products.*, 57-81.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. & Vandamme, J. (1993). Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39, 213-294.

- Sakamoto, T., Hours, R. A. & Sakai, T. (1995). Enzymatic pectin extraction from protopectins using microbial protopectinasas. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 353-358.
- Salvador, L. D., Suganuma, T., Kitahara, K., Fukushige, Y. & Tanoue, H. (2002). Degradation of cell wall materials from sweetpotato, cassava, and potato by a bacterial protopectinase and terminal sugar analysis of the resulting solubilized products. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93, 64-71.
- Sanchez, S., & Demain, A. L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 895-906.
- Sarioglu, K., Demir, N., Acar, J. & Mutlu, 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*.
- Sato, S. (1968) Enzymatic maceration of plant tissue. *Physiologia Plantarum*, 21, 1067-1075.
- Schwan, R. F., & Rose, A. H. (1994). Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *Journal of applied bacteriology*, 76(1), 62-67.
- Selvendran, R. R. (1985). Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. *Journal of Cell Science*. (Supplement 2), 51-88.
- Selvendran, R. R., & O'Neill, M. A. (1987). Isolation and analysis of cell walls from plant material. *Methods of Biochemical Analysis, Volume 32*, 25-153.
- Setoguchi, S.; Takamine, K.; Kamesawa, H. & Hamasaki, Y. (1993). Study on sweet potato koji. *Kagoshima-ken Kogyo Gijutsu Senta Kenkyu Hokoku*, 7:13-19.
- Shimamura, K.; Sasaki, T. & Sato, T. (2001). Manufacture of alcoholic beverages using fruit juice and white koji. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 2 pp. JP 2001029061.
- Shivakumar, P.D.; Nand, Krishna (1995). Anaerobic degradation of pectin by mixed consortia and optimization of fermentation parameters for higher pectinase activity. *Lett. Appl. Microbiol.*, 20:117-119.
- Shimamura, K.; Sasaki, T. & Sato, T. (2001). Manufacture of alcoholic beverages using fruit juice and white koji. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 2 pp. JP 2001029061.
- Shkodina, O. G., Zeltser, O. A., Selivanov, N. Y. & Ignatov, V. V. (1998). Enzymatic extraction of pectin preparations from pumpkin. *Food Hydrocolloids*, 12, 313-316.
- So, M. H., Lee, Y. S., Han, S. H., & Noh, W. S. (1999). Analysis of major flavor compounds in Takju mash brewed with a modified Nuruk. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 12(12), 421-426.
- So, M. H., Lee, Y. S., & Noh, W. S. (1999). Improvement in the quality of Takju by a modified Nuruk. *Korean J Food & Nutr*, 12(12), 427-432.
- Solis-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., & Gutiérrez-Rojas, M. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 36-41.

- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, 306(5705), 2206-2211.
- Sørensen, S. O., Pauly, M., Bush, M., Skjøl, M., McCann, M. C., Borkhardt, B., & Ulvskov, P. (2000). Pectin engineering: modification of potato pectin by in vivo expression of an endo-1, 4- β -D-galactanase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13), 7639-7644.
- Soriano Lasheras, M. (2004). Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus sp.* BP-23 E YvpA de *Bacillus subtilis*. (Doctoral dissertation, Universidad de Barcelona).
- Srirangarajan, A. N., & Shrikhande, A. J. (1979). Technical note: Comparative aspects of pectin extracted from the peels of different varieties of mango. *International Journal of Food Science & Technology*, 14(5), 539-541.
- Sun Bok Lee, H. S. S. & Dewey, D. Y. R. (1982). Adsorption of cellulose on cellulose: effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 2137-2153.
- Sutton, D. A., Fothergill, A. W., & Rinaldi, M. G. (1998). *Guide to clinically significant fungi*. Williams & Wilkins (Eds.).
- Suykerbuyk, M. E. G., Schaap, P. J., Stam, H., Musters, W., & Visser, J. (1995). Cloning, sequence and expression of the gene coding for rhamnogalacturonase of *Aspergillus aculeatus*; a novel pectinolytic enzyme. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(5), 861-870.
- Takahashi, N., & Koshijima, T. (1988). Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood science and technology*, 22(3), 231-241.
- Tanaka, M., Ikeseke, M. & Matsuno, R. (1988). Effect of pore size in substrate and diffusion of enzyme on hydrolysis of cellulosic materials with cellulases. *Biotechnology and Bioengineering*, 32, 698-706.
- Taragano, V. M., & Pílosof, A. M. (1999). Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3), 411-419.
- Tatsumi, H., Katano, H. & Ikeda, T. (2006). Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose by cellobiohydrolase using an amperometric biosensor. *Analytical Biochemistry*, 357, 257-261.
- Taylor, S. (1991). *The chemistry and technology of pectin*. R. H. Walter (Ed.). Academic Press.
- Teramoto, Y., Saigusa, N., Yoshida, Y., Ueda, S., & Yoshizawa, K. (1994). Production and characteristics of red rice sake. *Journal of the Institute of Brewing*, 100(1), 3-6.
- Timell, T. E. (1967). Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Science and Technology*, 1(1), 45-70.

- Toyama, H., & Toyama, N. (1997). Isolation of acid hyper-producing strains from hyperpolyploids of *Aspergillus kawachii*. *Microbios*, 90(362), 23-32.
- Turakhozhayev, M. T., & Khodzhaev, M. A. (1993). Plant pectin substances. Methods of isolating pectin substances. *Chemistry of Natural Compounds*, 29(5), 558-565.
- Ueno, H., Tanaka, M., Hosino, M., Sasaki, M., & Goto, M. (2008). Extraction of valuable compounds from the flavedo of Citrus junos using subcritical water. *Separation and Purification Technology*, 62(3), 513-516.
- Urbanek, H., & Zalewska-Sobczak, J. (1975). Polygalacturonase of Botrytis cinerea e-200 pers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 377(2), 402-409.
- Ushijima, S., Nakadai, T., & Uchida, K. (1990). Breeding of new koji-molds through interspecific hybridization between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* by protoplast fusion.
- Van Buren, J. P. (1991). Function of pectin in plant tissue structure and firmness. *The chemistry and technology of pectin*, 1-22.
- Voragen, A. C. J., & Pilnik, W. (1989). Pectin-degrading enzymes in fruit and vegetable processing. In *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)*.
- Voragen, A. G., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A., & Renard, C. (1995). Pectins. *Food polysaccharides and their applications*, 287-339.
- Voragen, A. G., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263-275.
- Voragen, F., Beldman, G., & Schols, H. (2001). Chemistry and Enzymology of Pectins. *Advanced dietary fibre technology*, McCleary & Prosky (Eds.). 33:379-398.
- Weiss, J. (1987). Fruit juice embellishment and clarification. *Fruit and Vegetable Juices, Handbook of Food Technology*, 2, 168-189.
- Wilkie, K. C., & Woo, S. L. (1977). A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xyans and other hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, 57, 145-162.
- Wicker, L., Kim, Y., Kim, M. J., Thirkield, B., Lin, Z., & Jung, J. (2014). Pectin as a bioactive polysaccharide—Extracting tailored function from less. *Food Hydrocolloids*, 42, 251-259.
- Willats, W. G., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97-104.
- Yamada, H. (1994). Pectic polysaccharides from chinese herbs: structure and biological activity. *Carbohydrate Polymers*, 25:269-276.
- Yapo, B. M., Lerouge, P., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2007). Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, 69(3), 426-435.

- Zapata Zapata, A. D., Sainz, R. B., Cavalitto, S. F. & Hours, R. A. (2007). Maceración de Albedo de Limón con Protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii*. *Congreso Argentino de Microbiología*.
- Zapata Zapata, A. D. (2008). Protopectinasa SE de *Geotrichum klebahnii*: producción, purificación y aplicación al proceso de maceración de tejidos vegetales y extracción enzimática de pectina (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata).
- Zapata Zapata, A. D., Cavalitto, S. F. & Hours, R. A. (2009). Evaluación de la capacidad de solubilización de pectina de cáscara de limón usando protopectinasa-SE. *Vitae*, 16(1), 67-74.
- Zapata Zapata, A. D., Montoya, C. A. G., Cavalitto, S. F., Hours, R. A., & Rojano, B. A. (2012). Enzymatic maceration of albedo layer from sour orange (*Citrus aurantium* L.) with protopectinase-se and measurement of antioxidant activity of the obtained products. *LWT-Food Science and Technology*, 45(2), 289-294.
- Zhang, W. & Yang, R. (2001). Application of engineering-strain in preparation of acetic acid beverage with orange juice. *Zhongguo Niangzao*, (3), 11-15, 22.
- Zhang, L., Ye, X., Ding, T., Sun, X., Xu, Y., & Liu, D. (2013). Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 222-231.
- Zhongdong, L., Guohual, W., Yunchang, G. & Kennedy, J. F. (2006). Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. *Carbohydrate Polymers*, 64, 548-552.

CAPITULO 2

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PGI RECOMBINANTE EN LOTE ALIMENTADO MEDIANTE DIFERENTES PERFILES DE ALIMENTACIÓN

RESUMEN

Se cultivó *S. cerevisiae* para la producción de PGI recombinante a nivel de reactor en medio sintético con glucosa y urea como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente. Luego de un período de acumulación de biomasa en sistema *batch* con glucosa como única FCE, los cultivos se indujeron mediante la alimentación del mismo medio de alimentación con el agregado de galactosa (inductor del promotor Gal1 del pYES2). Los cultivos se realizaron en un fermentador New Brunswick Bioflo 350 con control de O₂ disuelto y pH. Se estudió la expresión de la enzima diseñando cuatro estrategias de inducción durante la alimentación. En las dos primeras estrategias se realizó la inducción luego del *batch* con 100 g/l de glucosa (FCE) y, alternativamente, 10 g/l y 45 g/l de galactosa (inductor) a un flujo de 8,8 ml/h. En las siguientes dos estrategias se utilizó una alimentación en dos etapas. En ambas, en la primera etapa se alimentó con 100g/l de glucosa a un flujo de 26 ml/h con el objetivo de aumentar la concentración de biomasa. En la segunda etapa, se alimentó con 100 g/l de glucosa y 45 g/l de galactosa. En la primera a un flujo de 26 ml/h y a 8,8 ml/h en la otra. La condición de la alimentación en dos etapas con una inducción a 8,8 ml/h para la segunda etapa resultó ser la condición de mayor producción de enzima obteniéndose una actividad final de 77 U/ml y una productividad de 2,40 U/ml.h. Para optimizar los costos y por ende la producción de dicha enzima, se realizó en el medio de cultivo el reemplazo de galactosa comercial, que es muy cara, por galactosa obtenida a partir de la hidrólisis enzimática de lactosa. Para la reacción de hidrólisis se empleó como enzima una β -galactosidasa (Maxilact LG2000) y como sustrato lactosa comercial. El grado de hidrólisis se determinó midiendo las concentraciones de glucosa y galactosa liberadas. Los productos de reacción obtenidos fueron aproximadamente de un 50% de glucosa, un 45% de galactosa y un 5% de oligosacáridos (calculado por diferencia). La reacción se completó en promedio en un 96%. Al aplicar el sistema de lote alimentado para la producción enzimática con el reemplazo de la galactosa obtenida mediante la hidrólisis de la lactosa, se obtuvo un óptimo crecimiento de *S. cerevisiae* y producción enzimática a un menor costo.

2.1. INTRODUCCIÓN

Las PGasas actúan básicamente sobre el HG hidrolizando las uniones glicosídicas entre residuos no esterificados. El potencial de aplicación de PGasas, relacionado con la extracción de pectina, la clarificación de jugos y la desintegración de tejidos vegetales (particularmente en procesos de maceración y licuefacción), lleva a desarrollar estudios relacionados con la mejora de su producción.

Una de las pectinasas producidas por *Aspergillus kawachii*, denominada PGI (Contreras Esquivel 2003), presenta características sumamente interesantes, particularmente respecto a su estabilidad y actividad a pHs bajos. Dado que los niveles de actividad obtenidos en los cultivos de *A. kawachii*, aun luego de su optimización son extremadamente bajos para pensar en su producción industrial, se planteó la necesidad de incrementarlos mediante la sobreexpresión heteróloga considerando su posible aplicación en procesos en mayor escala. Por lo tanto, el gen *pgI* que codifica para la PGI producida por *A. kawachii* fue clonado en un sistema de expresión heterólogo, *S. cerevisiae*, con el objeto de incrementar los niveles de producción de enzima con respecto a los naturales (Rojas 2009). El gen fue clonado en el vector de expresión pYES2 bajo el control del promotor GAL1, inducible por galactosa, pero fuertemente reprimible por glucosa lo que permite el control de la expresión. En los protocolos habituales de expresión en este sistema, las células de *S. cerevisiae* se cultivan generalmente primero en medios con glucosa como FCE para obtener biomasa y luego el gen clonado se induce mediante la adición de galactosa, bien sea en forma de pulsos, bien sea en forma continua. La relación molar de galactosa y glucosa, y la concentración absoluta de galactosa son los parámetros claves para determinar el nivel de expresión génica (Da Silva y J.E. Bailey 1989, Da Silva y J.E. Bailey 1991). Además, es importante mencionar que los procesos con *S. cerevisiae* permiten obtener cultivos en los cuales la proteína de interés es producida con un mínimo o nula presencia de otras enzimas, lo cual facilita enormemente el proceso de recuperación.

La elección de la correcta estrategia en el clonado del gen codificante de una enzima resulta esencial para alcanzar niveles de producción superiores a los silvestres. Sin embargo, no menos importante es el desarrollo de un sistema de cultivo apropiado para su producción de manera de aprovechar al máximo el potencial del sistema de expresión. La optimización de un proceso de fermentación tiene lugar una vez que se haya demostrado la factibilidad de la producción en el microorganismo seleccionado, es decir, que el sistema de expresión haya sido correctamente construido y sea funcional.

Existen tres sistemas básicos para el cultivo de microorganismos, silvestres o recombinantes. Por lote (*batch*), por lote alimentado (*fedbatch*) y cultivo continuo. Los tres sistemas poseen sus ventajas y desventajas, sin embargo, el cultivo continuo no es muy recurrido para la producción ya que el gran número de generaciones que transcurren en el mismo hace que sea proclive a la contaminación y a la aparición de mutaciones espontáneas con el consiguiente cambio en la cepa de producción. Los procesos *batch* son simples y robustos, pero presentan una serie de limitaciones debidas a la falta de control sobre el crecimiento microbiano. Por un lado, el hecho de que los microorganismos crezcan a μ_{\max} durante buena parte del *batch* hace que el consumo de O_2 sea alto cuando la concentración celular final deseada es alta, tal como ocurre en los procesos en los que el producto a obtener está asociado al crecimiento celular y, por lo tanto, es proporcional a la biomasa obtenida. Además, la única forma de obtener una alta concentración de biomasa es partir de un medio con una alta concentración de sustrato, hecho que puede generar problemas de inhibición y/o de alteraciones en el medio de cultivo durante el proceso de esterilización. Por último, *S. cerevisiae* presenta, como otros microorganismos, metabolismo de sobreflujo en el cual, cuando crece a velocidades específicas elevadas, presenta un metabolismo respirofermentativo dando lugar a la generación de productos (en este caso etanol) a pesar de poseer suficiente cantidad de O_2 (Käpelli 1986). Este tipo de metabolismo se conoce como efecto Crabtree positivo (Postma 1989). El sistema lote alimentado junta las ventajas del cultivo *batch* (relativa simpleza, número limitado de generaciones, alta resistencia a las contaminaciones) con las ventajas del sistema continuo (alto control de la cinética del proceso, velocidad específica de crecimiento menor al máximo, alta capacidad de producción de biomasa). Es por eso que suele ser la elección primaria en la producción de muchos productos biotecnológicos, incluidas las proteínas recombinantes. En este sistema, la alimentación restringida de FCE permite que las células crezcan a una alta densidad con metabolismo respiratorio manteniendo una baja velocidad específica de crecimiento (Mendoza-Vega 1994).

Los medios de cultivo definidos o simples (sintéticos) suelen ser más caros que los no definidos (complejos) que contienen componentes de origen natural tales como harinas e hidrolizados. Sin embargo, los medios simples generalmente brindan no sólo mayor reproducibilidad al sistema, sino que también aportan una menor cantidad de impurezas al medio, facilitando la separación y purificación de la proteína de interés. Debido a la crisis económica mundial y a que la mayoría de los reactivos empleados en los medios sintéticos de cultivo utilizados para expresar a las enzimas son importados, los costos en la producción enzimática de PGI aumentaron considerablemente.

Una de las fuentes de carbono, que además es el componente inductor de la expresión de la enzima en *S. cerevisiae* recombinante, que usa el medio sintético y que ha sufrido un fuerte incremento en el precio, es la galactosa. A diferencia de esta, la lactosa presenta un menor costo en el mercado, pero es uno de los azúcares más difícilmente fermentables. La lactosa es un disacárido constituido por una molécula de glucosa y una de galactosa, unidas por enlace β -1,4-glucosídico. A partir de su hidrólisis se obtiene como resultado sus monosacáridos constituyentes, facilitando así sus procesos fermentativos (Beltran y Acosta 2012). La hidrólisis puede ser química o mediante el uso de enzimas. El primer método, se caracteriza por el uso de ácidos concentrados y altas temperaturas (80 – 100 °C) (Ladero *et al.* 2003, Rosenberg 2006). El segundo método, emplea enzimas bajo condiciones de temperaturas moderadas y pH específicos, y no genera subproductos indeseados (Santos *et al.* 1998). Estas enzimas son las β -galactosidasas (β -D-galactohidrolasa galactosidasa, EC 3.2.1.23), comúnmente llamadas lactasas. Están ampliamente distribuidas en numerosos sistemas biológicos, por ejemplo, microorganismos, plantas y tejidos animales (Rebroš *et al.* 2006). Los microorganismos que las producen incluyen levaduras, hongos, bacterias y actinomicetes (Zadow 1992).

El mecanismo de acción de las mismas puede variar, dependiendo de diversos factores, pudiendo llevar a cabo una reacción de hidrólisis o de transgalactosilación (Mahoney 1998). Primeramente, se forma un intermedio galactosil-enzima liberando una molécula de glucosa. La enzima luego transfiere el resto de galactosa a un aceptor que contiene un grupo hidroxilo. Este aceptor puede ser agua, produciéndose la hidrólisis, obteniendo como resultado una molécula de glucosa y una de galactosa libres. Sin embargo, el aceptor puede también ser otro carbohidrato, ocurriendo en este caso la transgalactosilación, formándose galacto-oligosacáridos (di-, tri-, o tetrasacáridos) (Burvall *et al.* 1979, Rodríguez Olivenza 2015). En la Figura 2.3. se describe esquemáticamente este proceso.

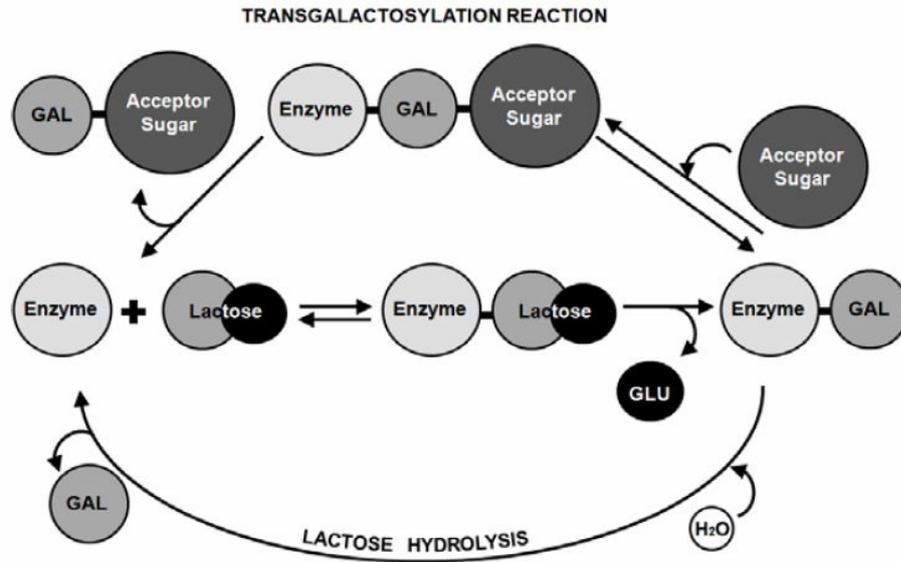


Figura 2.1. Esquema de la hidrólisis y transgalactosilación de la β-Galactosidasa. La ruta inferior representa la hidrólisis de lactosa y la ruta superior la transgalactosilación (Neri 2009).

Los factores que influyen en la producción de uno u otro proceso incluyen la fuente de la enzima, la concentración y la naturaleza del sustrato, el grado de conversión del sustrato y las condiciones de reacción (tiempo, temperatura, pH, presencia de inhibidores o activadores específicos para la enzima) (Raymond 1998, Zárate *et al.* 1990).

En este capítulo se estudiará el desarrollo de cultivos alimentados con diferentes perfiles de inducción como estrategia para mejorar la producción de la poligalacturonasa PGI recombinante. Además, se trabajará sobre la optimización de los costos de dicha producción, mediante el reemplazo de galactosa comercial en el medio de cultivo por galactosa obtenida a partir de la hidrólisis enzimática de lactosa.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Reactivos químicos

Ácido poligalacturónico (APG) y ácido galacturónico monohidrato (AGA) fueron provistos por Sigma Chemical Co. Todos los demás reactivos empleados son de grado analítico y están comercialmente disponibles.

2.2.2. Microorganismo y mantenimiento de la cepa

La cepa que se utilizó en todos los ensayos fue un clon obtenido en nuestro laboratorio de *S. cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen) conteniendo el plásmido *pYES2:pg1ΔI*. El mismo fue denominado internamente clon 2 y fue conservado por periodos de tiempo prolongados mediante congelación a -70°C usando glicerol 15 %, v/v; como crioprotector (Master bank). A partir de las muestras congeladas se hicieron repiques en tubos de ensayo conteniendo SC-Ura agarizado. El SC es un medio sintético sugerido por el fabricante (Invitrogen) para este microorganismo. El medio no contiene uracilo como presión de selección ya que la cepa es auxótrofa para dicho nucleótido y dicha auxotrofia se revierte con la transformación con el pYES. Los cultivos se incubaron a 30 °C hasta crecimiento abundante y se mantuvieron a 4 °C bajo capa de vaselina estéril (Working bank), durante un máximo de 6 meses, tiempo a partir del cual fueron descartados. Previo a cada fermentación se hicieron repiques sobre SC en placa de petri a partir de los cultivos almacenados a 4 °C, y a partir de ellos se prepararon los inóculos líquidos de 100 ml para los distintos ensayos realizados.

2.2.3. Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *S. cerevisiae* INVSc1 fue el SC. Este medio tiene glucosa como FCE, úrea como FN y un hidrolizado proteico como fuente de aminoácidos Amikase (MP). Tanto los componentes mayoritarios del SC como los microelementos y aminoácidos fueron esterilizados en autoclave (15 min, a 121 °C) mientras que las vitaminas y la úrea fueron filtradas a través de membranas de celulosa

(0,22 μm , Osmonics, EE.UU) y se agregaron al resto de los componentes del medio ya esterilizados, previamente a su inoculación. Para los cultivos por lotes se utilizó este medio con 10 g/l de glucosa. Para la alimentación se usó el mismo medio concentrado 5 veces, con 100 g/l de glucosa y una concentración variable de galactosa, proveniente de una solución de lactosa hidrolizada.

Tabla 2.1. Composición del medio SC base.

Componente	Concentración (g/l)
Glucosa (FCE)	20.0
K₂HPO₄	1.0
CaCl₂ · 2H₂O	0.1
NaCl	0.1
MgSO₄ · 7H₂O	0.5
Urea (FN)	3.0
Solución de microelementos	1.0 ml/l
Solución de vitaminas	1.0 ml/l
Solución de aminoácidos	10.0 ml/l
pH	5.0

Tabla 2.2. Composición de vitaminas para el medio SC, solución 1000 x.

Vitaminas	Concentración (g/l)
Biotina	0.02
Pantotenato de calcio	0.4
Ácido fólico	0.002
Inositol	2.0
Ácido nicotínico	0.4
PABA	0.2
Ác .piridoxínico HCl	0.4
Tiamina HCl	0.4
Riboflavina	0.2

Tabla 2.3. Composición de aminoácidos para el medio SC, solución 100 x.

Aminoácido	Concentración (g/l)
Arginina	10.0
Adenina	10.0
Cisteína	10.0
Leucina	10.0
Lisina	10.0
Treonina	10.0
Triptófano	10.0
Ác. aspártico	5.0
Histidina	5.0
Isoleucina	5.0
Metionina	5.0
Fenilalanina	5.0
Prolina	5.0
Serina	5.0
Tirosina	5.0
Valina	5.0

Tabla 2.4. Composición de microelementos para el medio SC, solución 1000 x.

Componente	Concentración (g/l)
Ácido bórico	0.5
Sulfato de cobre	0.04
Ioduro de potasio	0.1
Cloruro férrico	0.2
Sulfato de magnesio	0.4
Molibdato de amonio	0.15
Sulfato de zinc	0.45

2.2.4. Obtención de galactosa a partir de la hidrólisis enzimática de lactosa

Para la reacción de hidrólisis se empleó como enzima una β -galactosidasa comercial llamada Maxilact LG2000. La misma es una formulación de lactasa obtenida de la levadura *Kluyveromyces lactis*. En la Tabla 2.1. se pueden observar los indicadores físicos y químicos de la misma.

Tabla 2.5. Indicadores físicos y químicos de la enzima Maxilact LG2000 (Modificado de Ficha técnica - Prodinvest)

Indicadores	Valores
Actividad - Unidades de lactosa/g	No menor a 2000
Acidez de actividad - pH	6,6 – 7,6
Temperatura de actividad - °C	5 - 40

La actividad enzimática de las lactasas se expresa en LAU, que representa la cantidad de enzima que hidroliza un micromol de lactosa por minuto. Que esta enzima comercial presente actividad a 5 °C es de suma importancia ya que permite realizar la hidrólisis por períodos de tiempo prolongados, a baja temperatura, sin el inconveniente de que se produzcan contaminaciones microbianas.

Los ensayos fueron realizados con lactosa comercial como sustrato. Se hidrolizó una solución al 15% de lactosa con β -galactosidasa y el sistema *buffer* utilizado fue 50 mM KH_2PO_4 – 2,5 mM MgSO_4 – 5 mM MnSO_4 a pH 6,6. El tiempo de reacción fue de 48 hs y la temperatura fue de 5 °C. La reacción de hidrólisis se detuvo por disminución del pH a 4,5 por adición de HCl 2N, a ese valor de pH se produce la inactivación de la enzima. El grado de hidrólisis se determinó midiendo la concentración de glucosa liberada, empleando para ello el kit de reactivos de Wiener Lab para determinación enzimática de glicemia. Además, se midió la concentración de galactosa mediante el uso de un kit enzimático espectrofotométrico (ENZYTEC™).

2.2.5. Cultivos en biorreactor en sistema tipo lote alimentado

Biorreactor y procedimientos del cultivo

Se utilizó un biorreactor de 1,5 l de capacidad máxima (Bioflo 310, New Brunswick-Scientific) (Figura 2.2.). Inicialmente se cultivó *S. cerevisiae* en cultivo tipo *batch* utilizando un volumen de SC (10 g/l de glucosa) de 0,8 l, aproximadamente, agitación constante a una velocidad de 450 rpm, y una aireación de 1 vvm. Después de consumida la FCE, se inició la alimentación/inducción por medio de una bomba peristáltica con glucosa y galactosa como inductor de la producción enzimática, bajo diferentes condiciones de flujo. El pH fue mantenido en 5,5 durante el crecimiento y en 4,5 durante la inducción. El

fermentador cuenta con control automático de pH (con un electrodo de vidrio, Mettler Toledo) y O_2 disuelto (con un electrodo de tipo polarográfico, Mettler Toledo). La agitación se controló en forma automática a fin de mantener el O_2 disuelto por encima de un 30 % de saturación. Tanto el fermentador como el reservorio de alimentación fueron esterilizados en autoclave (15 min, a 121 °C) con el medio de cultivo.



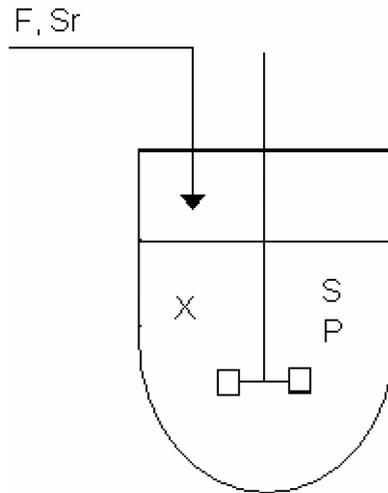
Figura 2.2. Bioflo 310, New Brunswick-Scientific.

Inóculo

En todos los casos el biorreactor fue inoculado a partir de un cultivo en frascos agitados conteniendo 100 ml de SC modificado (con una concentración inicial de 10 g/l de glucosa).

Diseño del sistema lote alimentado y estrategias de inducción

El diseño del cultivo en lote alimentado (concentración de FCE y velocidad de alimentación) fue realizado en estudios previos (Rojas 2009) con base en las ecuaciones derivadas de los balances para biomasa y sustrato. La nomenclatura utilizada se detalla en el diagrama que se muestra a continuación:



donde x y s son las concentraciones de biomasa y sustrato (g/L), respectivamente, S_r es la concentración de FCE en el medio de alimentación (g/L), F es el flujo de alimentación (L/h), V es el volumen del medio (L) y μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

Los ensayos se diseñaron con una estrategia de inducción en la que la galactosa fue alimentada junto con la glucosa del reservorio de alimentación. La idea de esta estrategia se basó en el hecho que, debido a que el microorganismo elige como FCE a aquella que le permite crecer a mayor μ (en este caso la glucosa), la concentración de glucosa en el medio de glucosa en el medio de cultivo durante la alimentación se mantiene en valores muy bajos (del orden de los pocos mg/l) durante la alimentación. De esta forma, el promotor GAL no estaría reprimido, y el gen *pgl* debería ser expresado. Esta estrategia ya fue sugerida en informes anteriores (Rao *et al.* 1998).

Se diseñaron cuatro estrategias diferentes:

1- Inducción directa posterior al *batch*: se realiza una alimentación con 300 ml de SC concentrado 5 veces. La concentración de glucosa y galactosa en dicho medio fue de

100 g/l y 10 g/l respectivamente. El flujo establecido en este caso fue de 8,8 ml/h. Estos valores se tomaron como referencia de trabajos previos del grupo (Rojas *et al.* 2011).

2- Inducción durante la alimentación: Se realizó la inducción manteniendo las condiciones del cultivo anterior, pero aumentando la concentración del inductor a 45 g/l.

3- Inducción luego de una etapa de crecimiento en lote alimentado: En la primera alimentación sólo se alimenta glucosa y no galactosa, por tanto, no hay inducción. Esta alimentación se diseñó teniendo en cuenta parámetros tomados de resultados anteriores del laboratorio (Rojas *et al.* 2011) utilizando las fórmulas de diseño basadas en los balances de acumulación para biomasa y sustrato limitante. La segunda alimentación (inducción) fue con 300 ml de SC concentrado 5 veces. La concentración de glucosa y galactosa en dicho medio fue de 100 g/l y 45 g/l respectivamente, manteniendo las concentraciones del cultivo anterior. El flujo en ambas alimentaciones fue de 26 ml/h.

4- Inducción durante la alimentación: se realiza bajo las mismas condiciones anteriores, con la única diferencia de que en la segunda alimentación se utiliza un flujo más bajo, a la misma velocidad de las estrategias 1 y 2 (ver resultados y discusión).

En todos los casos, se tomaron muestras a intervalos regulares determinando las concentraciones de biomasa, glucosa, galactosa y actividad enzimática.

Toma de muestras líquidas

Cuando fue necesario se tomaron volúmenes de 20 ml de muestra del biorreactor, de los cuales 10 ml se usaron para medir biomasa, y el resto se centrifugó a 9000 g (10 min, a 4 °C). Los sobrenadantes recuperados se guardaron en tubos tipo Eppendorf (1,5 ml) a -18 °C para la realización de las determinaciones analíticas correspondientes.

2.2.6. Medida de la actividad enzimática

Se determinó la actividad de PGI midiendo la liberación de poder reductor utilizando APG como sustrato mediante el siguiente protocolo. Se incubaron 180 µl de sustrato (0,2 % de polímero en BCP pH: 4.0, con 20 µl de muestra enzimática diluida convenientemente a 37 °C durante 30 min (Cavalitto *et al.* 2000, Ferreyra *et al.* 2002). La

reacción se detiene sumergiendo los tubos de reacción en un baño de hielo/agua por 10 min. La concentración de azúcares reductores en las mismas se determinó por Somogyi-Nelson (Somogyi 1952) empleando AGA como patrón. Se agregan 200 μ L de reactivo Somogyi y se lleva a un baño en ebullición por 10 min. Luego se agregan 200 μ L de reactivo Nelson, se agita en vortex vigorosamente y se deja en reposo por 30 min. Finalmente se agregan 1,8 ml de agua desionizada y se lee la A_{660} . La curva de calibración se obtiene a partir de soluciones de AGA en solución de BCP pH: 4.0 en un intervalo de concentraciones desde 50 hasta 300 mg/L. Todas las muestras y estándares fueron tratados de igual manera a partir de la adición del reactivo Somogyi. La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que genera un μ mol de AGA por minuto en las condiciones de reacción establecidas (Cavalitto 1999, Contreras Esquivel 2004).

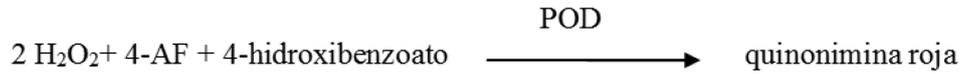
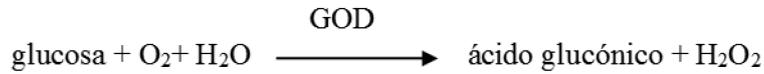
2.2.7. Determinación de biomasa

La concentración de biomasa de los cultivos se determinó por medio de la medida de peso seco. Las determinaciones de peso seco se realizaron por centrifugación a 5000 g de 10 ml de muestra de cultivo luego de lo cual la biomasa precipitada fue lavada y secada en estufa a 105°C hasta peso constante (García-Garibay 1987).

2.2.8. Determinación de glucosa

La glucosa fue determinada tanto para medir el grado de hidrólisis enzimática de la lactosa como para determinar la concentración de la fuente de carbono durante los cultivos. Esta determinación se realizó mediante el método enzimático de glucosa oxidasa-peroxidasa (Wiener Lab., Argentina), midiendo la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro y comparando con un estándar (Bergmeyer y Bernt 1974).

El esquema de la reacción colorimétrica es el siguiente:



donde:

GOD: glucosa-oxidasa

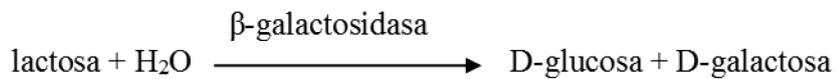
POD: peroxidasa

4-AF: 4-aminofenazona

2.2.9. Determinación de galactosa

La concentración de galactosa se midió tanto para evaluar el grado de hidrólisis enzimática de la lactosa como para determinar su contenido a lo largo de los cultivos. Se cuantificó mediante el método enzimático espectrofotométrico (ENZYTEC™) que lee la absorbancia del NADH en el espectro ultravioleta a 340 nm (Beutler 1984).

El esquema de la reacción colorimétrica es el siguiente:



2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Obtención de galactosa a partir de la hidrólisis enzimática de lactosa

A partir de la hidrólisis enzimática de una solución al 15% de lactosa se obtuvieron los siguientes productos: 50% de glucosa, 45% de galactosa y 5% de oligosacáridos. Se comprobó que la reacción se completó en promedio en un 96%. Los resultados fueron los esperados, ya que se manipularon las condiciones de reacción con el objetivo de obtener una alta proporción de galactosa (alta relación galactosa/glucosa) y una baja producción de oligosacáridos. Diferentes publicaciones coinciden con que el rango de producción de oligosacáridos durante la hidrólisis de la lactosa puede variar entre 1-45% del azúcar total presente (Mahoney 1998, Rabiú *et al.* 2001, Zárate y López-Leiva 1990). Por lo tanto, la obtención de un 5% de oligosacáridos coincide con los valores más bajos posibles de conseguir.

Este resultado es razonable teniendo en cuenta las condiciones de reacción utilizadas. Como ya hemos mencionado, el factor más importante para favorecer la actividad hidrolítica de la β -galactosidasa en vez de la transglicosilación es la concentración inicial de lactosa en el medio. Se han reportado los más altos niveles de producción de oligosacáridos utilizando niveles de lactosa de partida de entre 15-50% (Raymond 1998). En este caso los ensayos se realizaron con soluciones con 15% de lactosa. La justificación es que con soluciones con baja concentración de lactosa el aceptor durante la reacción es el agua por lo que se favorecerá la hidrólisis con la consecuente formación de galactosa y glucosa (Zhou y Chen 2001, Rustom 1998). La actividad enzimática de transglicosilación aumenta con mayores concentraciones de lactosa inicial, con la consecuente obtención de mayores cantidades de oligosacáridos (Hansson *et al.* 2001).

Además, al utilizar temperaturas (5 °C) por debajo de la óptima de trabajo de la enzima (37 °C), produce que la actividad de la misma disminuya entre 5-10 veces. Por lo tanto, para conseguir la actividad deseada, se debe aumentar la concentración de la enzima y prolongar el tiempo de hidrólisis (Karasová 2002). Aplicando tiempos de reacción extendidos se favorecen niveles bajos de oligosacáridos residuales, y relaciones entre galactosa/glucosa cercanas a 1 (Raymond 1998). Por ese motivo, los ensayos de hidrólisis de lactosa se llevaron a cabo por períodos de 48 horas.

La condición de reacción utilizada: *buffer* 50 mM KH_2PO_4 – 2,5 mM MgSO_4 – 5 mM MnSO_4 , fue tomada de Jurado *et al.*, quienes reportan que la presencia de iones Mn^{2+} activa específicamente a la enzima β -galactosidasa aislada de la levadura *Kluyveromyces lactis* (Jurado *et al.* 2002).

Una vez obtenida la solución de galactosa/glucosa mediante la hidrólisis de la lactosa, se la aplicó a los sistemas lote alimentados para producción enzimática. Con los resultados obtenidos se logró cumplir con el objetivo de optimizar los costos de producción de la poligalacturonasa PGI recombinante, debido a que mediante el reemplazo de galactosa comercial en el medio de cultivo por galactosa obtenida a partir de la hidrólisis enzimática de lactosa se obtuvieron muy buenos crecimientos de *S. cerevisiae* y producciones enzimáticas, a un menor costo.

2.3.2. Producción de PGI recombinante en sistema de cultivo tipo lote alimentado

Estrategia 1

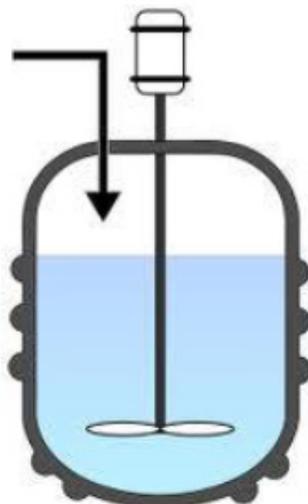
Batch: 800 ml de medio SC con 10 g/l de glucosa 24 horas

Alimentación: 300 ml de SC 5x

8.8 ml/h

10 g/l galactosa

100 g/l glucosa



Volúmen final: 720 ml

En este cultivo semicontinuo se realiza una alimentación con glucosa y galactosa (fases de crecimiento y de inducción simultáneas) pretendiendo que, durante la fase de crecimiento, la glucosa se utiliza como FCE y, por lo tanto, su concentración se vuelve casi insignificante durante todo el cultivo. De este modo, se evita que el promotor de galactosa se reprima y que el gen PGI puede expresarse obteniéndose una actividad enzimática considerable (Nam *et al.* 1993). Los resultados del cultivo se muestran en las Tabla 2.6. y 2.7. y en las Figuras 2.3. y 2.4.

Tabla 2.6. Resultados experimentales cultivo 1

Muestra	Hora	Actividad (U/ml)	Galactosa (g/L)	Glucosa (g/L)	pH
1	0	3,72	0,000	0,896	-
2	1,67	2,55	0,283	0,030	-
3	4,83	3,55	0,487	0,113	4,13
4	19,5	13,84	0,123	0,020	3,66
5	22	16,14	0,130	0,016	3,95
6	25,5	19,49	0,108	0,011	4,05
7	27,5	21,03	0,000	0,015	4,05
8	29,5	27,05	0,020	0,012	4,04

Tabla 2.7. Resultados analíticos cultivo 1

Variables Calculadas	Resultados
Volúmen final (ml)	720
Caudal de alimentación (ml/h)	7,9
Productividad (U/ml.h)	0,917

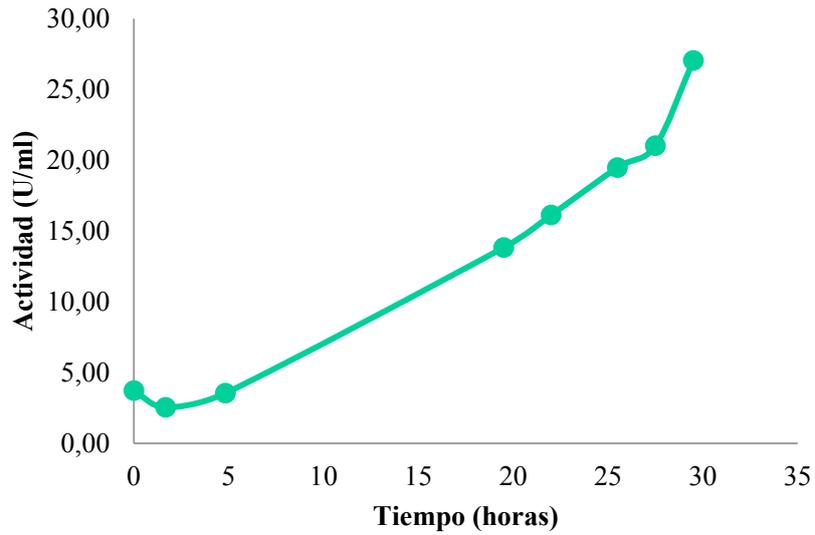


Figura 2.3. Actividad enzimática del cultivo 1.

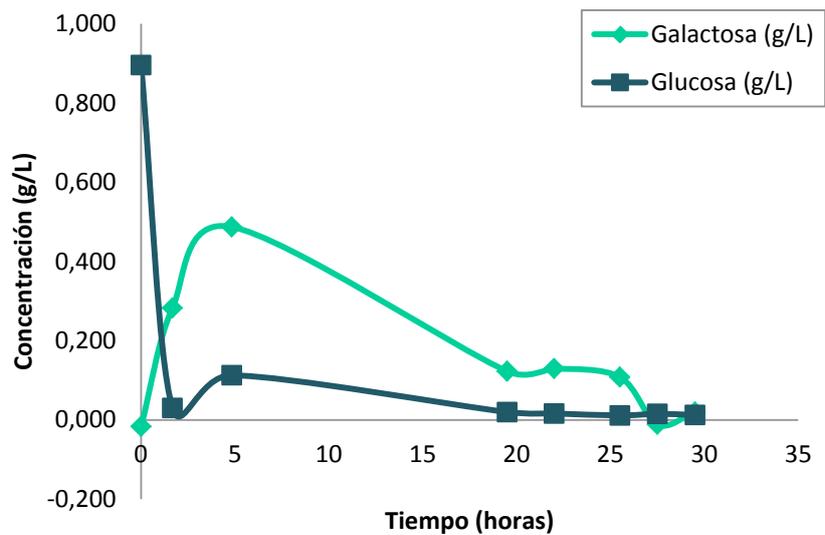


Figura 2.4. Concentración de glucosa y galactosa determinadas en el cultivo 1.

Se puede observar que se obtiene una concentración de glucosa muy baja durante casi toda la etapa de inducción. Además, en el gráfico se aprecia que la concentración de galactosa también es baja, lo que indica que, aunque en menor medida, es usada por la levadura como FCE, además de como inductor. La expresión proteica no se encuentra inhibida demostrando un excelente comportamiento, obteniendo un valor final de 27 U/ml,

el cual es 10 veces mayor que el que puede obtenerse en un cultivo inducido por pulsos únicos de galactosa (Rojas 2011).

Estrategia 2

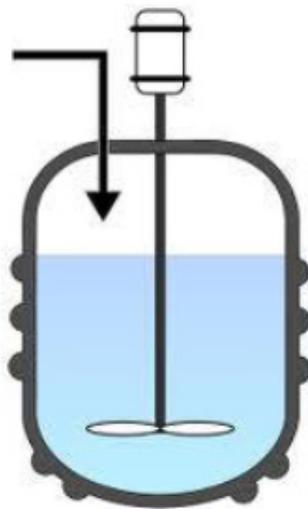
Batch: 800 ml de medio SC con 10 g/l de glucosa 19 horas

Alimentación: 300 ml de SC 5x

8.8 ml/h

45 g/l galactosa

100 g/l glucosa



Volúmen final: 720 ml

En este cultivo se realiza el mismo procedimiento que en el cultivo 1, pero con una concentración de galactosa en el medio de alimentación considerablemente mayor. Se espera obtener de esta forma una concentración mayor de enzima, al tener una mayor inducción. Los resultados del cultivo se muestran en las Tablas 2.8. y 2.9. y en las Figuras 2.5. y 2.6.

Tabla 2.8. Resultados experimentales cultivo 2

Muestra	Hora	Actividad (U/ml)	Galactosa (g/L)	Glucosa (g/L)	pH
1	inicio <i>batch</i>	-	-	-	4.13
2	0	1,52	-	0,005	4.30
3	0,7	1,46	0,388	0,126	4.54
4	2,12	3,52	0,713	0,010	4.55
5	3,75	5,75	2,018	0,007	4.57
6	6,75	7,87	3,102	0,004	4.64
7	9,6	10,56	3,355	0,006	4.70
8	12,75	15,76	3,813	0,006	4.87
9	21,92	41,01	1,660	0,006	4.89
10	26,08	46,81	0,794	0,004	4.84
11	30,57	59,31	-	0,004	4.82
12	32,58	66,90	0,528	-	4.77

Tabla 2.9. Resultados analíticos cultivo 2

Variables Calculadas	Resultados
Volúmen final (ml)	720
Caudal de alimentación (ml/h)	8,8
Productividad (U/ml.h)	2,053

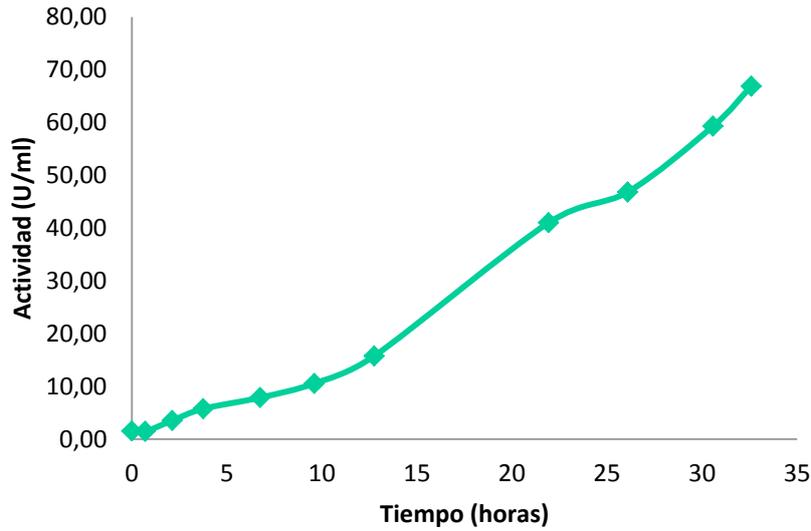


Figura 2.5. Actividad enzimática del cultivo 2.

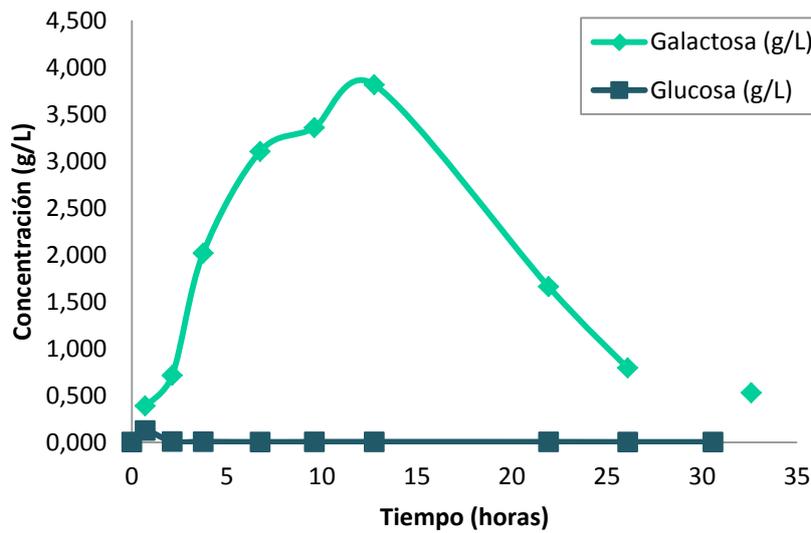


Figura 2.6. Concentración de glucosa y galactosa determinadas en el cultivo 2.

En este cultivo se observa de nuevo una concentración mínima de glucosa durante toda la inducción, lo cual implica que no hay inhibición de la expresión. La concentración de galactosa en este cultivo alcanza niveles significativos, lo cual era de esperarse debido a que se alimenta con una cantidad mayor, pero sorpresivamente esta concentración baja al final de la alimentación, lo que implica que de nuevo el microorganismo está usándola como FCE. La actividad obtenida en este cultivo es de 67 U/ml, lo que significa un aumento considerable con respecto al cultivo anterior y por supuesto, a los cultivos por lotes.

Estrategia 3

En este cultivo se realizan dos etapas de alimentación en lugar de una. En la primera solo se alimenta con glucosa y no con galactosa, por lo tanto, no hay inducción. El objetivo de esta etapa es obtener una concentración de biomasa mayor al momento de empezar la inducción, de esta manera se esperaría poder obtener una actividad enzimática final más elevada.

En base a los resultados de biomasa obtenidos en el cultivo *batch* de la estrategia 2 y utilizando las Ecuaciones de diseño 2.1. y 2.2. basadas en los balances de acumulación de biomasa y sustrato, se diseñó un lote alimentado previo a la inducción a fin de incrementar el valor de la biomasa antes de la inducción.

$$S_r = \frac{X_f \cdot V_f - X_0 \cdot V_0}{Y_{X/S} \cdot (V_f - V_0)} \quad \text{Ecuación 2.1.}$$

$$F = \frac{\mu_0 \cdot X_0 \cdot V_0}{Y_{X/S} \cdot S_r} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

donde S_r es la concentración de FCE en el medio de alimentación. X_0 , X_f , son las concentraciones de biomasa inicial y final, respectivamente. V_0 y V_f , es el volumen del medio inicial y final, respectivamente. μ_0 es la velocidad específica de crecimiento inicial y $Y_{X/S}$ es el rendimiento de biomasa. μ_0 y X_f fueron valores definidos arbitrariamente para cada experimento.

Teniendo en cuenta los siguientes datos de operación: $V_0 = 800$ ml, $V_f = 1100$ ml, $X_0 = 3$ g/l, un rendimiento de 0,3 cmol/cmol, un $\mu_0 = 0,28$ h⁻¹ y una biomasa final deseada de 10 g/l, se obtuvieron los valores de diseño de: $S_r = 96$ g/l y un $F = 20,8$ ml/h. Por fines de redondeo de números, se utilizó un S_r de 100 g/l y un F de 20 ml/h.

En base a estos resultados, se decidió realizar la segunda alimentación con el mismo medio del experimento 2 (100 g/l de glucosa y 45 g/l de galactosa) y se incrementó el flujo al triple que en el experimento anterior (26 ml/h) para mantener la relación de flujo a biomasa inicial de la etapa de inducción.

Batch: 800 ml de medio SC con 10 g/l de glucosa 23 horas

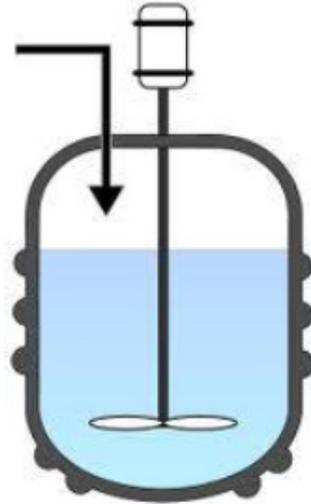
Alimentación 1: 300 ml de SC 5x con 100 g/l de glucosa (20 ml/h)

Alimentación 2: 300 ml de SC 5x con 100 g/l de glucosa y 45 g/l de galactosa (26 ml/h)

26 ml/h

45 g/l galactosa

100 g/l glucosa



Volúmen final: 1200 ml

Los resultados del cultivo se muestran en las Tablas 2.10. y 2.11. y en las Figuras 2.7. y 2.8.

Tabla 2.10. Resultados experimentales cultivo 3

Muestra	Hora	Actividad (U/ml)	Galactosa (g/L)	Glucosa (g/L)	pH
1	inicio del <i>batch</i>	-	-	-	4,89
2	0	-	-	0,007	5,36
3	0	2,43	0,000	0,282	5,30
4	0,5	2,92	0,000	0,318	5,35
5	1	3,31	2,208	0,344	5,30
6	3,92	5,90	2,877	0,315	5,36
7	6,08	14,00	3,558	0,140	4,70
8	8,03	14,34	3,760	0,127	4,70
10	11,17	14,65	3,831	0,094	4,70

Tabla 2.11. Resultados analíticos cultivo 3

Variables Calculadas	Resultados
Volúmen final (ml)	1200
Caudal de alimentación (ml/h)	26
Productividad (U/ml.h)	1,347

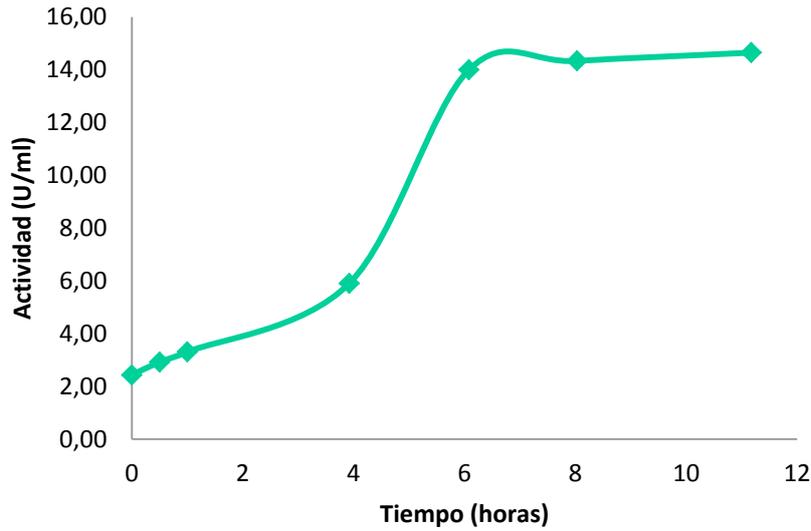


Figura 2.7. Actividad enzimática del cultivo 3.

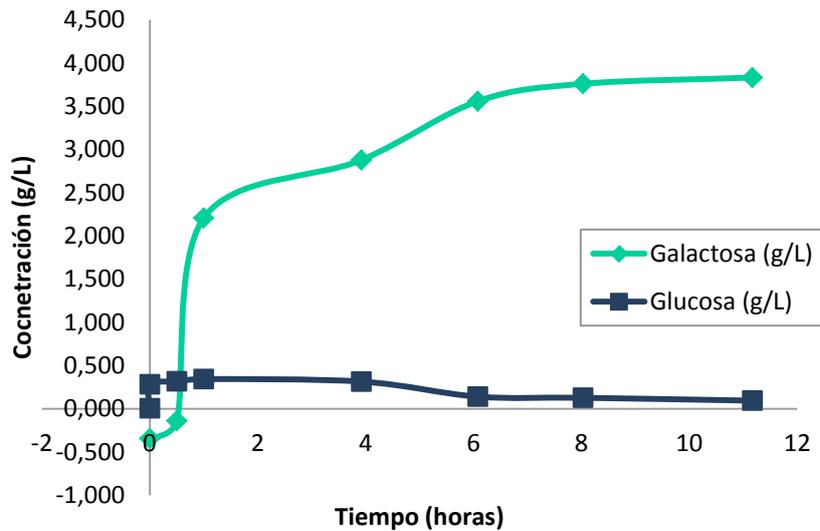


Figura 2.8. Concentración de glucosa y galactosa determinadas en el cultivo 3.

Se observa que la concentración de galactosa va aumentando durante la alimentación, y no se reduce como en los cultivos anteriores, lo cual puede deberse a la velocidad a la cual ingresa la misma durante la alimentación. Lo mismo ocurre con la concentración de glucosa, si bien se mantiene en valores bajos durante todo el cultivo, no son tan bajos como en los cultivos anteriores, por lo que la misma alcanza para no permitir la normal activación del promotor GAL1 con lo que la actividad final obtenida es de tan solo 15 U/ml. Para

comprobar si realmente la velocidad de alimentación, relativamente alta, es la causante de la disminución de la actividad expresada, se diseñó la estrategia 4.

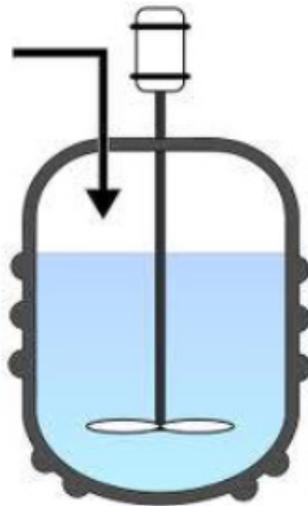
Estrategia 4

Batch: 800 ml de medio SC con 10 g/l de glucosa 22.5 horas

Alimentación 1: 300 ml de SC 5x con 100 g/l de glucosa (20 ml/h)

Alimentación 2: 300 ml de SC 5x con 100 g/l de glucosa y 45 g/l de galactosa (8.8 ml/h)

26 ml/h
45 g/l galactosa
100 g/l glucosa



Volúmen final: 1020 ml

Este cultivo se realiza bajo las mismas condiciones del cultivo anterior, con la única diferencia de que la segunda alimentación se realiza de manera más paulatina. El flujo utilizado es el mismo que en los cultivos 1 y 2. Los resultados del cultivo se muestran en las Tablas 2.12. y 2.13 y en las Figuras 2.9. y 2.10.

Tabla 2.12. Resultados experimentales cultivo 4

Muestra	Hora	Actividad (U/ml)	Galactosa (g/L)	Glucosa (g/L)	pH
1	Inicio del <i>batch</i>	-	-	-	4,3
2	-	-	-	0,000	
3	0	2,82	0,000	0,005	4,54
4	0,35	3,23	-0,021	0,004	4,55
5	1,8	3,79	0,623	0,006	4,57
6	3,35	4,64	0,722	0,009	4,64
7	6,25	9,74	0,319	0,012	4,87
8	9,58	12,86	1,354	0,016	4,84
9	13,33	20,13	0,060	0,014	4,82
10	22,83	51,40	0,461	0,016	4,77
11	25,7	48,66	0,528	0,009	4,76
12	28,63	63,16	1,393	0,014	4,75
13	32,37	77,54	-0,106	0,007	4,75

Tabla 2.13. Resultados analíticos cultivo 4

Variables Calculadas	Resultados
Volúmen final (ml)	1020
Caudal de alimentación (ml/h)	8,8
Productividad (U/ml.h)	2,395

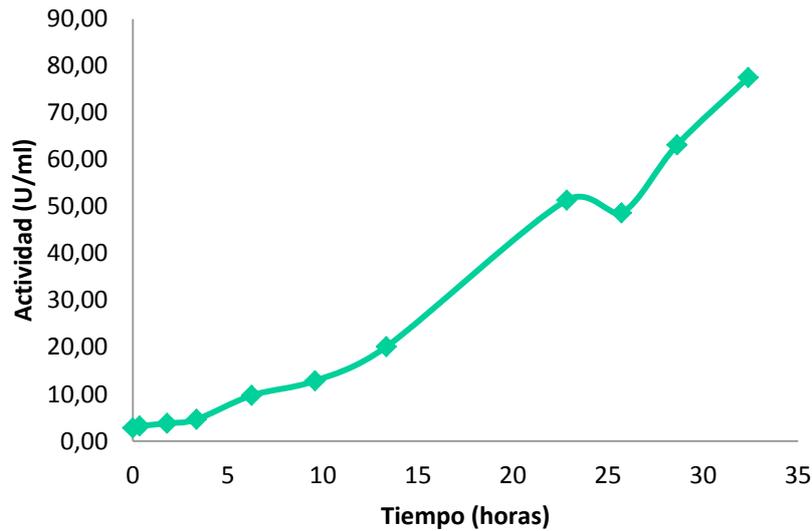


Figura 2.9. Actividad enzimática del cultivo 4.

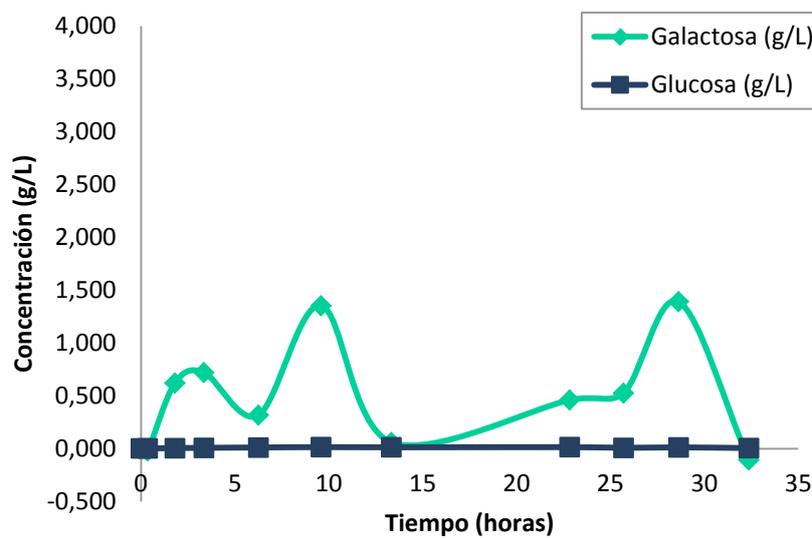


Figura 2.10. Concentración de glucosa y galactosa determinadas en el cultivo 4.

En este caso se observa una actividad enzimática final de 77 U/ml, la cual es mayor que las obtenidas hasta el momento, y en particular, considerablemente mayor que la obtenida en el cultivo anterior. Esto implica que la velocidad de alimentación y, por tanto, la acumulación de glucosa afectan significativamente la producción enzimática. En este caso, además se observa una concentración de galactosa más baja que en el cultivo anterior. Esto demuestra que al ser alimentada de manera más lenta el microorganismo es capaz de consumirla, como en los cultivos 1 y 2.

Tabla 2.14. Resultados consolidados.

Cultivo	Condiciones	Actividad Final (U/ml)	Productividad (U/ml.h)
1	10 GAL - 100 GLU	27.1	0.92
2	45 GAL - 100 GLU	66.9	2.05
3	45 GAL - 100 GLU	14.6	1.35
4	45 GAL - 100 GLU	77.5	2.40

En la Tabla 2.14. se observan los resultados consolidados. Se puede apreciar que la mejor actividad enzimática se obtuvo en el cultivo 4, como así también la mejor productividad.

Cabe destacar que la proteína silvestre generada por *A. kawachii* en este mismo medio en frascos agitados alcanzaba apenas una actividad enzimática de 28 mU/ml (Contreras Esquivel 2003). Además, la cepa recombinante en frascos agitados y en sistema *batch* en reactor con este mismo medio y con una estrategia de inducción por pulso de galactosa presentó una actividad de aproximadamente 1,8 U/ml y 3 U/ml, respectivamente. En estudios realizados en cultivos lote alimentados, con una inducción de un pulso simple y un pulso doble de galactosa se logró obtener 12,2 U/ml y 16 U/ml, respectivamente. Y por último, estudios similares a los ensayos en este trabajo donde se realizó la producción de PGI recombinante en cultivos lote alimentados con alimentación e inducción administradas simultáneamente (100 g/l glucosa – 100 g/l galactosa) se logró obtener una actividad enzimática de 50 U/ml (Rojas *et. al* 2011). Todos estos valores de actividad enzimática son inferiores a los conseguidos con la estrategia planteada en el cultivo 4. Este resultado representa una gran mejora con respecto a los resultados anteriormente obtenidos en el laboratorio.

2.4. CONCLUSIONES

Los procedimientos de producción de proteínas recombinantes se utilizan ampliamente hoy en día. Sin embargo, a la hora de aumentar de escala se presentan algunos inconvenientes debido a que la expresión de los genes codificados en el ADN foráneo origina un gran estrés metabólico en los microorganismos modificados (Copella y Dhurjati 1989, Alexander y Jeffries 1990). Por lo tanto, es sumamente importante estudiar el efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento de las levaduras recombinantes y la producción de dichas enzimas.

En el presente capítulo se determinó que, de las cuatro estrategias diseñadas, de inducción durante la alimentación, con el cultivo de *S. cerevisiae* INVSc1 en lote alimentado con una estrategia de alimentación en dos etapas y un flujo bajo en la segunda alimentación (cultivo 4) se obtuvo la mejor actividad enzimática, como así también la mejor productividad.

Realizar la inducción junto con la alimentación utilizando cultivos semicontinuos nos permitió mantener la concentración de glucosa en el reactor prácticamente cercana a cero en el medio. De esta forma, el promotor GAL no se encuentra reprimido, y el gen *pgl* se expresa favoreciendo la producción enzimática.

Analizando los resultados obtenidos durante las cuatro estrategias de alimentación diseñadas, se pudieron alcanzar diversas conclusiones:

- El microorganismo es capaz de utilizar a la galactosa, si esta es alimentada lentamente, además de como inductor, como FCE en conjunto con la glucosa.
- El flujo al que se alimenta la galactosa tiene una influencia significativa en la producción de la enzima.
- El aumento en la concentración de biomasa no genera un efecto proporcional en la producción enzimática.

Por otra parte, otro resultado sumamente importante fue lograr obtener una alta proporción de galactosa a partir de la hidrólisis de lactosa con una β -galactosidasa comercial con lo que se consiguió reducir los costos de producción de la expresión de la enzima reemplazando del medio de cultivo la galactosa comercial por la obtenida por hidrólisis enzimática. Todos los ensayos fueron realizados de esta manera, obteniéndose excelentes resultados tanto de crecimiento de *S. cerevisiae* como de producción enzimática.

Estos avances sugieren la posibilidad de utilizar la PGI recombinante en procesos biotecnológicos a nivel industrial, ya que se consiguió producir grandes cantidades de enzima, se logró consumir y aprovechar al máximo los sustratos (glucosa, lactosa y galactosa) que representan el mayor costo en la producción por parte del fabricante y se optimizó una estrategia de regulación de expresión del gen específico en un sistema de fermentación de tipo lote alimentado.

2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M. A., & Jeffries, T. W. (1990). Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts. *Enzyme and microbial technology*, 12(1), 2-19.
- Beltran, L. J., & Acosta, A. (2012). Empleo de una β -galactosidasa comercial de *Kluyveromyces lactis* en la hidrólisis de lactosuero. *Hechos Microbiol.*, 3(2); 25-35.
- Bergmeyer, H. U., & Bernt, E. (1974). D-glucose determination with glucose oxidase and peroxidase. In "Methods of enzymatic analysis. Vol. 3. (Ed HU Bergmeyer) pp. 1205-1215.
- Beutler, H. O. (1984). Lactose and D-galactose: UV method. *Methods of enzymatic analysis*, 6, 104-112.
- Burvall, A., Asp, N. G., & Dahllqvist, A. (1979). Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis lactase* (MaxilactR): part 1—quantitative aspects. *Food Chemistry*, 4(4), 243-250.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A., & Mignone, C. F. (1999). Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnology techniques*, 13(6), 385-390.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A., & Mignone, C. F. (2000). Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(5), 260-265.
- Contreras Esquivel, J. C. (2003). Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina).
- Esquivel, J. C., & Voget, C. E. (2004). Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal of Biotechnology*, 110(1), 21-28.
- Copella, S. J., & Dhurjati, P. (1989). A detailed analysis of *Saccharomyces cerevisiae* growth kinetics in batch, fed-batch and hollow-fibre bioreactors. *Chem. Eng. J*, 41, 27-35.

- Da Silva, N. A., & Bailey, J. E. (1989). Effects of inducer concentration on GAL regulated cloned gene expression in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of*
- Da Silva, N. A., & Bailey, J. E. (1991). Influence of plasmid origin and promoter strength in fermentations of recombinant yeast. *Biotechnology and bioengineering*, 37(4), 318-324.
- Ferreira, O. A., Cavalitto, S. F., Hours, R. A., & Ertola, R. J. (2002). Influence of trace elements on enzyme production: protopectinase expression by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Enzyme and microbial technology*, 31(4), 498-504.
- García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., & Bárzana, E. (1987). Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology letters*, 9(6), 411-416.
- Hansson, T., Andersson, M., Wehtje, E., & Adlercreutz, P. (2001). Influence of water activity on the competition between β -glycosidase-catalysed transglycosylation and hydrolysis in aqueous hexanol. *Enzyme and microbial technology*, 29(8), 527-534.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzon, G., & Vicaria, J. M. (2002). A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(3), 300-309.
- Kappeli, O. (1986). Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv Microb Physiol*, 28, 181-209.
- Karasova, P., Spiwok, V., Mala, S., Kralova, B., & Russell, N. J. (2002). Beta-galactosidase activity in psychrotrophic microorganisms and their potential use in food industry. *Czech journal of food sciences*, 20(2), 43-47.
- Ladero, M., Perez, M. T., Santos, A., & Garcia-Ochoa, F. (2003). Hydrolysis of lactose by free and immobilized β -galactosidase from *Thermus sp.* strain T2. *Biotechnology and bioengineering*, 81(2), 241-252.
- Mahoney, R. R. (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food chemistry*, 63(2), 147-154.
- Mendoza-Vega, O., Sabatie, J., & Brown, S. W. (1994). Industrial production of heterologous proteins by fed-batch cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 15(4), 369-410.

- Nam, S. W., Seo, D. J., Rhee, S. K., Park, Y. H., & Chung, B. H. (1993). Effect of galactose and dextrose on human lipocortin I expression in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carring galactose-regulated expression system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 3(3), 168-173.
- Neri, D. F., Balcão, V. M., Costa, R. S., Rocha, I. C., Ferreira, E. M., Torres, D. P., Rodrigues, L. R., Carvalho, Jr. L. B. & Teixeira, J. A. (2009). Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry*, 115(1), 92-99.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W. A., & Van Dijken, J. P. (1989). Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 55(2), 468-477.
- Rabiu, B. A., Jay, A. J., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2001). Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by β -Galactosidases from Bifidobacterium Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2526-2530.
- Rao, K. J., Kim, C. H., Chung, B. H., Sohn, J. H., & Rhee, S. K. (1998). Effect of galactose feeding on the improved production of hirudin in fed-batch cultures of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Engineering*, 19(5), 385-388.
- Rebroš, M., Rosenberg, M., Mlichová, Z., & Paluch, M. (2006). A simple entrapment of glucoamylase into LentiKats® as an efficient catalyst for maltodextrin hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 800-804.
- Rodríguez Olivenza, D. (2015). Estudio de la síntesis de GOS por la β -galactosidasa de "*Kluyveromyces lactis*". Máster en Biotecnología Avanzada Universidade da Coruña.
- Rojas, N. L. (2009). Enzimas fúngicas extremófilas de aplicación biotecnológica: producción y caracterización de ramnosidasas alcalofílicas de *Acremonium murorum* y *Acrostalagmus luteo-albus* y poligalacturonasa acidofílica de *Aspergillus kawachii* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina).
- Rojas, N. L., Ortiz, G. E., Chesini, M., Baruque, D. J., & Cavalitto, S. F. (2011). Optimization of the production of polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*

cloned in *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 49(3), 316-321.

Rosenberg, Z. M. M. (2006). Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45(2), 47-54.

Rustom, I. Y., Foda, M. I., & Lopez-Leiva, M. H. (1998). Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis—analysis of factors. *Food chemistry*, 62(2), 141-147.

Santos, A., Ladero, M., & Garcia-Ochoa, F. (1998). Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(7), 558-567.

Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of biological chemistry*, 195(1), 19-23.

Zadow, J. (1992). Whey and lactose processing. *Elsevier Applied Sciences*. 489. 1-8516-6753-9.

Zarate, S. and Lopez-Leiva, M. H. (1990) Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review. *Journal of Food Protection* 53(3), 262-268.

Zhou, Q. Z., & Chen, X. D. (2001). Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *Journal of food engineering*, 48(1), 69-74.

CAPITULO 3

**EXTRACCIÓN DE PECTINA A PARTIR DE TEJIDOS DE MANZANA Y PERA:
APLICACIÓN DE PGI DE *A. kawachii*, PPASA-SE DE *G. klebahnii* Y PGZYME DE
A. sojae.**

RESUMEN

El estudio consistió inicialmente en evaluar, mediante extracción química, el contenido de pectina en distintas variedades de manzanas (Gala, Red Delicious, Granny Smith y Pink Lady), peras (Williams, Red D'anjou y Winter Bartlett) y membrillo (Smyrna) de producción regional. El contenido de pectina determinado, en el caso de las manzanas, fue de 0,07 - 0,40% CaP para la variedad Gala; 0,21 - 0,52% CaP para Red Delicious; 0,58 - 0,95% CaP para Granny Smith y 0,32 - 0,50% CaP para Pink Lady. En cuanto a las peras, el contenido de pectina fue de 0,19 - 0,53% CaP para la variedad Williams; 0,37 - 0,59% CaP para Red D'anjou y 0,03 - 0,45% CaP para Winter Bartlett. Para los membrillos, el contenido de pectina fue de 0,65 - 0,94% CaP. Además, se investigó el índice de madurez de la fruta para establecer posibles correlaciones entre éste y la cantidad de pectina encontrada. Para determinar dicho índice se analizó la acidez y los sólidos solubles. En todos los casos se observó que el contenido de pectina va disminuyendo a medida que el índice de madurez aumenta. Se estableció continuar con los análisis de extracción enzimática de pectina por las enzimas de *A. kawachii*, de *G. klebahnii* y de *A. sojae* sobre las variedades de fruta que resultaron con mayor contenido y que fueron más convenientes a la hora de conseguirlas en el mercado (manzana Granny Smith y pera Winter Bartlett). Para evaluar el rendimiento del proceso, se compararon los rendimientos obtenidos con las enzimas en estudio con los obtenidos por tres pectinasas comerciales y con el obtenido por medio de la extracción química. Las enzimas estudiadas se comportaron de igual o mejor forma que las comerciales y se observó que PGI posee mejor capacidad para la extracción de pectina, extrayendo en manzanas un 25%, un 40% y un 60% más que la extracción química, PPasaSE y PGzyme, respectivamente. Y en peras extrajo un 80% más que en la extracción química y que con ambas enzimas. Por último, se caracterizó parcialmente la pectina extraída; mostrando un GE > 50% (pectinas de HM). En cuanto al contenido de ácidos urónicos (principalmente AGA) en el MIE sólo pudo determinarse en el caso de la enzima PGI resultando en aproximadamente 70 y 50% en manzanas y peras, respectivamente. De acuerdo con estos resultados, se puso de manifiesto que estos frutos podrían ser un buen sustrato para la extracción de pectina con distintos fines; y que PGI podría ser utilizada perfectamente para dicha extracción, convirtiendo lo que hoy son considerados residuos, en subproductos de la industria de la fruta.

3.1. INTRODUCCIÓN

El Alto Valle de Río Negro es una zona frutícola por excelencia. Las manzanas y las peras de la zona son ya una marca registrada en el mundo de las frutas. La producción de membrillos es de menor escala, realizándose su industrialización en forma accesoria. El análisis porcentual de la superficie productiva de la provincia de Río Negro indica que de las 43.430 hectáreas el 48,2% corresponde a peras; el 45,2% corresponde a manzanas, el 2,6% corresponde a duraznos; el 2,04% corresponde a ciruelas; el 0,88% corresponde a cerezas; el 0,95% corresponde a pelón y el 0,13% corresponde a membrillos (SENASA 2011). Así mismo, existe toda una rama de industrias relacionadas como sidreras, jugueras, galpones de empaque y fábricas de dulces. Estas industrias generan grandes cantidades de subproductos durante el procesamiento de la fruta que podrían ser reutilizados para una posterior extracción de pectina.

Las pectinas son polisacáridos de origen vegetal presentes en las paredes celulares de todas las plantas. Por su óptima capacidad de gelificación, la pectina es uno de los principales responsables de la textura de los productos vegetales y la viscosidad de sus jugos. Tiene un gran interés tecnológico para el sector alimentario. Se usa como agente gelificante, espesante, emulgente y estabilizante. Se emplea en la elaboración de mermeladas, jaleas y confituras, frutas en conserva, productos de panadería y pastelería, bebidas y otros alimentos. También se utiliza como substitutivo de grasas o azúcares en productos bajos en calorías (Yuste y Garza 2003). Por otra parte, la pectina presenta una variedad de actividades farmacológicas: inmunoestimulación, actividad anti-metastásica, anti-ulcerosa y anti-necrótica, etc. (McCleary 1986, Yamada 1994). Además, existen muchas evidencias de que los suplementos dietéticos con pectina pueden reducir los niveles de colesterol sérico total, disminuir el colesterol de lipoproteínas de baja densidad, y moderar el nivel de glucosa (Baker 1994, Reiser 1987).

El proceso de extracción consiste en dos fases. La primera es la despolimerización restringida de la protopectina (material insoluble en agua) con su consiguiente conversión en pectina (material soluble en agua). La segunda fase de la extracción consiste en la difusión de la pectina solubilizada desde la matriz del tejido hacia la solución extractante. Generalmente, se realiza mediante procesos fisicoquímicos a partir de frutos (principalmente cítricos y manzanas). Este proceso es el principal y más utilizado en las industrias. Sin embargo, los métodos fisicoquímicos tienen la desventaja de manejar ácidos fuertes y altas temperaturas (Contreras Esquivel *et al.* 1997, Koubala *et al.* 2008). Las

enzimas pectinolíticas tienen la capacidad de degradar las pectinas; estas podrían ser utilizadas como un método alternativo de extracción de pectina a partir de subproductos de la industria de la fruta (Nakamura *et al.* 1995).

La producción industrial de pectina se encuentra concentrada en países europeos, principalmente Alemania e Inglaterra, donde hay plantas que producen más de 8.000 toneladas al año (Zapata Zapata 2008). En Argentina no existe una producción significativa de pectina, siendo en su mayoría importada, haciendo de éste un componente fuerte que aumenta los costos de producción.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se vuelve relevante para el país el estudio de la extracción enzimática de pectina, ofreciendo de esta manera una alternativa para el aprovechamiento de los residuos de frutas a través de tratamientos biotecnológicos innovadores y de bajo impacto ambiental.

En éste capítulo, se estudió la posibilidad de reutilizar los grandes volúmenes de subproductos que generan las industrias frutícolas del Alto Valle de Río Negro para una posterior extracción de pectina con el objetivo de ampliar la gama de productos de alto valor agregado de la oferta local. Considerando que, si bien existían datos bibliográficos respecto del contenido de pectina de diversos frutos, pero no estudios referentes a la evaluación del contenido de pectina de los frutos de producción local, en principio se pensó en evaluar el contenido de pectina de diversas variedades de manzanas, peras y membrillos regionales. Manzanas y peras, debido a la importancia que tiene su producción en el Alto Valle de Río Negro, y membrillos debido a su alto contenido de pectina en su composición. Una vez determinadas cuales eran las variedades de fruta más convenientes para la extracción de pectina, se analizó la aplicación de las enzimas de *A. kawachii*, de *G. klebahnii* y de *A. sojae* en la extracción de pectina sobre dichas variedades. Posteriormente fue posible evaluar el rendimiento del proceso de extracción comparándolo con el proceso de extracción química tradicional y con la extracción enzimática utilizando enzimas comerciales. Por último, la pectina extraída fue parcialmente caracteriza por determinar el contenido de ácidos urónicos (expresado como AGA) y el grado de esterificación.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Reactivos químicos

Los compuestos *m*-hidroxidifenilo, ácido poligalacturónico (APG) y ácido galacturónico monohidrato (AGA) fueron adquiridos comercialmente por Sigma Chemical Co. Todos los demás reactivos empleados fueron comercialmente disponibles y de grado analítico.

3.2.2. Fuentes de enzimas

El biorreactor empleado en la producción de las tres enzimas fue de 1,5 l Bio Flo 310 Benchtop (New Brunswick Scientific Corp., Edison, NJ, EE.UU.). El pH de los tres cultivos se midió con un electrodo de vidrio (Mettler-Toledo) y el oxígeno disuelto se midió con un electrodo de tipo polarográfico (Mettler Toledo).

PGI de *Aspergillus kawachii* se obtuvo a partir de cultivos de clones de *Saccharomyces cerevisiae* conteniendo el vector inducible pYES2. Los mismos se llevaron a cabo mediante el uso de un sistema de cultivo fed-batch con un medio sintético que contiene glucosa como FCE, urea como FN, sales y micronutrientes definidos en trabajos previos (Rojas *et. al* 2011). La biomasa se separó por centrifugación (10 min, 4 ° C) a 16.000 × g, y el sobrenadante se concentró por evaporación bajo presión reducida para reducir el volumen total para luego almacenarlo a -20 °C. Esta solución contenía una actividad poligalacturonasa de 40 U / ml.

PPasa-SE se obtuvo de cultivos de *Geotrichum klebahnii* llevados a cabo mediante el uso de un sistema de cultivo en batch alimentado de acuerdo con Zapata Zapata (2009).

PGzyme se obtuvo de un cultivo de *Aspergillus sojae* llevado a cabo con un medio mineral suplementado con cáscara de naranja y sulfato de amonio como FCE y FN respectivamente.

En estos últimos casos, la biomasa se separó por centrifugación (10 min, 4 ° C) a 16.000 × g, y el sobrenadante se concentró por filtración tangencial usando el sistema Vivaflw 200 de Sartorius®. En primera instancia el sobrenadante centrifugado se paso por

un cartucho con una línea de corte de 0.2 μm para clarificarlo. El filtrado de este paso fue guardado mientras que el retenido (que contiene los restos celulares y otras impurezas del medio de cultivo) fue descartado. El filtrado fue filtrado luego a través de un cartucho con un corte de peso molecular de 10000. En este caso, se descartó el filtrado (agua, sales y otros componentes de bajo peso molecular) y se conservó el retenido con la enzima concentrada. Posteriormente, al retenido se le cambió el *buffer* mediante el mismo cartucho de ultrafiltración y se congeló y liofilizó hasta su uso. Una vez liofilizados, los mismos se resuspendieron en agua generando soluciones concentradas que presentaron una actividad PGasa de 5000 U/ml para la enzima PPasa-SE y de 1400 U/ml para la enzima PGzyme.

Además, se adquirieron una poligalacturonasa comercial altamente concentrada (BA) por NUTRING SA, y dos pools enzimáticos con alta actividad poligalacturonasa (J1 y J2) por la compañía JUGOS SA.

3.2.3. Evaluación del contenido de pectina de los frutos de producción regional y parcial caracterización de los mismos

3.2.3.1. Tejidos vegetales

Los ensayos se realizaron sobre cáscaras de manzanas de las variedades Gala, Red Delicious, Granny Smith y Pink Lady, peras de las variedades Williams, Red D'anjou y Winter Bartlett y membrillos de la variedad Smyrna. De membrillo se utilizó una única variedad debido a que es la que se encuentra generalmente en la zona. Las muestras de manzanas fueron cedidas por la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) - Alto Valle del INTA, las de peras por la empresa Univeg Expofrut S.A. y los membrillos por una chacra de la región. Todas las frutas fueron obtenidas directamente de las plantaciones de la región del Alto Valle de Río Negro, sin pasar por el almacenamiento en cámaras frigoríficas. Se trabajó con frutos que presentaban esta característica para evitar que el contenido de pectina pudiera modificarse debido al tratamiento de conservación recibido.

3.2.3.2. Madurez de los frutos

A cada una de las muestras se le midió la acidez. La acidez titulable representa a los ácidos orgánicos presentes que se encuentran libres y se mide neutralizando los jugos de frutas con una base. La titulación se realizó con una solución de NaOH 0,1 N. Para reportar la acidez, se considera el ácido orgánico más abundante del producto vegetal, el cual varía dependiendo de la especie de que se trate. Para el caso de las manzanas, peras y membrillos el ácido con mayor predominio es el ácido málico. Por lo tanto, los resultados se expresaron como gramos de ácido málico/100 ml de jugo.

Además, se determinó el contenido Ss. La concentración de Ss se expresa en °Brix. Los °Brix son un índice comercial, aproximado, de esta concentración, que se acepta convencionalmente como si todos los sólidos disueltos fueran sacarosa. Las muestras fueron analizadas con refractómetro de masa tipo Abbea a 20°C.

A partir de los datos de Ss y acidez se calculó el índice de madurez (Ss/acidez) (Bermúdez 2003). En el estado de madurez, el contenido en azúcares aumenta y el de ácidos disminuye.

3.2.3.3. Extracción fisicoquímica de pectina

Existen diferentes técnicas fisicoquímicas para la determinación del contenido de pectina. El procedimiento utilizado en este caso, evaluó el contenido total de pectina como pectato de calcio (CaP), siguiendo la Norma Mexicana NMX-F-347-S-1980 para frutas y derivados que utiliza el método gravimétrico de Carré y Haynes (1922).

Se utilizaron las cáscaras de las frutas, las cuales fueron reducidas finamente. Se hirvieron 50 g de muestra con agua destilada durante una hora. Luego se filtró para separar el extracto que contiene la pectina de los restos de tejido vegetal. Se tomaron alícuotas de 100 ml, se agregó NaOH 1N y se dejó reposar toda la noche. Se obtuvo entonces la pectina por medio de la precipitación de la misma por la acidificación del medio con ácido acético y el agregado de cloruro de calcio 1 N, manteniendo una agitación constante. El residuo fue lavado con agua destilada caliente varias veces para eliminar el cloro. Luego se filtró y se secó en estufa a 105 °C hasta peso constante y se determinó su masa.

El contenido de pectina en la muestra se calculó con la siguiente fórmula:

$$P = \frac{(M_1 - M_2)}{S} \times 100$$

P = por ciento de pectina expresada en gramos

M₀ = masa en gramos del papel filtro sin contenido

M₁ = masa en gramos del papel filtro con contenido

S = masa en gramos de la muestra usada en la alícuota de 100 ml

3.2.4. Evaluación de la aplicación de PGI, PPasa-SE y PGzyme al proceso de extracción de pectina a partir de tejidos de fruta regional

3.2.4.1. Tejidos vegetales

Los ensayos se realizaron sobre los tejidos de fruta de las variedades que resultaron más convenientes para la extracción de pectina según el estudio anterior 3.2.3. Todas las frutas fueron obtenidas directamente de las plantaciones de la región del Alto Valle de Río Negro, sin pasar por el almacenamiento en cámaras frigoríficas. Se trabajó con frutos que presentaban esta característica para evitar que el contenido de pectina pueda modificarse debido al tratamiento de conservación recibido.

3.2.4.2. Extracción enzimática de pectina por parte de las pectinasas en estudio

La metodología aplicada fue la descrita previamente por Zapata Zapata (2008) con algunas modificaciones. La técnica para la extracción enzimática de pectina consistió en la mezcla de orujo de las distintas frutas (1 g) con el *buffer* BCP (1,5 ml) a pH 4 y cada solución de enzima diluida convenientemente en el mismo *buffer* (2 ml). Estas diluciones se realizan con todas las enzimas para lograr una actividad poligalacturonasa en la solución final de 35 U. Dichos sistemas se agitaron en un shaker con agitación recíproca y baño térmico de agua JEIO Tech BS-11 a 150 golpes/min durante 6 hs a 37 °C.

La pectina obtenida en solución se separó del resto del material vegetal por filtración a través de una tela de trama angosta. Luego, se añadió etanol 96% (v/v) al permeado en una relación de 3 volúmenes de etanol a 1 volumen de permeado con la finalidad de precipitar la pectina. El gel formado se centrifugó y se secó en una estufa a 40 °C durante 4 horas. Se enfrió, se pesó y se repitió esta operación cada una hora hasta peso constante. Con este procedimiento, la medida de la pectina se corresponde con el peso seco del material insoluble en etanol (MIE) (Contreras Esquivel 2003).

3.2.4.3. Extracción enzimática de pectina por parte de las pectinasas comerciales

Se llevó a cabo el mismo procedimiento de extracción enzimática de pectina descrito previamente 4.2.4.2. con las enzimas comerciales (BA, J1 y J2).

3.2.4.4. Extracción fisicoquímica de pectina

En este caso, la extracción fisicoquímica de pectina a partir de orujo de fruta se efectuó por el método más comunmete utilizado el cual consistió en una hidrólisis en medio ácido, con un pH final de 1,5 llevado con HCl. La solución se dejó hervir durante 40 minutos (Zapata Zapata 2008). Luego, para la separación de la pectina se siguió el mismo procedimiento descrito para la extracción enzimática 4.2.4.2. que utiliza la precipitación de la misma por adición de etanol.

3.2.5. Medida de la actividad enzimática

Se utilizó el método descrito en el Capítulo 2.

3.2.6. Caracterización parcial de la pectina extraída

3.2.6.1. Determinación de ácidos urónicos

Se utilizó el método colorimétrico del *m*-hidroxidifenilo (mhdf). Esta técnica determina el contenido de ácidos urónicos mediante la aplicación de una curva patrón de AGA monohidrato (0-250 mg/L) tratadas de igual manera que las muestras (Blumenkrantz y Asboe-Hansen 1973). Se midió la formación de color luego del agregado del mhdf en un espectrofotómetro Metrolab330, previa hidrólisis con una solución de tetraborato de sodio (borax). Este método fue empleado para la cuantificación de la pectina extraída en cada caso.

3.2.6.2. Determinación del grado de esterificación (GE)

Se utilizó un método de titulación para determinar la cantidad de grupos carboxilo presentes en los restos de AGA esterificado. Una muestra de 50 mg de pectina se disolvió en 10 ml de H₂O destilada hervida y se tituló con NaOH 0,1 N (V_1) utilizando fenolftaleína como indicador. Posteriormente, se añadió 20 ml de NaOH (0,5 M) y se dejó reposar durante 30 min. A continuación, la solución se neutralizó con 20 ml de HCl (0,5 M) y se agitó vigorosamente. Se tituló de nuevo con NaOH (0,1 N) (V_2). El GE fue calculado mediante la siguiente ecuación (Kim 2000).

$$GE (\%) = \frac{V_2}{(V_1 + V_2)} \times 100$$

Los valores de GE se obtuvieron como promedio de tres repeticiones.

3.2.7. Método estadístico

Se utilizó el análisis de varianza ANOVA de un factor y el análisis de comparaciones múltiples para determinar la existencia de diferencias significativas en el contenido de pectina entre las variedades de manzanas y peras. Además, se lo empleó para

comparar los rendimientos obtenidos con los diferentes métodos de extracción de pectina utilizados, el GE y el contenido de grupos urónicos de las pectinas extraídas. Se utilizó un nivel de significancia del 95% (p -valor = 0,05). El análisis estadístico se realizó utilizando el software Matlab (versión R2009a).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Evaluación del contenido de pectina de los frutos de producción regional y parcial caracterización de los mismos

El método empleado para la determinación del contenido de pectina durante la caracterización de los frutos de la producción del Alto Valle de Río Negro, no es el método físico-químico de extracción de pectina generalmente utilizado. En este método, se produce la transformación de la protopectina (material insoluble en agua) en pectina soluble por medio de una hidrólisis con altas temperaturas, para luego ser saponificada con un álcali. Posteriormente es acidificada produciendo grupos -COOH libres de ácidos pécticos que forman sales insolubles en agua al precipitarse con sales cálcicas (Carré y Haynes 1922, Bermudez 2003, Téllez *et al.* 2008).

En las Tablas 3.1., 3.2. y 3.3. se exponen los contenidos de pectina, calculados como pectato de calcio; la acidez total; los Ss y el índice de madurez para las distintas variedades de manzanas, peras y membrillo:

Tabla 3.1. Contenido de pectina, acidez, sólidos solubles e índice de madurez de las distintas variedades de manzana analizadas.

Variedad de Manzana	Contenido de Pectina (%CaP)	Acidez (gr/100 ml)	Sólidos solubles (°Brix)	Índice de Madurez (Ss/acidez)
Gala	0,11 – 0,40	0,19 – 0,30	8,75 – 14,25	3,39 – 7,12
Red Delicious	0,23 – 0,52	0,10 – 0,17	12,75 – 16,00	8,98 – 15,21
Granny Smith	0,59 – 0,83	0,54 – 0,75	11,25 – 13,25	1,75 – 2,12
Pink Lady	0,32 – 0,50	0,26 – 0,38	11,5 – 14,50	4,22 – 5,42

Tabla 3.2. Contenido de pectina, acidez, sólidos solubles e índice de madurez de las distintas variedades de pera analizadas.

Variedad de Pera	Contenido de Pectina (%CaP)	Acidez (gr/100 ml)	Sólidos solubles (°Brix)	Índice de Madurez (Ss/acidez)
Williams	0,19 – 0,53	0,16 – 0,28	9,25 – 11,25	3,84 – 5,67
Red D’Anjou	0,37 – 0,59	0,12 – 0,16	13 – 14,25	8,52 – 11,01
Winter Bartlett	0,03 – 0,45	0,08 – 0,20	9,25 – 13,75	6,13 – 17,43

Tabla 3.3. Contenido de pectina, acidez, sólidos solubles e índice de madurez de la variedad de membrillo analizada.

Variedad de Membrillo	Contenido de Pectina (%CaP)	Acidez (gr/100 ml)	Sólidos solubles (°Brix)	Índice de Madurez (Ss/acidez)
Smyrna	0,78 – 0,94	0,33 – 0,56	8,5 – 11,25	2,01 – 2,54

Al realizar el análisis de varianza ANOVA para establecer si existen diferencias significativas entre el contenido de pectina de las distintas variedades de manzanas y peras, se obtuvo como resultado un p-valor menor a 0,05 para ambos casos. De esta manera, quedó demostrado que si existen diferencias en el contenido de pectina entre las distintas variedades de cada fruta analizadas. Además, por medio del análisis de comparaciones múltiples, se comprobó que la variedad de manzana Granny Smith presenta una media significativamente diferente y mayor con respecto a la de Gala, Red Delicious y Pink Lady. A su vez, esta última presenta una media significativamente diferente con respecto a Gala. Analizando de la misma manera las variedades de pera, la variedad Winter Bartlett presenta una media significativamente diferente y menor con respecto a la de Williams y Red D'anjou.

Los mayores porcentajes de pectina fueron obtenidos para la variedad Granny Smith en manzanas y Red D'anjou en peras. Todos los valores hallados en las distintas variedades de manzana se encuentran dentro de los rangos reportados por otros autores como %CaP 0,14–0,96 (Money y Christian 1950); 0,19–0,79 (Money y Christian 1950) y 0,63–1,15 (Gautam *et al.* 1986). En cuanto a las peras, no se encontraron datos bibliográficos. Por comparación con otro reporte, los frutos de membrillo presentaron contenidos de pectina

altos ya que se publica un porcentaje de 0,53 por Forni *et al.* (1994). Esta variación puede deberse a que la variedad de membrillo y/o a que la técnica empleada no sean las mismas que las utilizadas en nuestros ensayos, ya que la extracción fue realizada por hidrólisis en medio ácido con precipitación en etanol y la variedad del membrillo fue Gigante di Vranja.

Por otra parte, se observó una correlación negativa entre el índice de madurez de la fruta y el contenido de pectina encontrado. En todos los casos, el contenido de pectina va disminuyendo a medida que el índice de madurez aumenta (fruto más maduro, menor contenido de pectina). En las Figuras 3.1 hasta 3.8 se puede advertir este efecto en las distintas variedades de fruta analizadas.

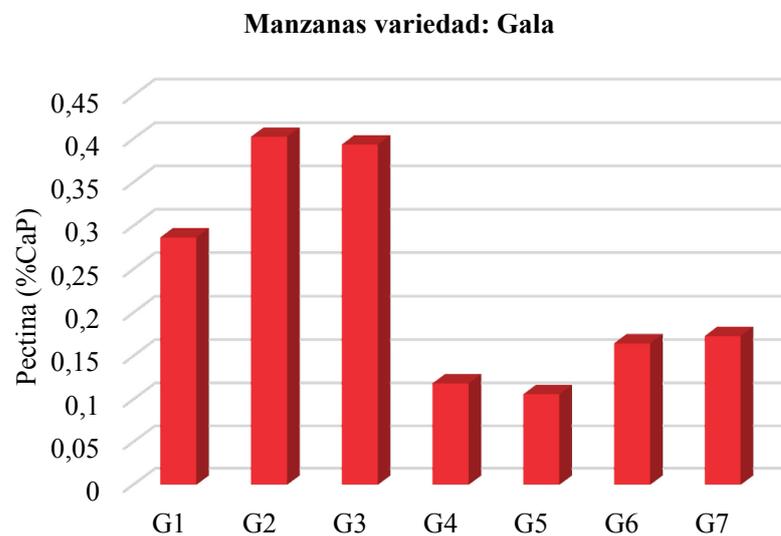


Figura 3.1. Evolución del contenido de pectina en función del estado de madurez de las manzanas de la variedad Gala. Índice de madurez (G1: 3,39 – G2: 4,17 - G3: 4,40 - G4: 4,68 - G5: 5,89 - G6: 5,97 - G7: 7,12).

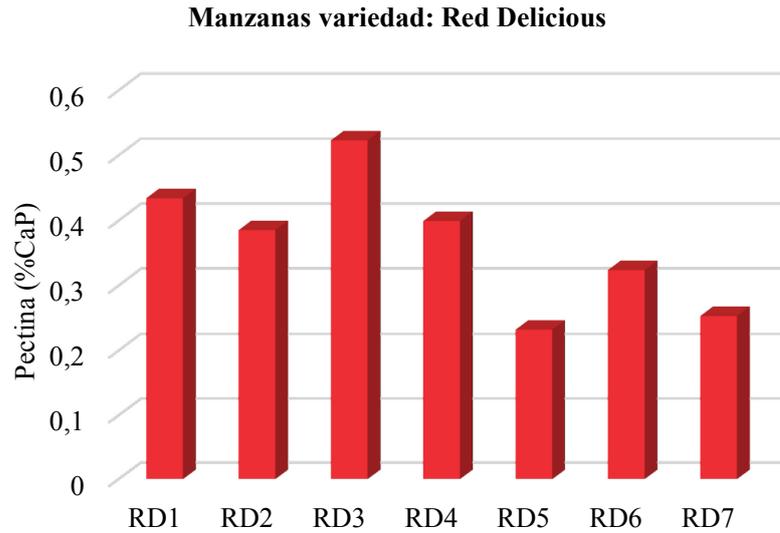


Figura 3.2. Evolución del contenido de pectina en función del estado de madurez de las manzanas de la variedad Red Delicious. Índice de madurez (RD1: 8,99 – RD2: 10,78 - RD3: 10,78 - RD4: 13,32 - RD5: 14,76 - RD6: 14,76 - RD7: 15,22).

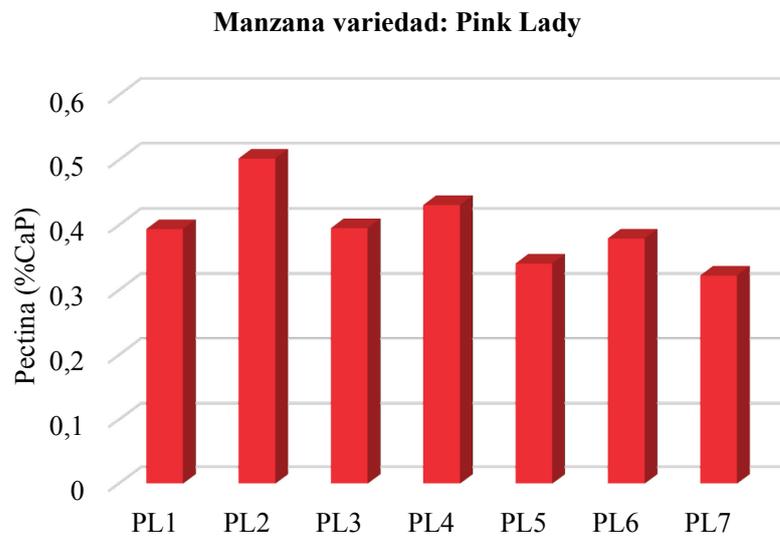


Figura 3.3. Evolución del contenido de pectina en función del estado de madurez de las manzanas de la variedad Pink Lady. Índice de madurez (PL1: 4,23 – PL2: 4,34 - PL3: 4,37 - PL4: 4,38 - PL5: 4,45 - PL6: 5,07 - PL7: 5,42).

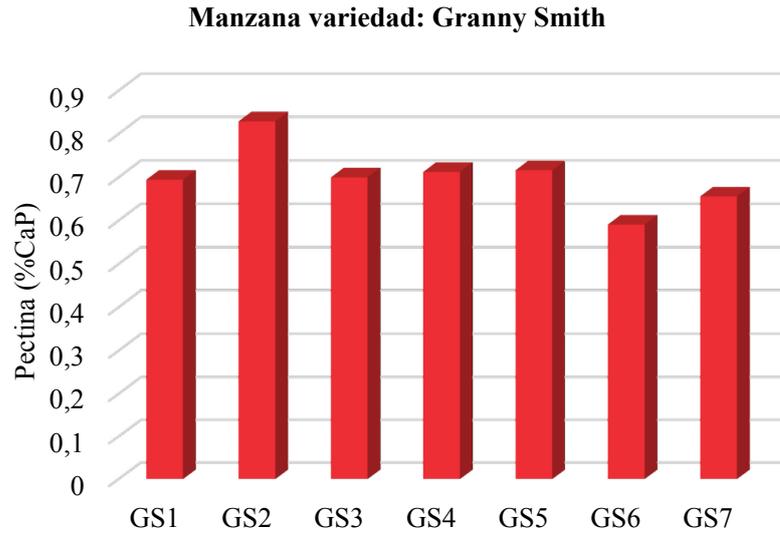


Figura 3.4. Evolución del contenido de pectina en función del estado de madurez de las manzanas de la variedad Granny Smith. Índice de madurez (GS1: 1,75 – GS2: 1,98 - GS3: 2,03 - GS4: 2,05 - GS5: 2,07 - GS6: 2,12 - GS7: 2,12).

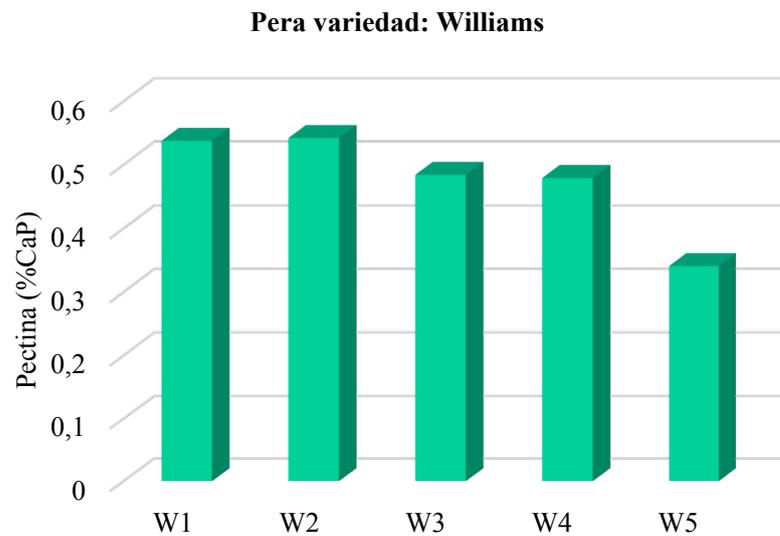


Figura 3.5. Evolución del contenido de pectina en función del estado de madurez de las peras de la variedad Williams. Índice de madurez (W1: 3,85 – W2: 4,51 - W3: 4,60 - W4: 5,63 - W5: 5,67).

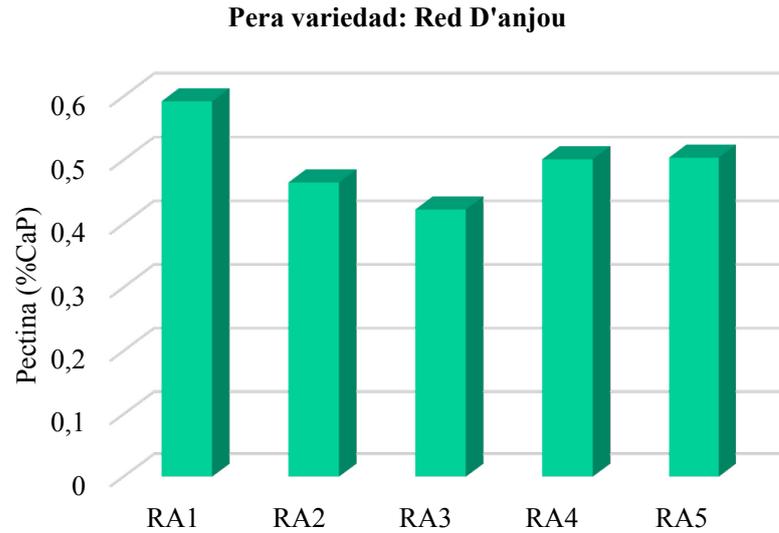


Figura 3.6. Evolución del contenido de pectina en función del estado de madurez de las peras de la variedad Red D'anjou. Índice de madurez (RA1: 8,52 – RA2: 8,79 - RA3: 9,04 - RA4: 10,84 - RA5: 11,01).

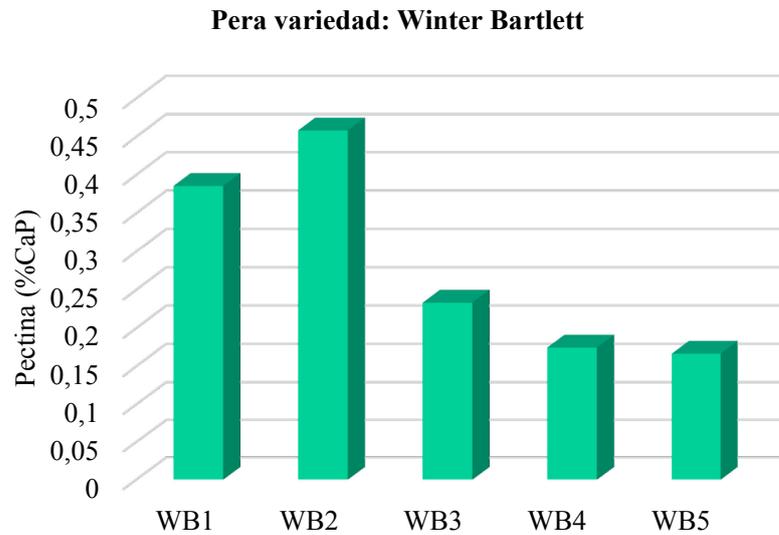


Figura 3.7. Evolución del contenido de pectina en función del estado de madurez de las peras de la variedad Winter Bartlett. Índice de madurez (WB1: 6,14 – WB2: 7,47 - WB3: 8,88 - WB4: 9,38 - WB5: 17,44).

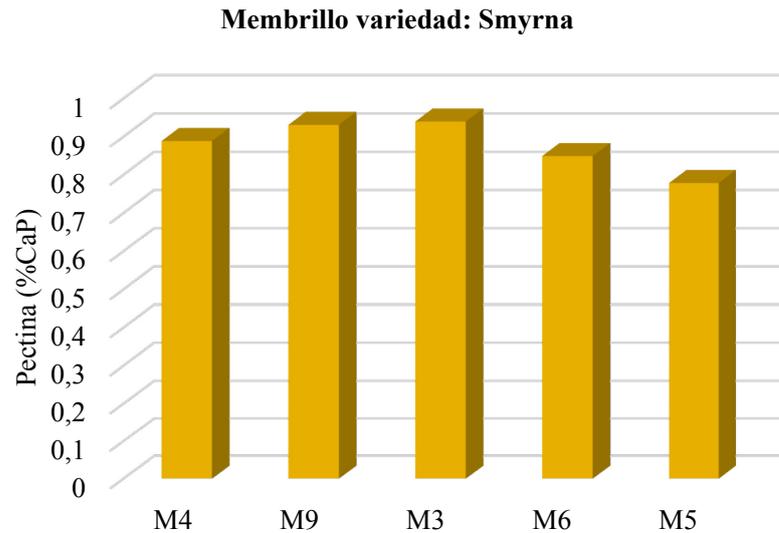


Figura 3.8. Evolución del contenido de pectina en función del estado de madurez de los membrillos de la variedad Smyrna. Índice de madurez (M1: 2,01 – M2: 2,37 - M3: 2,45 - M4: 2,47 - M5: 2,54).

Esta disminución en el contenido de pectina puede deberse a que, a medida que avanza la maduración del fruto se incrementa la actividad de determinadas enzimas (PME, PG, etc.) provocando la despolimerización de las sustancias pécticas, entre otras. Así, se produce una disminución del contenido de pectina insoluble, que es la que se determina mediante los análisis fisicoquímicos, y un aumento de la fracción soluble. Esta disminución de la protopectina es la que determina el ablandamiento del tejido vegetal (Proctor y Peng 1989, Aponte y Guadarrama 2003). Este mismo efecto también fue reportado por Knee (1973) en manzana, Proctor y Peng (1989) en arándano, D’Addosio *et al.* (2005) y Sindoni *et al.* (2013) en maracuyá.

Como puede notarse en la variedad de manzana Granny Smith y en los membrillos, este efecto no es tan acentuado. Esto se debe a que no se percibió una gran diversidad en el estado de madurez de los frutos seleccionados en comparación con las otras variedades.

Para los análisis de extracción enzimática que siguen a continuación, se utilizó la variedad de manzana Granny Smith por presentar el mayor contenido de pectina. En el caso de las peras se decidió emplear la variedad Winter Bartlett en vez de la Red D’anjou debido a que la variación del contenido de pectina no fue tan evidente, sumado a que los ensayos se realizaron en una época del año donde sólo se consigue esta variedad fuera de las cámaras frigoríficas. Se resolvió descartar el empleo de los membrillos en los estudios siguientes, debido a que no existe una elevada producción industrial y, por lo tanto, los residuos de

dichos frutos no son suficientes como para aprovecharlos como fuentes de extracción de pectina.

3.3.2 Evaluación de la aplicación de PGI, PPasa-SE y PGzyme al proceso de extracción de pectina a partir de tejidos de fruta regional

En estudios previos realizados por Zapata Zapata (2008), se analizaron distintas variables de la técnica de extracción enzimática (pH – tipo de *buffer* – temperatura) con PPasa-SE, obteniéndose de esta manera las condiciones óptimas para su realización. Los resultados mostraron que los mayores niveles de solubilización se obtuvieron con CitB (10 mM) y BCP, pudiéndose atribuir esta condición a la presencia de ácido cítrico. Este actúa como un agente quelante de cationes divalentes, especialmente Ca^{2+} , los cuales están presentes dentro de la estructura de la protopectina y que son los responsables de mantener unidas las cadenas lineales de homogalacturonano otorgándole rigidez estructural y causando la insolubilidad de la protopectina. De esta forma, la presencia de dicho ácido, promueve la separación de las cadenas de homogalacturonano, con la subsecuente solubilización de la pectina (De Bruijn y Biekman 1998, Kim *et al.* 2000). Se decidió utilizar el *buffer* BCP, ya que este es el utilizado también por Contreras Esquivel (2003) en la extracción de pectina por parte de la enzima PGI. A pesar de que el pH óptimo determinado en estos estudios para PPasa-SE fue de 5, se decidió utilizar un pH de 4 debido a que la enzima PGI es prácticamente inactiva a pH 5 (Contreras Esquivel 2003). Además, al trabajar a $\text{pH} \leq 4$ se evitan posibles contaminaciones. La temperatura de trabajo empelada de 37 °C fue la calculada como óptima en los estudios previos con PPasa-SE.

La extracción química aplicada en este caso es la que se utiliza habitualmente, en donde mediante el uso de ácidos durante la hidrólisis se rompen los puentes de hidrógeno existentes entre la celulosa y los ácidos pécticos, provocando la solubilización de la protopectina (Ueno *et al.* 2008). Luego se produce la recuperación de la pectina mediante precipitación de la misma con etanol, aprovechando la baja solubilidad de la misma en este medio.

Con el fin de mejorar la extracción, las cáscaras de manzana y pera se cortaron en trozos pequeños para lograr aumentar el área de contacto entre el sustrato y la enzima. Esto beneficia los procesos de adsorción que son sumamente importantes en las reacciones de tipo heterogéneas (como en este caso), que a su vez dependen de la estructura de la

partícula, además de la composición del medio de reacción, y de otras variables operacionales como el pH y la temperatura (Zapata Zapata 2008).

Los resultados de la extracción de pectina por parte de las enzimas en estudio (PGI, PPasa-SE y PGzyme), por las comerciales (BA, J1 y J2) y por la extracción química de la variedad Granny Smith en manzanas y de la variedad Winter Bartlett en peras se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Rendimientos de la extracción de pectina (correspondiente al MIE). Rendimiento: g pectina/100 g tejido.

	Manzanas (Humedad 85%)	Peras (Humedad 90%)
	Rendimiento (g MIE/100 g de material)	
PGI	24*	54*
	3,60**	5,37**
PPasa-SE	15*	8*
	2,28**	0,79**
PGzyme	8,47*	9,30*
	1,27**	0,93**
BA	11,23*	22*
	1,69**	2,15**
J1	3,92*	8,88*
	0,59**	0,89**
J2	3,92*	8,72*
	0,59**	0,87**
Química	18*	11,37*
	2,66**	1,14**

* En base seca de material procesado. ** En base húmeda de material procesado.

MIE: material insoluble etanol

Los resultados demostraron que las tres enzimas implicadas en el estudio presentaron adecuadas capacidades para solubilizar la pectina de los frutos utilizados. Esto se debe a que las mismas son endo-PGs que poseen además actividad PPasa. Por lo tanto,

poseen una alta afinidad por sustratos insolubles (Schols 1995) y baja afinidad por pectinas solubles. Esta característica es la que permite obtener pectinas solubles de peso molecular elevado sin que sean atacadas por la enzima (Sakai *et al.* 1993).

Particularmente para las manzanas, la extracción de pectina por PGI fue aproximadamente 25% mayor que la extracción química, 50% mayor que BA, y 80% mayor que J1 y J2. Para las peras, la extracción de pectina por PGI fue aproximadamente 60% mayor que BA, y 80% mayor que J1 y J2, y que la extracción química.

PPasa-SE extrajo en el caso de las manzanas aproximadamente un 25% más que BA, y 70% más que J1 y J2. PGzyme extrajo un 55% más que dos de las enzimas comerciales (J1 y J2) en las manzanas. Por último, en cuanto a las peras, las dos enzimas extrajeron lo mismo que J1 y J2.

De las tres enzimas, se observa que PGI posee mejor capacidad para la extracción de pectina, extrayendo de las manzanas un 40% y un 60% más que las enzimas PPasaSE y PGzyme, respectivamente. Y en cuanto a las peras extrajo un 80% más que ambas enzimas. Esto puede deberse a que, como ya se mencionó anteriormente en este capítulo, la extracción de pectina por vía enzimática depende enormemente de las interacciones enzima-sustrato, la que a su vez puede estar influenciada fuertemente por la microestructura de la materia prima (Contreras Esquivel 1997). Evidentemente esto indicaría una mayor afinidad de la enzima PGI por ambos sustratos, y especialmente por la protopectina de las peras. Además, considerando que la misma está enlazada fuertemente a otros componentes constituyentes de las paredes celulares vegetales (Pilnik y Voragen 1970), podría considerarse que esta mayor actividad de PGI estaría relacionada con un mayor poder de acción sobre las uniones químicas entre el material péctico y los diferentes polímeros presentes, tanto en la pared celular primaria como en la laminilla media del tejido, presentando un mayor poder de penetración y por consiguiente causando una mayor solubilización de pectina.

Esto concuerda con que se ha reportado que el contenido de pectina extraído mediante métodos químicos en manzana es de 15-18% (Masmoudi *et al.* 2008) y en peras es de 14% (Martin-Cabrejas *et al.* 1994), ambos valores en peso seco. Estos son semejantes con los determinados por extracción química, pero se encuentran muy por debajo de los valores obtenidos por extracción enzimática con PGI. Se ha descrito que los materiales vegetales contienen hasta un 30 % de material celulósico, el cual, junto con la pectina, es insoluble en etanol (Sinclair y Crandall 1949). Por ello, las medidas de peso seco realizadas

en los ensayos enzimáticos incluyen a ambos componentes a diferencia de la medida de peso seco realizada en los ensayos químicos en los cuales existe una hidrólisis total o parcial del material celulósico. Esta hidrólisis genera azúcares simples, solubles en etanol, razón por la cual esta fracción no es detectada en los resultados de peso seco (Zapata Zapata 2008). Este efecto se observa en mayor medida en el caso de las peras donde se obtuvo un contenido de MIE con PGI del 54%, con lo cual podemos inferir que existe una alta afinidad de la enzima por la composición del sustrato, como ya se ha mencionado.

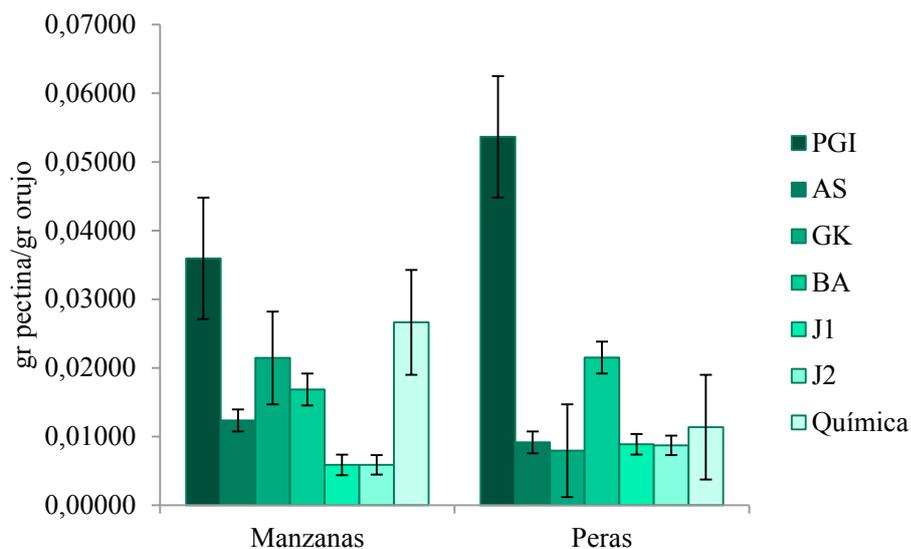


Figura 3.9. Comparación de los distintos métodos de extracción de pectina sobre cáscaras de manzanas y peras.

El análisis de varianza ANOVA refuerza estas observaciones indicando un valor de p inferior a 0,05 en ambos casos (manzanas y peras); mostrando de esta manera que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los rendimientos de la extracción de pectina por los diferentes métodos. Mediante el análisis de comparaciones múltiples, se determinó que los rendimientos de la extracción de pectina por parte de PGI tienen un promedio significativamente diferente y superior sobre los rendimientos de la extracción de pectina por los otros métodos. Esto confirma que la extracción con dicha enzima es más eficiente.

En cuanto a la caracterización, se puede mencionar que, a partir del análisis del grado de esterificación, las pectinas obtenidas en todos los casos fueron de alto metoxilo ($GE > 50\%$). Esto quiere decir que contienen una alta proporción de restos de ácidos galacturónicos esterificados con metanol. La pectina extraída de las manzanas presentó un

GE del 80% para PGI; 88% para PPasaSE; 91% para PGzyme; 84% para BA; 85% para J1; 80% para J2 y 61% para la extraída químicamente. Para las peras el GE fue del 84% para PGI; 92% para PPasaSE; 89% para PGzyme; 86% para BA; 87% para J1; 89% para J2 y 63% para la extraída químicamente. En la industria alimenticia esta es la pectina que se utiliza mayoritariamente. La gelificación de las mismas se produce en presencia de concentraciones relativamente altas de azúcar, en medio ácido. Inversamente, la gelificación de las pectinas de bajo metoxilo se produce en ausencia de azúcar, pero en presencia de concentraciones de iones, particularmente divalente (por ejemplo, Ca^{+2}). Alrededor del 80% de la producción mundial de pectina altamente metoxilada se utiliza en la fabricación de mermeladas y jaleas, con el fin de corregir la deficiencia de pectina natural de algunas frutas (Sakai *et al.* 1993, Voragen *et al.* 1995, Willats 2006).

Las pectinas obtenidas a partir de la aplicación de las diferentes enzimas, presentaron un contenido de grupos esterificados muy similar tanto para las manzanas como para las peras. De la misma manera, las obtenidas como resultado de las extracciones químicas, mostraron un GE muy similar para ambos sustratos. Pero al comparar los GEs obtenidos por ambos métodos se observa que los valores para la extracción química (~60%) son mucho menores que para la enzimática (~80%). Esto significa que, al realizar la extracción enzimática, la pectina obtenida presenta un menor daño en comparación con la química, ya que la pérdida de grupos metoxilados, que antes estaban esterificados en los residuos de AGA, no es alta. Los métodos fisicoquímicos utilizan condiciones drásticas de temperatura y ácidos fuertes lo que provoca una significativa despolimerización de la pectina solubilizada durante el proceso y una mayor ruptura en las uniones de los grupos esterificados. Consecuentemente, el rendimiento y las propiedades funcionales del producto obtenido son negativamente afectados (Panchev *et al.* 1989; Hwang *et al.* 1993), debido a que dependen del GE y el grado de polimerización (peso molecular). Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos se observa que las pectinas extraídas por las enzimas en estudio resultarían ser altamente adecuadas para conservar el grado de esterificación y, por consiguiente, sus propiedades funcionales.

De la misma manera, ANOVA refuerza estas observaciones indicando un valor de p inferior a 0,05 tanto para las manzanas como para las peras; mostrando que hay una diferencia estadísticamente significativa entre el GE de las pectinas extraídas por los diferentes métodos. Mediante el análisis de comparaciones múltiples, se comprobó que el GE de las pectinas extraídas enzimáticamente tienen promedios significativamente diferentes y más altos que las pectinas extraídas químicamente.

En cuanto al contenido de ácidos urónicos (principalmente AGA) en el MIE fue de aproximadamente 70 y 50% para las manzanas y las peras, respectivamente, con la enzima PGI. Teniendo en cuenta que se ha reportado un contenido de AGA en residuos de manzana de 4,27 g AGA/100 g residuos (Anthon y Barrett 2008) y que el 70% del MIE en manzanas es AGA (vease Tabla 3.5), se deduce una eficiencia real del 60% en el proceso de extracción de pectina a partir de cáscaras de manzana. Zapata Zapata (2008) reporta una eficiencia en el proceso de extracción de pectina a partir de protopectina de limón del 65% con la enzima PPasaSE. Este mismo análisis no pudo realizarse para las peras debido a que los valores encontrados de AGA en bibliografía son menores a los hallados en estos ensayos. Se ha reportado un contenido de AGA en residuos de pera de 1.46 g AGA/100 g residuos (Martin-Cabrejas *et al.* 1994). Esta diferencia puede deberse a que las condiciones de extracción y la variedad de pera utilizada son diferentes a las empleadas en estos ensayos.

El mismo razonamiento no pudo llevarse a cabo con las demás enzimas debido a que el contenido de grupos urónicos dió un valor mayor que el peso seco del MIE en todos los casos. Una explicación a dicho comportamiento podría ser atribuida a que las enzimas PPasaSE, PGzyme, BA, J1 y J2; producirían una mayor rotura de la estructura molecular de la pectina generando polímeros de bajo peso molecular que luego no pueden ser precipitados con etanol. Por lo tanto, el contenido de AGA (ác. urónicos) termina siendo alto en todas las muestras al realizar su determinación, pero al precipitar la pectina el valor del MIE resulta bajo.

Tabla 3.5. Cálculo del % Ácidos Urónicos (principalmente AGA) en el MIE extraído por PGI, PPasaSE, PGzyme, BA, J1 y J2 de manzanas y peras.

	Pectina (g MIE/100 g cáscaras)		Ácidos urónicos (g/100 g cáscaras)		% Ác. urónicos en el MIE	
	Manzanas	Peras	Manzanas	Peras	Manzanas	Peras
PGI	3.60	5.37	2.48	2.59	69	48
PPasaSE	1.24	0.92	4.03	3.62	----	----
PGzyme	2.15	0.79	4.24	2.95	----	----
BA	1.69	2.15	5.11	3.35	----	----
J1	0.59	0.89	5.85	3.23	----	----
J2	0.59	0.87	5.40	3.29	----	----

Como se mencionó anteriormente, las pectinas que han sufrido una significativa despolimerización durante el proceso de extracción, ven afectadas negativamente sus rendimientos y propiedades funcionales. Se concluye que la enzima PGI es la que produjo la pectina con mejores condiciones, conservando un grado de polimerización importante, y teniendo una alta eficiencia en el proceso de extracción (manzanas 60%).

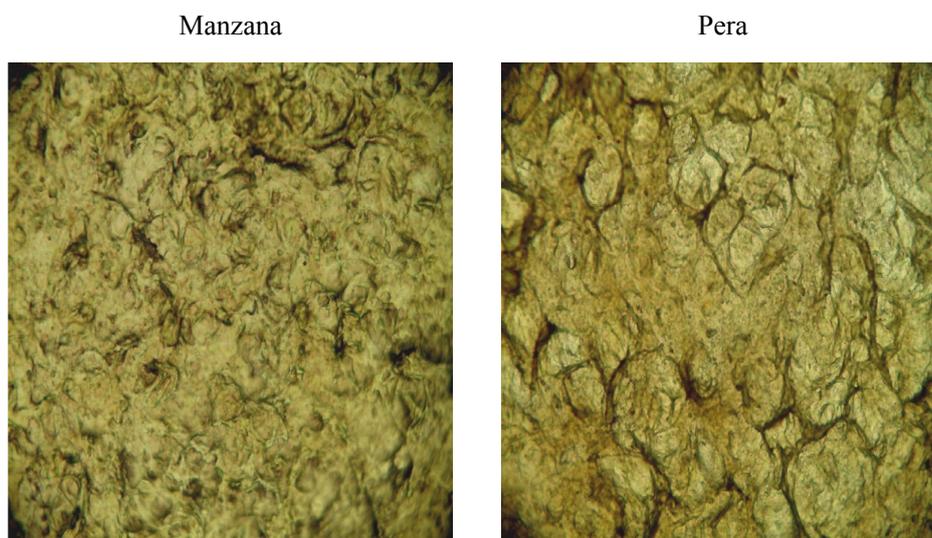


Figura 3.10. Microfotografías de pectina seca de manzana y pera. Observación al microscopio óptico 100x.

Por otra parte, se observa que ambos frutos resultaron ser excelentes sustratos para la extracción de pectina, ya que al comparar con diferentes publicaciones puede observarse que el rendimiento obtenido es generalmente mayor que con otros sustratos: en guayabas (4,50%) por Romero (1997), en maracuyá (18%) por D'Addosio *et al.* (2005), en mandarina (17%) por Royo Iranzo (1980) en limón (20%) por Camejo de Aparicio *et al.* (1996).

3.4. CONCLUSIONES

Los porcentajes de pectina determinados para las manzanas, peras y membrillos de la producción del Alto Valle de Río Negro están dentro de los rangos reportados para otros cultivares en otras partes del mundo. Además, es favorable que los valores obtenidos para estas frutas características de la región, presentan elevados contenidos de pectina en comparación con otras. Estos frutos resultaron ser un buen sustrato para la extracción de pectina con distintos fines, lo que permitiría aumentar la oferta de productos de valor agregado a la producción local.

Los resultados demostraron que las tres enzimas implicadas en el estudio presentaron adecuadas capacidades para la extracción de pectina en cuanto al rendimiento. Quedó demostrado que las enzimas implicadas en estos estudios se comportaron de igual o mejor forma que las comerciales que se encuentran en el mercado. Con el aporte de estas enzimas de producción nacional, se conseguiría disminuir los costos de los productores, ya que actualmente las mismas se consiguen a través de importaciones lo cual se traduce en un mayor gasto productivo.

Sin embargo, al realizar la caracterización de las distintas pectinas se encontró un GE óptimo en todos los casos tanto para las obtenidas con las enzimas en estudio como con las comerciales, pero no fue así en cuanto al contenido de grupos urónicos presentes en el MIE. De las enzimas analizadas, sólo PGI presentó buenas condiciones de extracción de pectina conservando su estructura molecular y, por lo tanto, obteniendo importantes cantidades de MIE y una alta eficiencia en cuanto al contenido de AGA presente en el mismo. Las pectinas así obtenidas, presentan excelentes propiedades funcionales resultando ser muy buenos aditivos a la hora de utilizarlas en las distintas industrias que las demandan.

Por otra parte, también quedó confirmado que la extracción química, al utilizar condiciones agresivas durante el proceso, produce una mayor liberación de grupos metoxilos (disminuyendo el GE) y una significativa despolimerización de la pectina aumentando el contenido de los componentes de menor peso molecular cuya presencia hace que tanto el rendimiento como las propiedades del producto obtenido se vean negativamente afectadas. Además, al considerar que los ácidos utilizados ocasionan corrosión del equipamiento y que los residuos generan altos índices de contaminación en virtud de su acidez y alto contenido en materia orgánica, la extracción enzimática se vuelve más interesante.

3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anthon, G. E., & Barrett, D. M. (2008). Combined enzymatic and colorimetric method for determining the uronic acid and methylester content of pectin: application to tomato products. *Food chemistry*, 110(1), 239-247.
- Aponte, L., & Guadarrama, A. (2003). Actividad de las enzimas pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y celulasa durante la maduración de frutos de parchita maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa Degener*). *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)*, 29(2), 145-160.
- Baker, R. A. (1994). Potential dietary benefits of citrus pectin and fiber. *Food Technology*, 48(11), 133-139.
- Bermudez, G. S. U. (2003). Obtencion y caracterizacion de pectinas de alto y bajo metoxilo de la manzana, variedad Pachacamac. *Revista-sociedad quimica del Perú*, 69(3), 155.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, 54(2), 484-489.
- Camejo de Aparicio, C., Ferrer, A., Ferrer, B. D., Peña, J., & Cedeño, M. (1996). Extracción y caracterización de pectina en limones injertados de la Región Zuliana. *Revista-Facultad de Agronomía*. Universidad del Zulia (Venezuela). 13(5), 641-645.
- Carré, M. H., & Haynes, D. (1922). The estimation of pectin as calcium pectate and the application of this method to the determination of the soluble pectin in apples. *Biochemical Journal*, 16(1), 60.
- Contreras Esquivel, J. C., Hours, R. A., Aguilar, C., Reyes Vega, M. L. & Romero, J. (1997). Revisión: Extracción microbiológica y enzimática de pectina. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 47, 208-216.
- Contreras Esquivel, J. C. (2003). Purificación y caracterización de enzimas solubilizadoras de pectina de *Aspergillus kawachii*. (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata).
- Contreras Esquivel, J.C. and Voget, C.E. (2004). Purification and characterization of endopolygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal of Biotechnology*, 110:21-28.

- D'Addosio, R.; Páez, G.; Marín, M.; Mármol, Z.; Ferrer, J. (2005). Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa Degener*). *Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia*, 22(3), 240-249.
- De Bruijn, J., & Biekman, E. (1998). Maceracion enzimatica de papas: influencia de las condiciones de reaccion. *Agro-Ciencia*. v, 14(2), 245-250.
- Forni, E., Penci, M., & Polesello, A. (1994). A preliminary characterization of some pectins from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.) and prickly pear (*Opuntia ficus indica*) peel. *Carbohydrate polymers*, 23(4), 231-234.
- Gautam, D. R., Sharma, T. R., & Chauhan, J. S. (1986). Suitability of some low and high-chilling apple cultivars for juice processing and pectin extraction. *Advances in research on temperate fruits*. Bhutani, V. P., Kaul J.L (Eds.). University of Horticulture and Forestry.
- Hwang, J., Pyun, Y. R., & Kokini, J. L. (1993). Sidechains of pectins: some thoughts on their role in plant cell walls and foods. *Food hydrocolloids*, 7(1), 39-53.
- Kim, D. H., Kim, D. G., Lee, D. Y., Kim, K. E., & Kim, C. W. (2000). Physicochemical characterization of pectin extracted from cheju mandarin (*Citrus unshiu*) peels with citric acid. *Food Science and Biotechnology*, 9(2), 95-98.
- Knee, M. (1973). Polysaccharide changes in cell walls of ripening apples. *Phytochemistry*, 12(7), 1543-1549.
- Koubala, B. B., Kansci, G., Mbome, L. I., Crépeau, M. J., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2008). Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Améliorée” and “Mango” mango peels. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1345-1351.
- Martin-Cabrejas, M. A., Waldron, K. W., Selvendran, R. R., Parker, M. L., & Moates, G. K. (1994). Ripening-related changes in the cell walls of Spanish pear (*Pyrus communis*). *Physiologia Plantarum*, 91(4), 671-679.
- Masmoudi, M., Besbes, S., Chaabouni, M., Robert, C., Paquot, M., Blecker, C., & Attia, H. (2008). Optimization of pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice using response surface methodology. *Carbohydrate polymers*, 74(2), 185-192.

- McCleary, B.V. (1986). Enzymatic modification of plant polysaccharides. *International Journal Biol. Macromol.* 8:354-349.
- Money, R. W., & Christian, W. A. (1950). Analytical data of some common fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1(1), 8-12.
- Nakamura, T., Hours, R. A. & Sakai, T. (1995). Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science*, 60, 468-472.
- NMX-F-347-S-1980. Norma Mexicana. Secretaria de comercio y fomento industrial. Frutas y Derivados. Determinación de pectina.
- Panchev, I. N., Kirtchev, N. A., & Kratchanov, C. (1989). Kinetic model of pectin extraction. *Carbohydrate polymers*, 11(3), 193-204.
- Pilnik, W., & Voragen, A. G. J. (1970). Pectic substances and other uronides. *Biochemistry of fruits and their products*, v. 1, 53-87.
- Proctor, A., & Peng, L. C. (1989). Pectin transitions during blueberry fruit development and ripening. *Journal of Food Science*, 54(2), 385-387.
- Reiser, S. (1987). Metabolic effects of dietary pectins related to human health. *Food technology*. 41(2): 91-99.
- Rojas, N. L. (2009). Enzimas fúngicas extremófilas de aplicación biotecnológica: producción y caracterización de ramnosidasas alcalofílicas de *Acremonium murorum* y *Acrostalagmus luteo-albus* y poligalacturonasa acidofílica de *Aspergillus kawachii* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina).
- Rojas, N. L., Ortiz, G. E., Chesini, M., Baruque, D. J., & Cavalitto, S. F. (2011). Optimization of the production of polygalacturonase from *Aspergillus kawachii* cloned in *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 49(3), 316-321.
- Romero, P. (1997). Influencia del Estado de madurez en el contenido de Pectina y de minerales en Guayaba (*Psidium guajava L.*) de la región Zuliana. (Doctoral dissertation, Universidad del Zulia, Maracaibo).

- Royo Iranzo, J. (1980). Preparación de corteza seca de mandarina, toronja, naranja amarga y limón para la obtención de pectina a partir de variedades cultivadas en España. *Revista de agroquímica y tecnología de alimentos*, 20(3), 399-402.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. & Vandamme, J. (1993). Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39, 213-294.
- Schols, H. (1995). Structural characterization of pectic hairy regions isolated from apple cell walls. Tesis. Wageningen Agricultural University.
- SENASA. (2011). Anuario Estadístico 2011. Centro Regional Patagonia Norte. <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1567&io=21783>
- Sinclair, W. B., & Crandall, P. R. (1949). Carbohydrate fractions of lemon peel. *Plant physiology*, 24(4), 681.
- Sindoni, M., Hidalgo, P. R., Castellano, G., Núñez, K., Burgos, M. E., & Méndez, R. R. (2013). Efecto de dos fases de maduración sobre la cantidad de pectina obtenida en dos variedades de parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa Degener*) de diferente procedencia. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 14(2), 93-100.
- Téllez, L. M. B., Juárez, B. Y., & Flores, H. E. M. (2008). Efecto del almacenamiento sobre algunas propiedades físico-químicas en frutos de guayaba (*Psidium guajava*). *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 10(1), 87-93.
- Ueno, H., Tanaka, M., Hosino, M., Sasaki, M., & Goto, M. (2008). Extraction of valuable compounds from the flavedo of Citrus junos using subcritical water. *Separation and Purification Technology*, 62(3), 513-516.
- Voragen, A. G., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A., & Renard, C. (1995). Pectins. *Food polysaccharides and their applications*, 287-339.
- Willats, W. G., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97-104.
- Yamada, H. (1994). Pectic polysaccharides from chinese herbs: structure and biological activity. *Carbohydrate Polymers*, 25:269-276.

Yuste, J., & Garza, S. (2003). Los geles de pectina y su aplicación en la industria alimentaria. *Alimentaria*, (342), 93-98.

Zapata Zapata, A. D. (2008). Protopectinasa SE de *Geotrichum klebahnii*: producción, purificación y aplicación al proceso de maceración de tejidos vegetales y extracción enzimática de pectina (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata).

Zapata Zapata, A. D., Cavalitto, S. F. & Hours, R. A. (2009). Evaluación de la capacidad de solubilización de pectina de cáscara de limón usando protopectinasa-SE. *Vitae*, 16(1), 67-74.

CAPITULO 4

MACERACIÓN DE TEJIDOS DE ZAPALLO Y MANZANA: APLICACIÓN DE PPASA-SE DE *G. klebahnii* Y PGZYME DE *A. sojæ*.

RESUMEN

Tal cual se describió en la introducción general, la pectina se concentra, en forma de protopectina insoluble, en la pared celular secundaria de plantas superiores actuando como cemento entre las células. La acción de las pectinasas sobre protopectina permite la maceración de los tejidos vegetales, obteniéndose células independientes o en pequeños acúmulos que en su mayoría mantienen su integridad, conservando de esa forma muchos de sus compuestos intracelulares, los que se ven protegidos del medio extracelular. Varios de dichos componentes presentan beneficios directos para la salud, actuando principalmente como antioxidantes. Por el contrario, en los procesos de maceración química o mecánica se produce un alto nivel de ruptura celular, lo que significa que las propiedades funcionales de los tejidos se ven afectadas negativamente. En esta parte del trabajo se analizó la maceración enzimática de tejidos de zapallos (*Cucurbita moschata*) y de la variedad Red Delicious de manzanas de la producción frutihortícola del Alto Valle de Río Negro, utilizando protopectinasa-SE (PPasaSE) de *Geotrichum klebahnii* y PGzyme de *Aspergillus sojae*. En primera instancia, se evaluó el efecto de la concentración enzimática sobre el proceso, encontrándose como actividad final óptima 40 U en la mezcla de reacción tanto para PPasaSE como para PGzyme. Además, se concluyó que la acción de la enzima está limitada por la superficie del sustrato macerable. Para evaluar la capacidad de maceración de ambas enzimas se compararon sus rendimientos con los obtenidos con pectinasas comerciales (BA, J1 y J2). PPasaSE y PGzyme se comportaron de igual o mejor forma que las enzimas comerciales, alcanzándose con ambas un rendimiento en el proceso de ~ 35% y 20% en la fracción de tejido macerado (TM) para los zapallos y manzanas, respectivamente. Debido al creciente interés sobre los compuestos fitoquímicos, que presentan beneficios directos sobre la salud, se decidió determinar la composición y actividad antioxidante de los productos obtenidos en el TM y en el sobrenadante (S). A fin de verificar las ventajas de la maceración enzimática sobre la mecánica, se compararon las concentraciones de los compuestos luego de cada uno de los tratamientos. Los resultados mostraron un mayor contenido de azúcares reductores y ácidos urónicos (sustancias pécticas) en el S en todos los casos. El TM de zapallo mostró una actividad antioxidante y un contenido en fenoles totales mayor en el S, demostrando tener una mayor proporción de células dañadas. La actividad antioxidante y el contenido en fenoles totales en las fracciones de TM y S para manzana resultaron similares. Esto indicaría que una fracción alta de células mantuvo su estructura

intacta. A partir de estos resultados, puede concluirse que la manzana es mejor sustrato para utilizarlo en la maceración enzimática otorgando un producto de buena calidad nutricional. También se logró asociar positivamente el contenido de fenoles totales a la actividad antioxidante. Y se comprobó que las maceraciones mecánicas produjeron con ambos vegetales, productos de baja calidad nutricional, dejando en evidencia las bondades de los procesos enzimáticos.

4.1. INTRODUCCIÓN

La maceración enzimática es el proceso por medio del cual se logra la desorganización de tejidos vegetales para conseguir células independientes de forma intacta, con el fin de producir pulpas de frutas y vegetales que se utilizan como ingredientes en alimentos para bebés y ancianos. Al mantenerse la integridad celular, muchos de los compuestos intracelulares, entre los cuales se cuentan; carotenoides, vitaminas (C, B₆, B₉ y E) y compuestos fenólicos (flavonoides, cinamatos y taninos) (Aranceta 2003) son protegidos del O₂, luz y demás factores que puedan degradarlos; conservándose por más tiempo. Todos estos compuestos poseen beneficios directos sobre la salud.

Actualmente hay un creciente interés por los llamados alimentos funcionales, aquellos que presentan un rol importante en el mantenimiento de la salud humana, más allá de su valor nutricional directo. Estos compuestos, si son derivados de plantas, se conocen como fitoquímicos. Los fitoquímicos de las frutas y las verduras tienen una fuerte actividad antioxidante. Su uso posee actualmente sumo interés para las industrias de alimentos y cosmética. La actividad antioxidante inhibe, a partir de diferentes mecanismos, los fenómenos oxidativos causados por los radicales libres sobre los tejidos orgánicos. Estos fenómenos oxidativos pueden ocasionar rancidez en los alimentos y pérdidas en su almacenamiento, así como daños directos a la salud humana, promoviendo diferentes tipos de enfermedades crónicas, como por ejemplo cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, etc., además de aceleración en los procesos normales de envejecimiento (Choksi *et al.* 2004). Estas razones han llevado a la necesidad de estudiar procedimientos para incorporar estos compuestos a la dieta, ya que los mismos suelen sufrir un fuerte deterioro durante el almacenamiento y procesamiento de los alimentos.

Como una forma de favorecer la conservación de los compuestos bioactivos en preparados vegetales, la maceración enzimática puede resultar ventajosa con respecto al tratamiento mecánico tradicional. Las PPasas pueden ser utilizadas para degradar la laminilla media, actuando específicamente sobre la protopectina (Nakamura *et al.* 1995). Como resultado se pueden obtener preparados formados por cúmulos de células simples (hasta 3-4) y, de esta forma, proveer una nueva clase de ingrediente de uso en la formulación de alimentos (Voragen & Pilnik 1989, Sakai *et al.* 1993, Biely & Kremmicky 1998). La PPasa-SE de *G. klebahnii* tiene la capacidad de hidrolizar restringidamente la protopectina presente en los tejidos, liberando pectina soluble con la consiguiente separación de las células sin producir mayores daños (Sakamoto *et al.* 1995, Nakamura *et*

al. 1995). Por el contrario, los procesos de maceración mecánica causan una alta rotura celular, lo que significa que las propiedades nutricionales de los tejidos se ven afectados negativamente.

La maceración enzimática depende fundamentalmente de dos acciones combinadas. La primera es el ataque de enzimas sobre la lámina media de los tejidos (o material cementante), la cual está compuesta principalmente de protopectina (sustancia péctica insoluble) y otros polisacáridos estructurales. La segunda es una adecuada agitación, la cual debe generar el suficiente esfuerzo de corte como para minimizar las fuerzas de atracción entre las células y así promover su separación, sin generar rompimiento celular de tal forma que se deteriore la calidad del producto obtenido (Biekman 1992).

En el presente capítulo se evaluó la capacidad de maceración de PPasaSE de *G. klebahnii* y de PGzyme de *A. sojae* sobre tejidos de zapallos (*Cucurbita moschata*) y de la variedad Red Delicious de manzanas de la producción frutihortícola del Alto Valle de Río Negro, observando el efecto de la concentración enzimática en dicho proceso. Esos tejidos fueron seleccionados por su alto potencial de aplicación en la producción de alimentos funcionales para niños y ancianos. Particularmente, la manzana es considerada como una de las principales fuentes de antioxidantes de la dieta, principalmente compuestos fenólicos, y vitaminas esenciales, como la vitamina C (Boyer y Liu 2004, Dobrzanski *et al.* 2006). En cuanto al zapallo, la capacidad antioxidante se debe principalmente a su alto contenido de β -carotenos; además, contiene vitamina C y polifenoles que favorecen esta capacidad (Della Gaspera 2013, Zaccari *et al.* 2015). Como una forma de control del proceso de maceración, se midió la actividad antioxidante de los productos obtenidos y se determinó la concentración de algunos compuestos presentes, entre ellos algunos compuestos fitoquímicos con conocidos beneficios directos para la salud que pueden influir en la actividad antioxidante detectada.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Reactivos químicos

Los siguientes reactivos: 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio (ABTS), persulfato de potasio ($K_2O_8S_2$), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-carboxil (Trolox), el reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido poligalacturónico (APG) y ácido galacturónico monohidrato (AGA) fueron adquiridos comercialmente de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo); Aldrich (MI); o Merck (Dramstad). Todos los demás reactivos empleados son de grado analítico y están comercialmente disponibles.

4.2.2 Fuentes de enzimas

Se utilizaron los protocolos detallados en el Capítulo 3 para producir las enzimas PPasa-SE de *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae*.

Además, se emplearon las enzimas comerciales descritas en el mismo Capítulo.

4.2.3 Tejidos vegetales

La maceración se realizó sobre tejidos de zapallos y de manzanas de la variedad Red Delicious de la producción frutihortícola del Alto Valle de Río Negro. Estos tejidos fueron seleccionados por su alto potencial de aplicación en la producción de alimentos funcionales para niños y ancianos. Los frutos se adquirieron del mercado regional y se eligieron aquellos que resultaban frescos y de similar madurez con el fin de poder reproducir de forma correcta todos los ensayos. Los mismos fueron cuidadosamente lavados antes de la realización de los ensayos.

4.2.4 Evaluación de la capacidad de maceración de PPasaSE de *G. klebahnii* y de PGzyme de *A. sojiae* sobre tejidos de zapallo y manzana

4.2.4.1 Efecto de la concentración enzimática sobre el proceso de maceración

En ambos casos, se utilizó el tejido vegetal sin considerar la cáscara y se cortó en pequeños cilindros de 4 mm (diámetro) y 5 mm (longitud) con la ayuda de un sacabocados. A 3 g de dichos cilindros se le agregaron 5 mL de solución *buffer* BCP a pH 4. Después de agitarlos por 1 h en un shaker con agitación recíproca y baño térmico de agua JEIO Tech BS-11 a 185 golpes / min a 30 °C, se agregó 5 ml de cada enzima (PPasaSE y PGzyme) diluida convenientemente a fin de lograr una actividad poligalacturonasa en la solución final de 5, 15, 30, 40, 120 y 250 U; y se continuó agitando durante 3 h en las mismas condiciones. Finalmente, el tejido no macerado (TNM) se separó mediante retención en un tamiz Tyler de malla N° 20, y el TM del S fue separado por centrifugación a 4000 rpm durante 15 min. Las tres fracciones se secaron en un horno a 60 °C hasta peso constante.



Figura 4.1. Shaker con agitación recíproca y baño térmico de agua JEIO Tech BS-11 utilizado para realizar las maceraciones.

4.2.4.2 Comparación con la capacidad de maceración de pectinasas comerciales

Una vez determinada la actividad enzimática óptima para la maceración, se continuaron los ensayos con dicha actividad para calcular el rendimiento del proceso.

Para evaluar las capacidades de maceración de PPasa y PGzyme, se compararon los rendimientos obtenidos con las mismas, con los obtenidos con las pectinasas comerciales (BA, J1 y J2). Se utilizó la misma metodología descrita anteriormente.

El rendimiento de cada una de las tres fracciones obtenidas, a saber: tejido macerado (TM), sobrenadante (S) y tejido no macerado (TNM), se expresó como porcentaje en peso seco de la fracción, con respecto al peso seco del tejido original (% p/p).

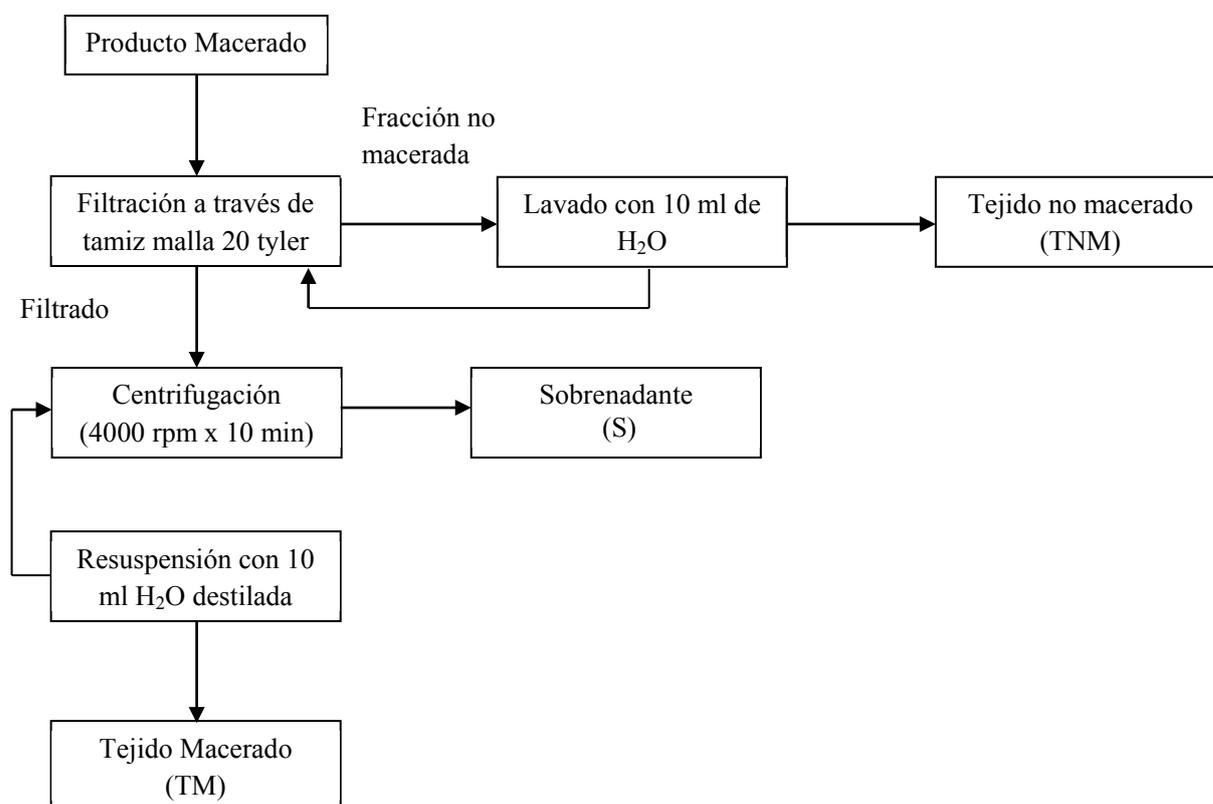


Figura 4.2. Esquema de la metodología utilizada para la maceración enzimática.

4.2.5. Medida de la actividad enzimática

Se utilizó el método reportado en el Capítulo 2.

4.2.6 Análisis de la calidad de los productos obtenidos a partir de la maceración enzimática y mecánica

Se determinó la actividad antioxidante y la composición del TM y S obtenidos durante la maceración de zapallo y manzana. Al TM se le hizo una extracción con etanol al 96 % (p/v) en relación 1 a 1, agitando vigorosamente para desintegrar las células y liberar al medio los compuestos intracelulares. Las mediciones realizadas al S fueron hechas sin ningún tipo de tratamiento previo.

4.2.6.1 Maceración mecánica

Para macerar mecánicamente los tejidos de zapallo y manzana se utilizó un procesador manual doméstico. Los mismos fueron trozados sin cáscara y sin semillas para luego ser procesados. Se utilizaron proporcionalmente los gramos de tejido y el *buffer* para mantener las relaciones del ensayo enzimático. El tratamiento posterior fue el mismo que el empleado en la extracción enzimática.

En este caso no se evaluó el rendimiento del proceso, sino que se analizó la calidad de los productos logrados para poder compararlos con la calidad de los obtenidos con la maceración enzimática.

4.2.6.2 Determinación de Ácidos urónicos

Se utilizó el método descrito en el Capítulo 4.

4.2.6.3. Evaluación de la actividad antioxidante por el método del radical ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio)

El método se basa en la reacción de 10 μ L de muestra con 990 μ L de solución del radical ABTS^{•+} (preparado por oxidación de ABTS con $K_2O_8S_2$) en *buffer* fosfato de Na (100 mM, pH 7.4), durante 30 min. Luego de la incubación, se determina la disminución de

la absorbancia a 732 nm asociada a la reducción de la concentración de $ABTS^{\bullet+}$ (Re *et al.* 1999). Los resultados se expresaron en actividad antioxidante en equivalentes de Trolox (TEAC).

Este ensayo se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical $ABTS^{\bullet+}$, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$ es un cromóforo que absorbe a $\lambda = 415$ ó 734 nm, y se genera por una reacción de oxidación del ABTS con persulfato de potasio (Re *et al.* 1999). La estructura del radical y la reacción que describe el proceso se muestra en la Figura 4.3.

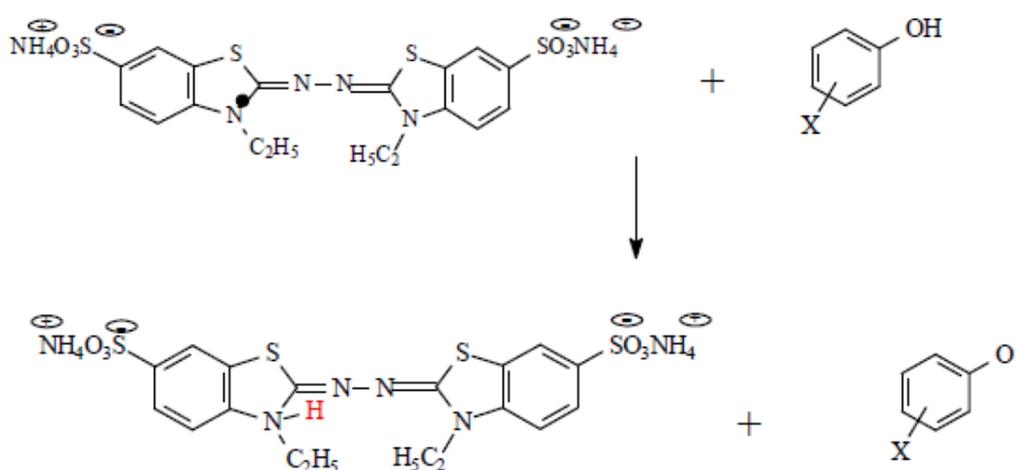


Figura 4.3. Estructura del radical $ABTS^{\bullet+}$ y mecanismo de acción antioxidante (Zapata Zapata 2008).

4.2.6.4. Determinación de Fenoles Totales

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Dewanto *et al.* 2002). A 1 mL de extracto diluido se adicionó 125 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu y 625 μ L de agua destilada y se dejó por 6 min. Luego se adicionaron 1,25 mL de solución de Na_2CO_3 (7 % p/v) y 1,0 mL de agua, manteniendo 90 min a temperatura ambiente, para luego leer la A_{760} , usando agua destilada como blanco. Para la curva patrón se usó ácido gálico como estándar. Los resultados fueron expresados en mg de ác. gálico/g de extracto.

4.2.6.5. Determinación de Azúcares reductores

Se determinó mediante el método Somogyi-Nelson (Somogyi 1952) descrito en el Capítulo 2, inciso 2.2.6.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Evaluación de la capacidad de maceración de PPasaSE de *G. klebahnii* y de PGzyme de *A. sojae* sobre tejidos de zapallo y manzana

La capacidad de PPasa-SE de macerar cascara de limón y naranja fue estudiada por Zapata Zapata (2008 y 2012). En esos trabajos se analizaron distintas variables del proceso de maceración enzimática (agitación – tipo de *buffer* – tiempo de reacción - temperatura) con PPasa-SE, obteniéndose de esta manera las condiciones óptimas para su realización.

La agitación es una variable de fundamental importancia en los procesos de maceración. Un bajo nivel de agitación impide la adecuada separación celular pero, por el contrario, niveles demasiado altos de agitación mejoran la separación, pero con riesgo de alta ruptura celular. Tradicionalmente se utilizan dos tipos sistemas: a) agitación orbital (Bateman 1968, Sato 1968, Ishii 1984, De Bruijn & Biekman 1998), y b) agitación recíproca (Biekman 1992, Nakamura et al. 1995). Con este último sistema se obtienen mayores rendimientos de TM, por causa del mayor esfuerzo de corte que sufre el tejido, el cual influye sobre el proceso de maceración de tejidos vegetales. Los resultados de Zapata Zapata coinciden con esta información mostrando que los mejores rendimientos en la maceración se obtuvieron con agitación recíproca a 200 golpes/min. Este valor coincide con otros trabajos realizados en papa (Carné *et al.* 2005), zanahoria (Nakamura *et al.* 1995) y pomelo (Sainz 2008). El shaker JEIO Tech BS-11 empleado para la maceración tiene agitación recíproca pero su máximo potencial es 185 golpes/min, por lo tanto, ese fue el valor empleado.

También, en los ensayos de Zapata Zapata, se determinó como condición óptima el empleo del *buffer* citrato. Como fuera mencionado en el Capítulo 3, este *buffer* junto al BCP podrían presentar mejores rendimientos debido al efecto quelante del ácido cítrico sobre los iones Ca^{2+} , lo que favorece la solubilización de pectina y la separación de las células (Bateman 1968, Sato 1968, Fry 1986, De Bruijn & Biekman 1998). Se decidió trabajar con el *buffer* BCP. Al igual que en el Capítulo 3, a pesar de que el pH óptimo determinado en estos estudios para PPasa-SE fue de 5, se decidió utilizar un pH de 4 ya que se disminuye la posibilidad de contaminaciones.

En cuanto al tiempo de reacción, se determinaron como óptimas 3 horas del proceso de maceración para PPasaSE, sumado a que reportes bibliográficos indican que, bajo

determinadas condiciones, a las 3 horas se alcanza el máximo rendimiento en la maceración. Si se extiende el tiempo de proceso, no se produce un incremento muy grande de rendimiento y aumenta el daño celular (Sato 1968), por lo tanto, se definió utilizar ese tiempo para todos los ensayos.

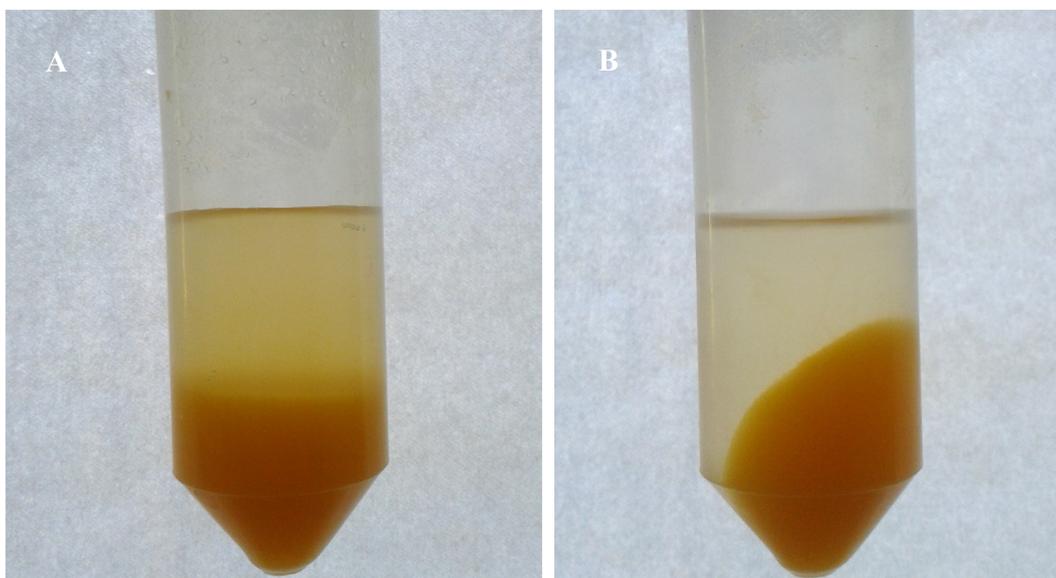


Figura 4.4. Fotografía de S y TM de zapallo. (A) Sin centrifugación. (B) Centrifugado.

4.3.1.1 Efecto de la concentración enzimática sobre el proceso de maceración

Cuando se estudió el efecto de la concentración enzimática de PPasa-SE y PGzyme en la maceración de zapallo utilizando las condiciones de reacción previamente descritas, los resultados mostraron que el rendimiento de la maceración fue proporcional a la actividad enzimática añadida a la mezcla hasta 40 U para PPasa- SE, mientras que para PGzyme se observa, además, un aumento en el caso del uso de 120 U totales.

Al utilizar PPasa-SE y una actividad de 40 U, se observa un rendimiento 35% mayor que a 5 U, 15% mayor que a 15 U y 5% mayor que a 30 U.

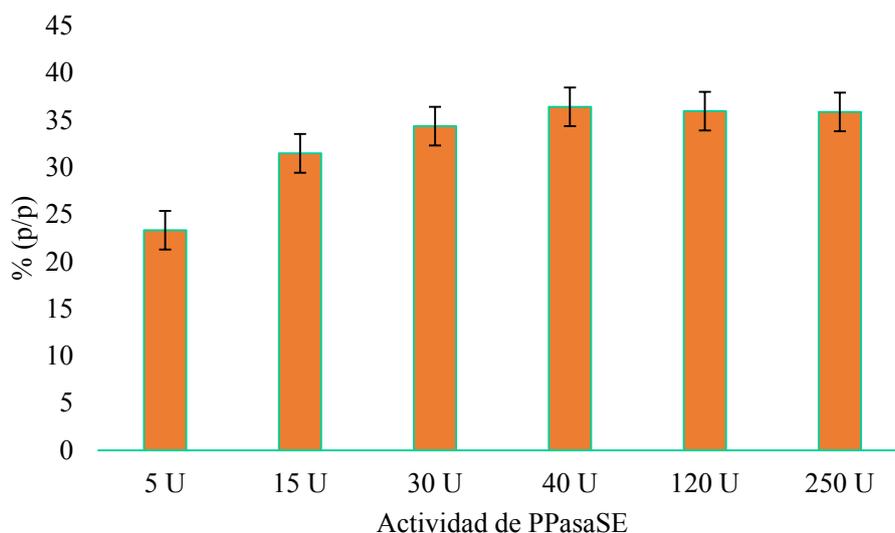


Figura 4.5. Tejido macerado de zapallo obtenido con PPasa-SE a 5, 15, 30, 40, 120 y 250 U de actividad expresado en % TM en base seca con respecto al peso seco del tejido original. Humedad 90%.

De manera similar con la enzima PGzyme sobre el mismo sustrato y una actividad de 40 U, se obtuvo una concentración de tejido macerado 45% más alta que a 5 U, 30% más alta que a 15 U y 20% más alta que a 30 U.

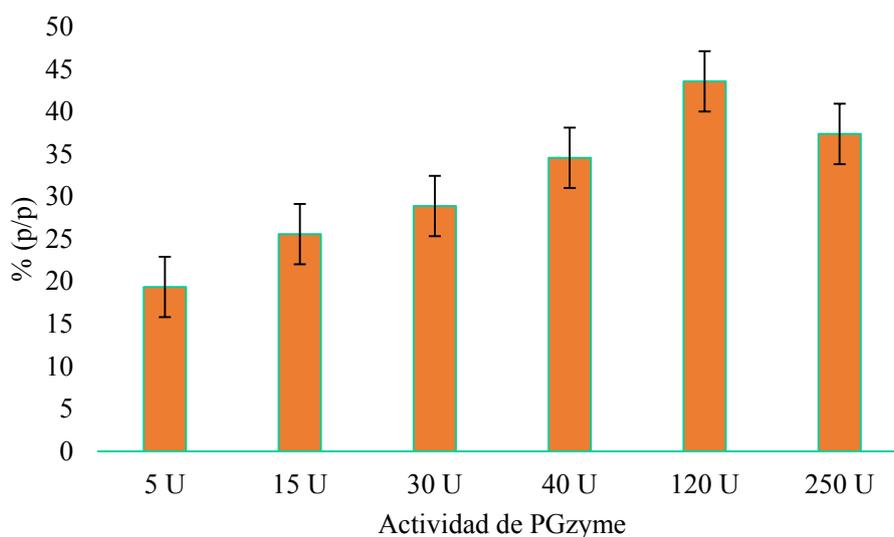


Figura 4.6. Tejido macerado de zapallo obtenido con PGzyme a 5, 15, 30, 40, 120 y 250 U de actividad expresado en % TM en base seca con respecto al peso seco del tejido original. Humedad 90%.

Durante la maceración de los tejidos de manzana el rendimiento, nuevamente, fue proporcional a la actividad enzimática añadida a la mezcla hasta 40 U con ambas enzimas.

Con PPasa-SE y una actividad de 40 U, dió un rendimiento de maceración un 85% mayor que a 5 U, 70% mayor que a 15 U y 50% mayor que a 30 U.

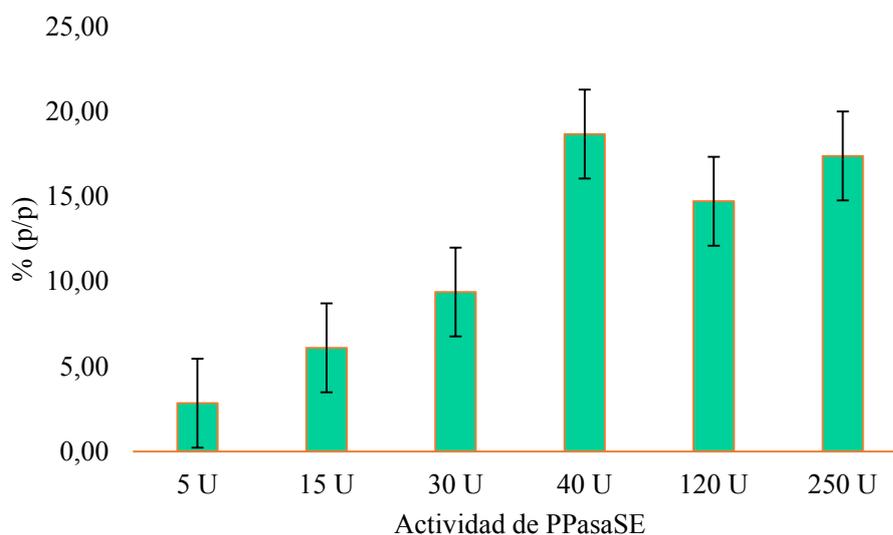


Tabla 4.7. Tejido macerado de manzana obtenido con PPasaSE a 5, 15, 30, 40, 120 y 250 U de actividad expresado en % TM en base seca con respecto al peso seco del tejido original. Humedad 85%.

De manera similiar con la enzima PGzyme sobre el mismo sustrato y una actividad de 40 U, se obtuvo una concentración de tejido macerado 85% más alta que a 5 U y aproximadamente 30% más alta que a 15 y 30 U.

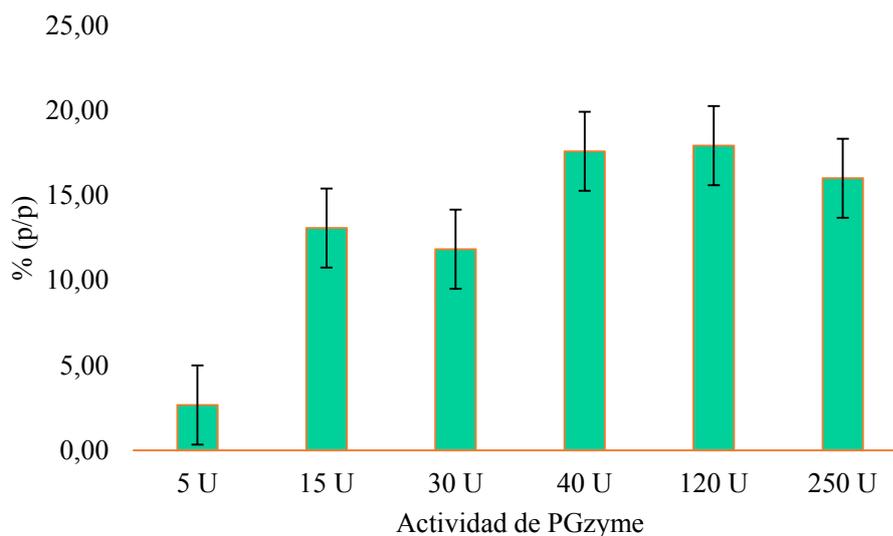


Tabla 4.8. Tejido macerado de manzana obtenido con PGzyme a 5, 15, 30, 40, 120 y 250 U de actividad expresado en % TM en base seca con respecto al peso seco del tejido original. Humedad 85%.

Considerando a las manzanas, se observa que con ambas enzimas se necesita una mayor concentración para producir una apreciable maceración de los tejidos, en comparación con el zapallo, ya que existe una diferencia más importante que en el zapallo entre el rendimiento a 5 y 15 U, y el rendimiento a 40 U. En el caso de los zapallos, el aumento del tejido macerado alcanzado es más gradual.

En todos los gráficos se puede apreciar como a partir de 40 U de actividad enzimática, se obtiene una meseta en los rendimientos logrados durante las maceraciones. Este efecto podría demostrar que la acción de la enzima está limitada por la superficie del sustrato macerable, corroborando de esta manera diferentes reportes bibliográficos que indican que en los procesos de catálisis heterogénea sólo actúa la enzima adsorbida al material sólido (McLaren y Packer 1970, Cavalitto *et al.* 1999). Tal como se indicó anteriormente, sólo en el caso del zapallo macerado con PPasaSE a 120 U se observa un aumento del rendimiento de aproximadamente el 10% del obtenido a 40 U. Analizando que este incremento no es muy significativo, y que de 40 a 120 U se triplica la concentración enzimática con el consecuente incremento de los costos del proceso que eso implica, se decidió continuar con las pruebas de maceración con una actividad poligalacturonasa de 40 U para obtener la máxima maceración de los tejidos con la mínima concentración de la enzima.

4.3.1.2 Comparación con la capacidad de maceración de pectinasas comerciales

Se realizó la maceración enzimática de tejidos de zapallo y manzana utilizando las condiciones de reacción previamente descritas y una actividad de 40 U con las enzimas en estudio (PPasa-SE – PGzyme) y con las enzimas comerciales (BA, J1 y J2). El tejido macerado obtenido mostró células intactas microscópicamente en todos los casos. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 4.8. correspondiente al TM del zapallo, se distinguen, además, algunas células dañadas y material intracelular libre. Este efecto se acentuó con J₁ y J₂, presentando una mayor ruptura celular que las enzimas en estudio PPasa-SE y PGzyme, y BA. Estas últimas enzimas por ser PGasas son específicas de las sustancias pécticas y no degradan celulosa, por lo cual las células no se lisan por ese motivo. En ese caso podría ocurrir que al quedar las células más expuestas la agitación sea la responsable de la rotura celular. A diferencia de esto, J₁ y J₂ son pools enzimáticos preparados por la empresa JUGOS S. A. para su uso en la extracción de jugos por lo que es posible que tengan actividad celulasa, que degradan en mayor medida la pared y membrana celular de los vegetales. Con el fin de evaluar la calidad de los distintos productos obtenidos con las maceraciones enzimáticas y mecánicas, y corroborar si la mayoría de los compuestos intracelulares permanecen en el TM, se realizaron diferentes mediciones que se presentan en el inciso 4.3.1.3.

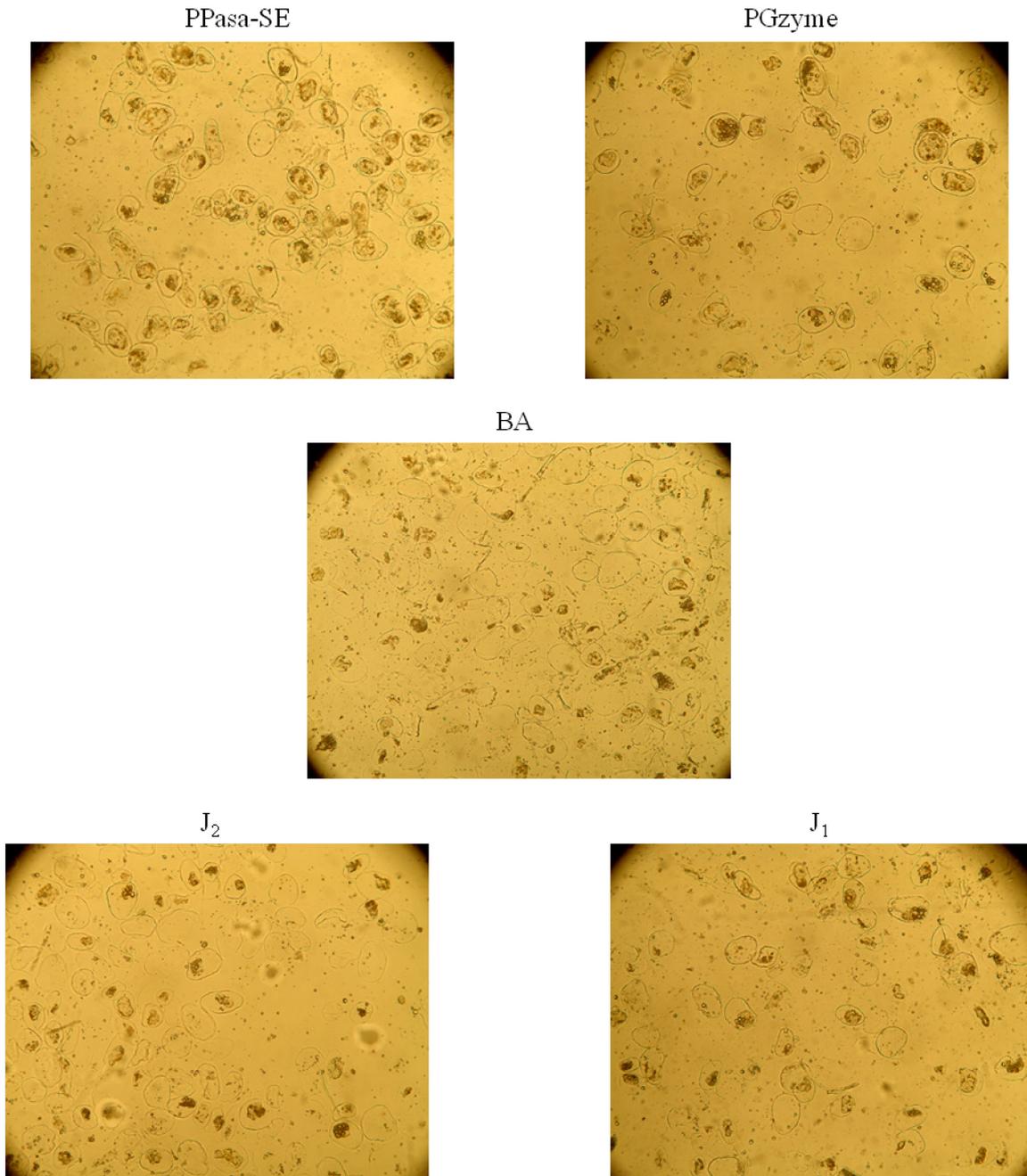


Figura 4.9. Fotografías de células maceradas de zapallo obtenidas con las diferentes enzimas (PPasaSE, PGzyme, BA, J₁ y J₂). Observación al microscopio (100X).

Para evaluar los rendimientos con las distintas enzimas, en principio, se realizaron ensayos control sin enzima con ambos tejidos vegetales, los cuales no mostraron evidencia de maceración. Esto demuestra que la maceración es causada por el efecto combinado de la actividad enzimática y el esfuerzo de corte generado por la agitación.

Usando una actividad de 40 U para todas las enzimas, se pudo observar que PPasa-SE y PGzyme presentaron muy buenas capacidades de maceración. Ambas enzimas trabajan hidrolizando la protopectina de los tejidos, liberando de esta manera pectina soluble, y dando como resultado la separación de las células (Nakamura *et al.* 1995).

En el caso de la maceración de zapallo, Pasa-SE presentó un rendimiento en el TM aproximadamente 15% mayor que el obtenido con J₁ y 20% mayor que con J₂. Con PGzyme se obtuvo un rendimiento en la maceración de alrededor de un 10% más que con J₁ y 15% más que con J₂. Las enzimas en estudio se comportaron de la misma manera que BA.

En cuanto a la maceración de manzana, Pasa-SE presentó un rendimiento en el TM aproximadamente 25% mayor que el obtenido con J₁, 40% mayor que con J₂ y 10% mayor que con BA. En el caso de PGzyme se obtuvo un rendimiento en la maceración de alrededor de un 20% más que con J₁, 40% más que con J₂ y el mismo con respecto a BA.

Comparando el desempeño de las enzimas en estudio, se puede observar que presentan similares capacidades macerantes obteniéndose con PPasa-SE aproximadamente sólo un 5 y un 7% más de TM que con PGzyme en los zapallos y en las manzanas, respectivamente.

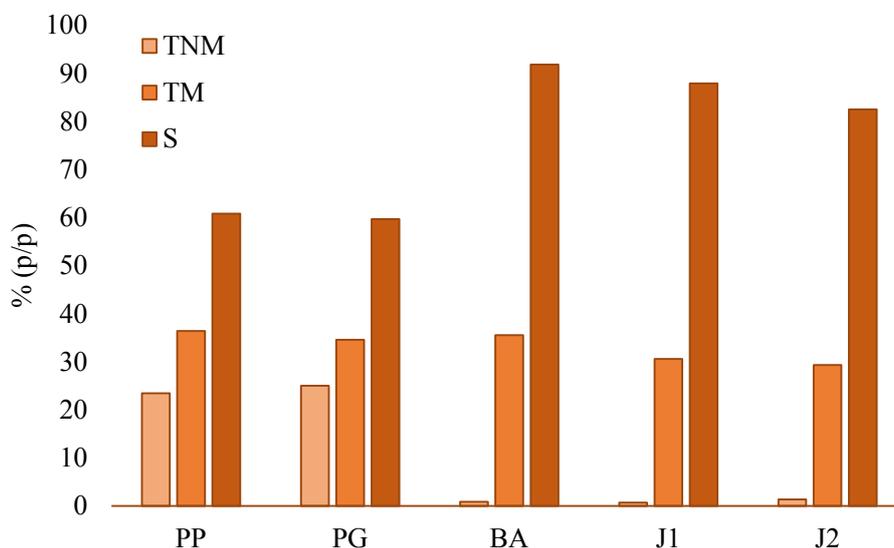


Figura 4.10. Efecto de la aplicación de PPasaSE, PGzyme, BA, J₁ y J₂ al proceso de maceración de tejidos de zapallo. Rendimientos de TNM, TM y S; expresados en % en base seca, con respecto al peso seco del tejido original.

La virtual ausencia de tejido no macerado en los tratamientos con BA (en el caso del zapallo), J1 y J2 reafirman la posibilidad de que las mismas posean otras enzimas degradadoras de pared que completen la acción sobre los tejidos vegetales. Este comportamiento, deseable en el proceso de extracción de jugos, no lo es en el caso de querer mantener las células intactas en un alimento funcional.

Tabla 4.1. Rendimientos de maceración obtenidos a partir de tejidos de zapallo con las diferentes enzimas a 40 U, expresados en gramos de peso seco.

	PPasaSE	PGzyme	BA	J ₁	J ₂
TNM	0.070	0.075	0.003	0.002	0.004
TM	0.109	0.104	0.107	0.092	0.088
S	0.183	0.179	0.276	0.264	0.247
TOTAL	0.362	0.358	0.385	0.358	0.340

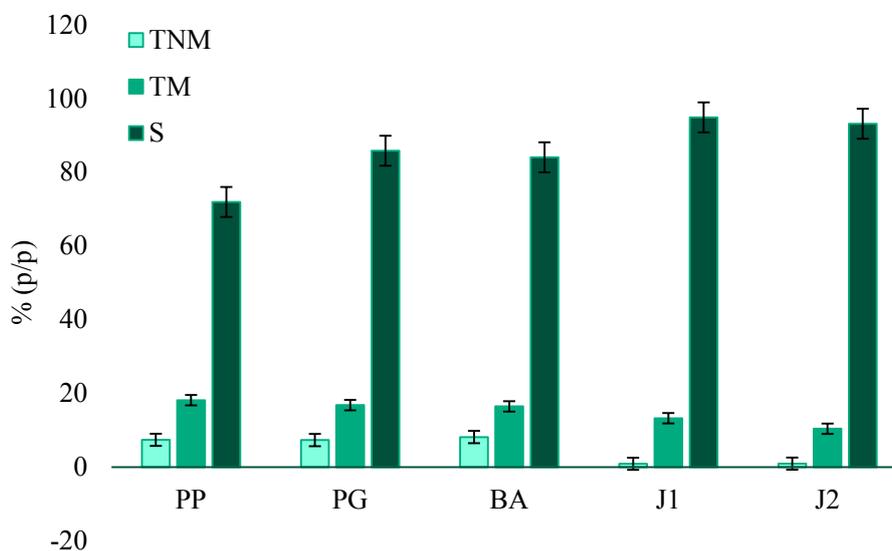


Figura 4.11. Efecto de la aplicación de PPasaSE, PGzyme, BA, J1 y J2 al proceso de maceración de tejidos de manzana. Rendimientos de TNM, TM y S; expresados en % en base seca, con respecto al peso seco del tejido original.

Tabla 4.2. Rendimientos de maceración obtenidos a partir de tejidos de manzana con las diferentes enzimas a 40 U, expresados en gramos de peso seco.

	PPasaSE	PGzyme	BA	J₁	J₂
TNM	0.033	0.033	0.037	0.004	0.004
TM	0.082	0.076	0.074	0.060	0.047
S	0.324	0.386	0.378	0.427	0.419
TOTAL	0.449	0.495	0.489	0.491	0.470

Puede observarse en la Tabla 4.1. que el total obtenido en el caso de los zapallos con todas las enzimas corresponde aproximadamente al 10% del material fresco (0.30 g de zapallo seco), teniendo en cuenta en este caso una humedad del 90%. Lo mismo ocurre en el caso de las manzanas donde puede apreciarse en la Tabla 4.2. que el total obtenido corresponde aproximadamente al 15% del material fresco (0.45 g de manzana seca), teniendo en cuenta en este caso una humedad del 85%.

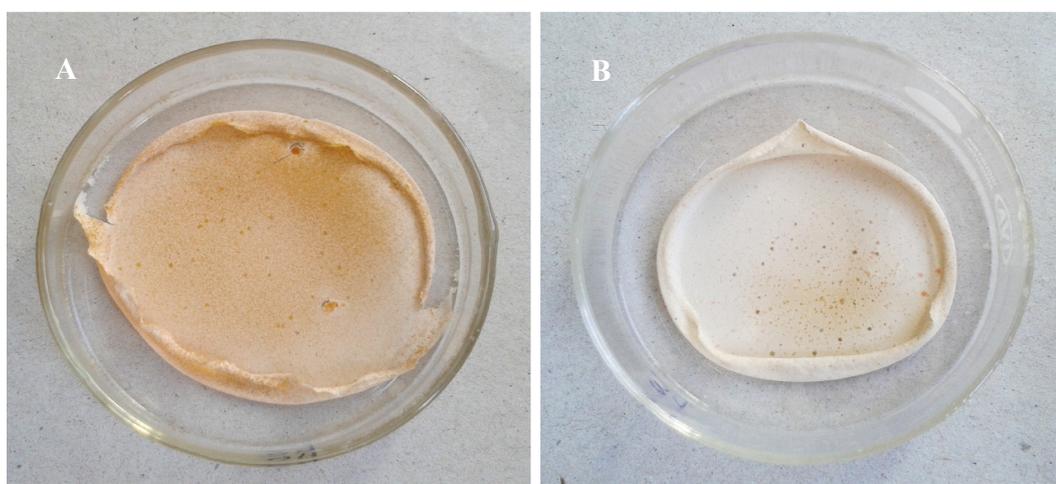


Figura 4.12. Fotografía de TM seco. (A) Zapallo. (B) Manzana.

Cabe destacar que el comportamiento de PPasaSE y PGzyme durante la maceración es más similar al de BA que al de J1 y J2. Nuevamente, esto puede deberse a que J1 y J2 son pools enzimáticos que contienen en su formulación otras pectinasas y celulasas, produciendo estas un mayor daño y generando mayor solubilización de algunos

componentes que aumenten el contenido en el S, ya que el TNM obtenido es muy bajo. En este caso el proceso se semeja mas a una licuefacción que a una maceración.

Se puede observar que, con las enzimas en estudio, el rendimiento en TM en el caso de los zapallos es mayor (~ 35%) que en el de las manzanas (~ 20%). En general, todas las enzimas mostraron un mayor rendimiento con este sustrato demostrando de esta manera una mayor afinidad por el mismo. Estos valores son inferiores al máximo obtenido por Zapata Zapata (2008) que fue 42% con PPasaSE sobre albedo de limón. Por otra parte, PPasaSE y PGzyme dejan un mayor % de TNM con los zapallos en comparación con las otras enzimas y con las manzanas. El % obtenido de S con las manzanas es mayor que con los zapallos. Esto se debe a que las manzanas tienen un mayor contenido de azúcares que se solubilizan luego de la maceración.

4.3.1.3 Análisis de la calidad de los productos obtenidos a partir de la maceración enzimática y mecánica

A las fracciones de TM y S obtenidas por medio de la maceración enzimática y mecánica se les realizaron análisis para evaluar la calidad de las mismas, y poder sacar conclusiones acerca de las bondades de los procesos en cada caso con respecto al daño celular ocasionado.

En primera instancia se analizó la actividad antioxidante mediante el método del radical ABTS^{•+}. A partir de la comparación de los resultados obtenidos en el TM y S de las maceraciones enzimáticas y mecánicas (Figuras 4.13. y 4.14.), se puede mencionar que en los zapallos existe una diferencia muy marcada entre la actividad antioxidante de las dos fracciones, presentando el S mucha mayor actividad en todos los casos. A diferencia de esto, en las manzanas, se observa una actividad elevada e igual en ambas fracciones para todos los casos, excepto para la maceración mecánica en donde se presenta la misma situación que en los zapallos. También se puede señalar que la manzana presenta mayor poder antioxidante que el zapallo, ya que en este último las actividades de las dos fracciones suman aproximadamente 1700 $\mu\text{mol Trolox/l}$ solución y en las manzanas aproximadamente 2100 $\mu\text{mol Trolox/l}$ solución.

Se observa que, a pesar de que la fracción S debería estar formada principalmente por los restos de los compuestos que forman la lámina media del tejido (material péctico,

azúcares y material celulolítico), también mostró una actividad antioxidante importante, la cual podría estar relacionada con compuestos fitoquímicos propios del interior de la célula y que por el rompimiento de las mismas fueron liberados al medio. Además, si la fracción de TM estuviera formada principalmente por células independientes e intactas, encontraríamos allí la mayor proporción de compuestos fitoquímicos intracelulares. La explicación a la igualdad encontrada en el TM y S para las manzanas en cuanto a actividad antioxidante, da idea de que la maceración enzimática, y no así la mecánica, dieron como resultado igual cantidad de células sanas que dañadas. En cambio, en los zapallos el daño celular fue más marcado al igual que en las maceraciones mecánicas con ambos vegetales.

Con el fin de comprobar esta información, se decidió analizar el contenido de fenoles totales para poder explicar los posibles factores que pueden influir en la actividad antioxidante. Además, se evaluó el contenido de material péctico (AGA) y de azúcares reductores para evaluar el grado de degradación celular en las dos fracciones con todos los métodos de maceración empleados.

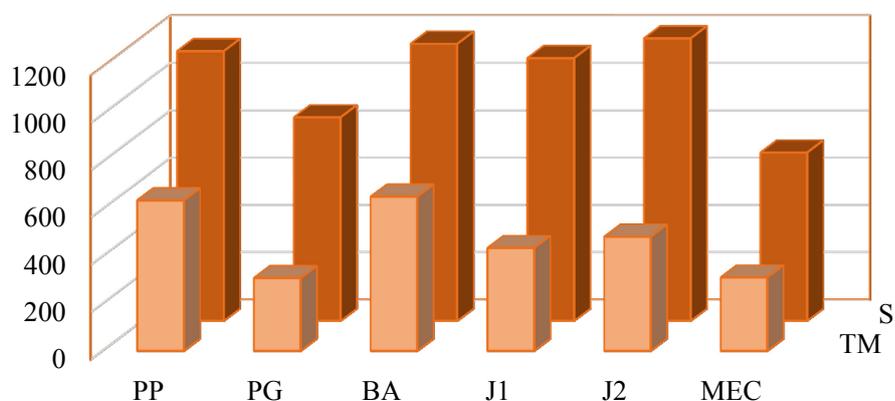


Figura 4.13. Medida de actividad antioxidante en TM y S obtenidos de las maceraciones enzimáticas (PP: PPasaSE – PG: PGzyme – BA – J1 – J2) y mecánicas (MEC) de zapallo usando la metodología del radical ABTS^{•+}. Actividad antioxidante en equivalentes de Trolox (µmol Trolox/l solución).

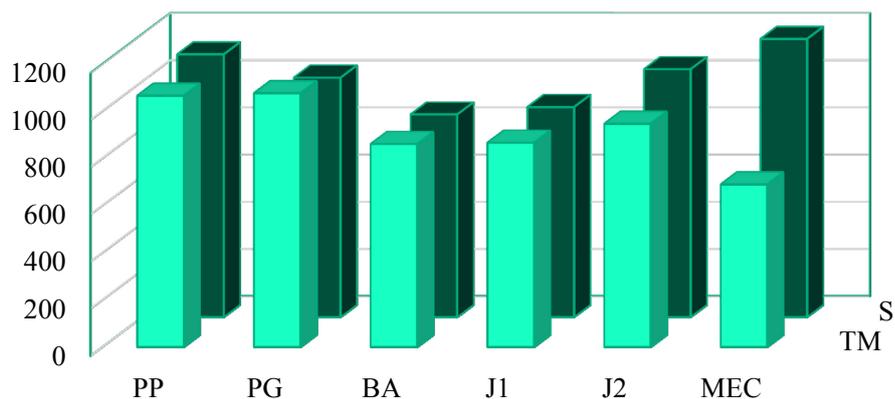


Figura 4.14. Medida de actividad antioxidante en TM y S obtenidos de las maceraciones enzimáticas (PP: PPasaSE – PG: PGzyme – BA – J1 – J2) y mecánicas (MEC) de manzana usando la metodología del radical ABTS^{•+}. Actividad antioxidante en equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol Trolox/l}$ solución).

Existe amplia bibliografía acerca de la correlación positiva entre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales, indicando que los mismos poseen importancia en la actividad existente en los tejidos vegetales.

Al analizar las Figuras 4.15. y 4.16., se concluye que ocurre la misma situación que con la actividad antioxidante. En los zapallos existe una importante diferencia entre el contenido de fenoles totales presentes en las dos fracciones, existiendo una mayor concentración de los mismos en el S. En las manzanas en cambio, se distingue un contenido de fenoles elevado e igual en ambas fracciones para todos los casos, excepto para la maceración mecánica en donde se presenta la misma situación que en los zapallos. Al igual que con la actividad antioxidante, se puede señalar que la manzana presenta un mayor contenido de fenoles totales que el zapallo, ya que en este último los contenidos de las dos fracciones suman aproximadamente $95 \text{ mg } \acute{\text{a}}\text{c. g}\acute{\text{a}}\text{l} \text{ico/l}$ solución y $200 \text{ mg } \acute{\text{a}}\text{c. g}\acute{\text{a}}\text{l} \text{ico/l}$ solución en las manzanas.

Por lo tanto, de acuerdo a las Tablas 4.3. y 4.4., podemos corroborar que el contenido de fenoles totales fue asociado positivamente a la actividad antioxidante total, demostrando que los compuestos polifenoles tienen una contribución significativa a la actividad antioxidante total. Esto mismo fue reportado por otros autores, por ejemplo, Zardo

et al. (2013), Vieira *et al.* (2009) y Wojdyło *et al.* (2008) en manzanas; Cefola *et al.* (2012) en zanahoria y Komes *et al.* (2013) en peras.

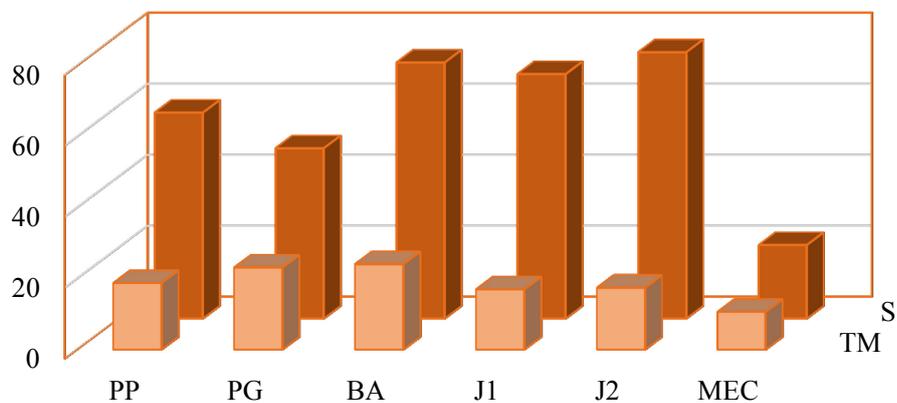


Figura 4.15. Concentración de fenoles totales en TM y S obtenidos de las maceraciones enzimáticas (PP: PPasaSE – PG: PGzyme – BA – J1 – J2) y mecánicas (MEC) de zapallo usando la metodología de Folin-Ciocalteu. Fenoles Totales en mg equivalentes Ác. Gálico (EAG)/l solución.

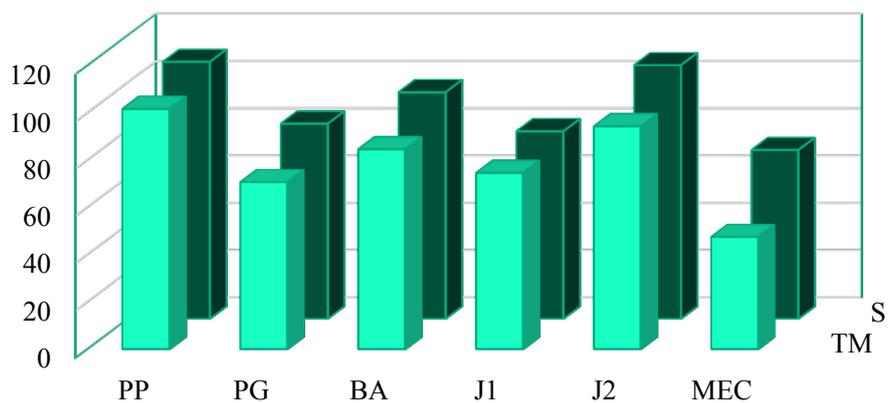


Figura 4.16. Concentración de fenoles totales en TM y S obtenidos de las maceraciones enzimáticas (PP: PPasaSE – PG: PGzyme – BA – J1 – J2) y mecánicas (MEC) de manzana usando la metodología de Folin-Ciocalteu. Fenoles Totales en mg equivalentes Ác. Gálico (EAG)/l solución.

En las Figuras 4.17. y 4.18. puede observarse claramente la comparación entre el contenido de material péctico (medido como AGA) obtenido en el TM y S a partir de las maceraciones enzimáticas y mecánica. En los zapallos se obtuvo una diferencia marcada entre las dos fracciones, existiendo en el S una mayor concentración de AGA. En las manzanas el material péctico en ambas fracciones es similar. Su presencia en los TMs, indica que las células aún tienen adheridas pectina, lo cual es debido a que las enzimas no la solubilizaron en su totalidad. Los contenidos de AGA encontrados en las dos fracciones de manzana suman una concentración de 2.14 g/l, este valor es del orden del contenido de AGA encontrado en el material insoluble en etanol (MIE) de manzana (en promedio 3.68 g/l) reportado en el Capítulo 3. La diferencia se debe a que para la extracción de pectina en dicho Capítulo se utilizó la variedad de manzana Granny Smith, por presentar mayor contenido de pectina, y para la maceración utilizamos manzanas de la variedad Red Delicious. Por lo tanto, las enzimas durante la maceración de las manzanas solubilizaron la mitad del material péctico, pasando éste al S, y la otra mitad quedó retenida en las células presentes en el TM. En los zapallos se obtuvo un contenido importante de pectina solubilizada en el S, y en el TM quedó retenida una cantidad menor. Este dato resulta coherente con el hecho de que, en general, se produce una mayor ruptura celular en el zapallo por lo que los restos de pared puedan pasar al sobrenadante. Este efecto se vio reflejado en la menor actividad antioxidante y el menor contenido de fenoles totales obtenidos en los TM de los zapallos.

El contenido de material péctico encontrado en las fracciones de la maceración mecánica en manzanas, es similar entre sí y del orden de los valores encontrados en las maceraciones enzimáticas. En cambio, en los zapallos la maceración mecánica dio una concentración de AGA mucho mayor en el S. El material péctico retenido en el TM, en este caso, es aproximadamente la mitad del retenido en el TM obtenido enzimáticamente. Evidentemente la maceración mecánica en zapallo produce una mayor solubilización de la pectina. Este hecho, sumado a que la rigidez en los vegetales esta dada principalmente por el contenido de pectina y el zapallo tiene una baja proporción de la misma, podría demostrar que el tejido de zapallo es más débil, en este sentido, que el de manzana, siendo la causa de la mayor degradación celular existente.

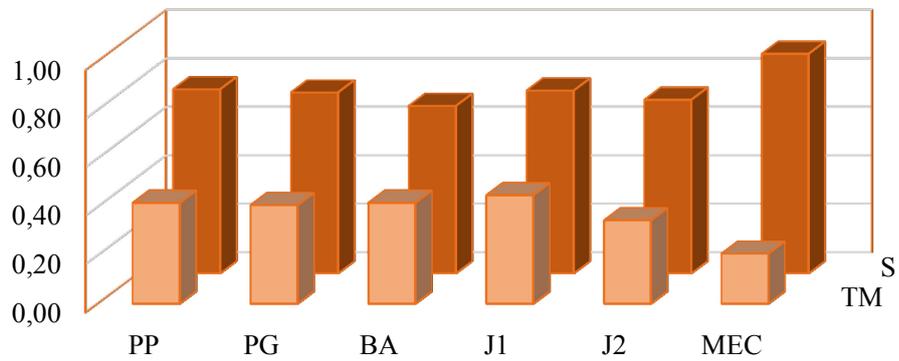


Figura 4.17. Concentración de ácidos urónicos (como AGA) en TM y S obtenidos de las maceraciones enzimáticas (PP: PPasaSE – PG: PGzyme – BA – J1 – J2) y mecánicas (MEC) de zapallo usando el método colorimétrico del *m*-hidroxidifenilo (mhdf). Expresados en g AGA/l solución.

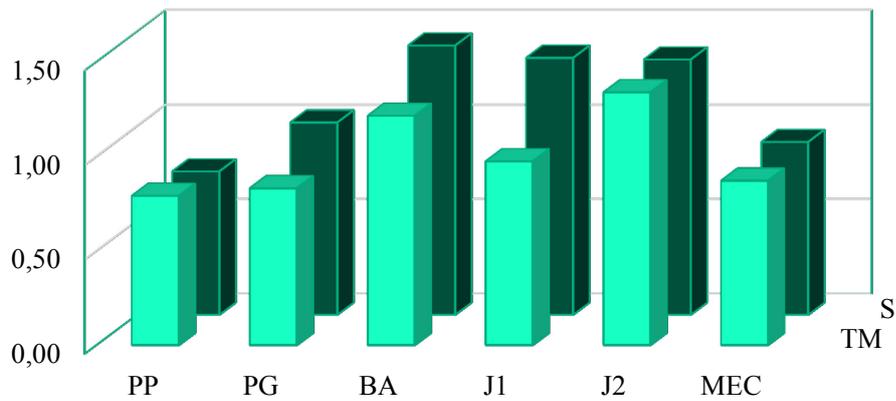


Figura 4.18. Concentración de ácidos urónicos (como AGA) en TM y S obtenidos de las maceraciones enzimáticas (PP: PPasaSE – PG: PGzyme – BA – J1 – J2) y mecánicas (MEC) de manzana usando el método colorimétrico del *m*-hidroxidifenilo (mhdf). Expresados en g AGA/l solución.

Las Figuras 4.19. y 4.20. muestran que el contenido en azúcares reductores, tanto para el zapallo como para las manzanas, es considerablemente superior en todas las fracciones de S. Esta concentración se ve incrementada en dicha fracción debido a la acción de las enzimas solubilizando la pectina (AGA); dejando expuestos de esta manera, además, otros azúcares reductores que se encontraban en la estructura de la lámina media. Este mismo efecto se puede apreciar con la acción mecánica. En las manzanas se obtuvo una mayor proporción de los mismos en ambas fracciones, comparado con la maceración enzimática. Esto puede deberse a que los frutos empleados en las maceraciones mecánicas hayan presentado una mayor madurez, lo que se traduce en un aumento en los azúcares reductores. También puede observarse que, en ambos vegetales, el contenido de dichos componentes es superior con las enzimas comerciales dando idea de una mayor degradación por parte de las mismas.

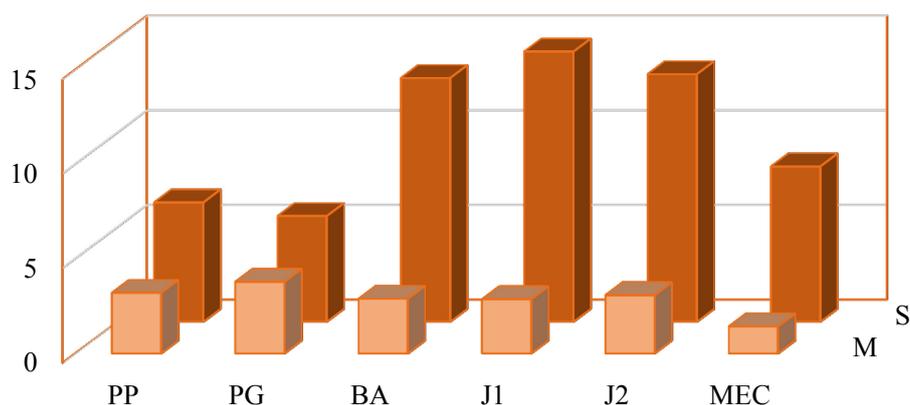


Figura 4.19. Concentración de azúcares reductores en TM y S obtenidos de las maceraciones enzimáticas (PP: PPasaSE – PG: PGzyme – BA – J1 – J2) y mecánicas (MEC) de zapallo usando el método Somogyi-Nelson. Expresados en g/l solución.

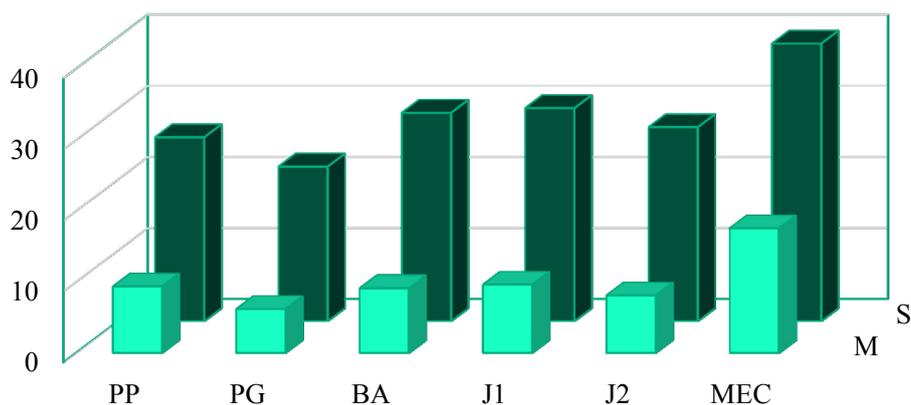


Figura 4.20. Concentración de azúcares reductores en TM y S obtenidos de las maceraciones enzimáticas (PP: PPasaSE – PG: PGzyme – BA – J1 – J2) y mecánicas (MEC) de manzana usando el método Somogyi-Nelson. Expresados en g/l solución.

El mayor contenido de azúcares reductores puede explicar la mayor actividad antioxidante ya que, si bien no poseen efecto antioxidante per se, poseen un efecto sinérgico en la captura de radicales libres con otros compuestos como ácido ascórbico, naringina y otras flavonas (Stratil *et al.* 2007)

Los resultados obtenidos permitieron comprobar que a partir de la maceración enzimática se obtuvieron TM con células enteras conservando en su interior los compuestos intracelulares que pueden ser benéficos para la salud. Sin embargo, la explicación a la igualdad encontrada entre las fracciones de TM y S para las manzanas en cuanto a la actividad antioxidante, contenido de fenoles y AGA, da idea de que la maceración enzimática dió como resultado igual cantidad de células sanas que dañadas. En cambio, en el zapallo, el daño celular fue más marcado, al igual que en las maceraciones mecánicas con ambos vegetales, ya que se encontró que dichos contenidos fueron mayores en el S en vez de en el TM. Por lo tanto, el TM obtenido a partir del zapallo y con las maceraciones mecánicas a partir de ambos vegetales, no presentaban la calidad nutricional esperada. Con las manzanas, la calidad obtenida fue mejor dejando en evidencia que este sería un mejor modelo para utilizarlo en la maceración enzimática con la finalidad de obtener productos nutraceuticos. Los reportes bibliográficos indican que Zapata Zapata (2008) logró obtener un TM con mayor poder antioxidante pero menor contenido de fenoles totales que el S a

partir de la maceración de albedo de limón con la enzima PPasaSE. Este dato puede diferir con los resultados encontrados en estos trabajos debido a que los tejidos utilizados son sumamente diferentes.

En cuanto a la comparación de la calidad de los productos obtenidos con las distintas enzimas, puede decirse que se comportaron de la misma manera tanto las enzimas en estudio como las comerciales, destacándose PPasaSE en cuanto a la actividad antioxidante obtenida con ambos vegetales en donde se observa una actividad ~ 35% mayor que con J1 y J2, y ~ 50% mayor que con la mecánica en zapallo; y en las manzanas ~ 20% mayor que BA, J1 y J2, y 40% mayor que con la mecánica.

Tabla 4.3. Calidad de los productos obtenidos a partir de la maceración enzimática a 40 U (PPasaSE, PGzyme, BA, J1 y J2) y mecánica de tejidos de zapallo.

	PPasaSE		PGzyme		BA		J1		J2		Mecánica	
	TM	S	TM	S	TM	S	TM	S	TM	S	TM	S
Ácidos Urónicos - AGA (g/l)	0.42	0.76	0.41	0.75	0.42	0.69	0.45	0.75	0.34	0.72	0.21	0.91
Azúcares Reductores (g/l)	3.21	6.31	3.79	5.59	2.90	12.89	2.87	14.29	3.09	13.09	1.43	8.21
Actividad Antioxidante (μ mol Trolox/l)	636.67	1138.78	308.14	859.53	652.16	1169.43	435.20	1109.26	482.73	1192.41	310.53	710.97
Fenoles Totales (mg ác. gálico/l)	18.73	57.99	23.11	47.96	24.09	72.14	16.95	68.85	17.43	75.04	10.62	20.69

Tabla 4.4. Calidad de los productos obtenidos a partir de la maceración enzimática a 40 U (PPasaSE, PGzyme, BA, J1 y J2) y mecánica de tejidos de manzana.

	PPasaSE		PGzyme		BA		J1		J2		Mecánica	
	TM	S	TM	S	TM	S	TM	S	TM	S	TM	S
Ácidos Urónicos - AGA (g/l)	0.79	0.76	0.83	1.02	1.21	1.43	0.97	1.63	1.35	1.34	0.87	0.92
Azúcares Reductores (g/l)	9.36	25.91	6.18	21.77	9.11	29.35	9.63	30.00	8.09	27.32	17.56	39.07
Actividad Antioxidante (μ mol Trolox/l)	1065.61	1113.77	1076.45	1015.29	861.48	859.62	866.94	890.86	947.07	1050.97	690.55	1179.03
Fenoles Totales (mg ác. gálico/l)	101.61	108.69	70.62	82.49	84.48	95.85	74.49	79.31	94.25	107.30	47.40	71.36

4.4. CONCLUSIONES

A partir de la evaluación de la concentración enzimática sobre el proceso de maceración, se obtuvo que con una actividad final de 40 U se consiguen los mejores resultados tanto con la enzima PPasaSE como con PGzyme. Con mayores concentraciones se alcanza una meseta en los rendimientos indicando que la acción de la enzima está limitada por la superficie del sustrato macerable.

Bajo estas condiciones el TM obtenido mostró células intactas microscópicamente en todos los casos. Sin embargo, además se distinguieron algunas células dañadas y material intracelular libre, acentuándose este efecto en las enzimas comerciales J₁ y J₂. Estas enzimas son pools enzimáticos que podrían degradar en mayor medida la pared y membrana celular de los vegetales.

Usando una actividad de 40 U para todas las enzimas, se pudo observar que PPasaSE y PGzyme presentaron muy buenas capacidades de maceración, alcanzándose con ambas enzimas un rendimiento en el proceso de ~ 35% y 20% en la fracción de TM para los zapallos y manzanas, respectivamente. Quedó demostrado que las enzimas involucradas en estos estudios se comportaron tan bien o mejor que las enzimas comerciales que se encuentran en el mercado en la actualidad. Con la contribución de estas enzimas de la producción local, se lograría reducir los costos para los productores, ya que en la actualidad están siendo obtenidos a través de las importaciones y ésto se traduce en un mayor gasto productivo.

A pesar de que los rendimientos obtenidos de TM para zapallo fueron buenos, la calidad del mismo no fue la adecuada, mostrando una actividad antioxidante y un contenido en fenoles totales mayor en el S. Además, se obtuvo un contenido importante de pectina solubilizada en el mismo, quedando las células maceradas más expuestas, pudiendo ser el shear causado por la agitación el causante de la mayor proporción de células dañadas. Este hecho, sumado a que la rigidez en los vegetales esta dada principalmente por el contenido de pectina y el zapallo tiene una baja proporción de la misma, demostraría que este tejido es más débil que el de manzana, siendo ésta la causa de la mayor degradación celular existente.

La actividad antioxidante y el contenido en fenoles totales en las fracciones de TM y S para manzana resultaron similares y con valores muy buenos. Esto indica que durante la maceración enzimática se obtuvieron igual cantidad de células sanas que dañadas. Por lo

tanto, se concluye que la manzana es mejor sustrato para utilizarlo en la maceración enzimática con la finalidad de obtener productos nutraceuticos, ya que conserva en mayor medida, en el TM, los nutrientes propios del tejido vegetal.

Al comparar la calidad obtenida con las diferentes enzimas, se encontró que se comportaron de la misma manera tanto las enzimas en estudio como las comerciales, destacándose PPasaSE en cuanto a la actividad antioxidante obtenida con ambos vegetales.

También se logró asociar positivamente el contenido de fenoles totales a la actividad antioxidante, demostrando que los compuestos polifenoles tienen una contribución significativa a la misma y que pueden explicar en gran medida la actividad antioxidante observada.

Por otra parte, las maceraciones mecánicas produjeron con ambos vegetales productos de baja calidad nutricional, dejando en evidencia las bondades de los procesos enzimáticos.

Teniendo en cuenta los resultados, se concluye que el proceso de maceración enzimática descrito y la aplicación de estas dos pectinasas a dicho proceso, es interesante para la obtención de ingredientes nutraceuticos con posible uso como suplementos alimenticios, no solo a partir manzana sino también de otro tipo de frutas y verduras.

De esta forma, sería posible obtener productos de mayor valor añadido que contribuyen a la economía de las diferentes regiones productivas de Argentina.

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aranceta, J. (2003). Las frutas, verduras y hortalizas en la alimentación de los españoles. *DETECOM*.
- Bateman, D. F. (1968). The enzymatic maceration of plant tissue. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 74, 67-80.
- Biekman, E. S. (1992). Enzymatic maceration of potatoes for the production of instant dried mashed potato: modelling of the disintegration process. *Food Biotechnology*, 6(1), 19-33.
- Biely, P. & Kremmicky, L. (1998). Yeast and their enzymes system degrading cellulose, hemicellulose and pectin. *Food technology and biotechnology*, 36, 305-312.
- Boyer, J., & Liu, R. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition journal*, 3(1), 1.
- Carné, M., Cavalitto, S.F., Hours, R.A. (2005). Maceración de papa con protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii*. *X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Mignone, C. F. (1999) Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnology Techniques*, 13, 385-390.
- Cefola, M., Pace, B., Renna, M., Santamaria, P., Signore, A., & Serio, F. (2012). Compositional analysis and antioxidant profile of yellow, orange and purple Polignano carrots. *Italian Journal of Food Science*, 24(3), 284.
- Choksi, K. B., Boylston, W. H., Rabek, J. P., Widger, W. R., & Papaconstantinou, J. (2004). Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1688(2), 95-101.
- De Bruijn, J. & Biekman, E. (1998). Enzymatic maceration of potatoes: influence of reaction conditions. *Agro-Ciencia*, 14, 245-250.

- Della Gaspera, P. (2013). Manual del cultivo del zapallo anquito (*Cucurbita moschata* Duch.). INTA *Estación Experimental Agropecuaria*. La Consulta Centro Regional Mendoza - San Juan. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria .
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K. & Liu, R. I. (2002) Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3010-3014.
- Dobrzański, B., Rabcewicz, J., & Rybczyński, R. (2006). Handling of apple. *Institute of Agrophysics polish Academy of Sciences (IA PAS)*. Press, Lublin, Poland, 1-13.
- Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 37, 165-186.
- Ishii, S. (1984). Cell wall cementing materials of grass leaves. *Plant Physiology*, 76, 959-961.
- Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Domitran, Z., & Opalić, M. (2013). Content of saccharides, antioxidant and sensory properties of pear cultivar *Abate Fetel* affected by ultrasound pre-treatment and air drying duration. *Journal of Food & Nutrition Research*, 52(4).
- McLaren, D. & Packer, L. (1970). Some aspects of enzyme reactions in heterogeneous systems. *Advances in Enzymology*. John Wiley & Sons. 245-308.
- Nakamura, T., Hours, R. A. & Sakai, T. (1995). Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science*, 60, 468-472.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Sainz, R. B. (2008). *Maceración enzimática de tejidos vegetales* (Grade dissertation, Licenciatura en Biotecnología, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes).

- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. & Vandamme, J. (1993). Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39, 213-294.
- Sakamoto, T., Hours, R. A. & Sakai, T. (1995). Enzymatic pectin extraction from protopectins using microbial protopectinasas. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 353-358.
- Sato, S. (1968). Enzymatic maceration of plant tissue. *Physiologia Plantarum*, 21, 1067-1075.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of biological chemistry*, 195(1), 19-23.
- Stratil, P., Klejdus, B. & Kubán, V. (2007) Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, 71, 1741-1751.
- Vieira, F. G. K., Borges, G. D. S. C., Copetti, C., Gonzaga, L. V., da Costa Nunes, E., & Fett, R. (2009). Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, 59(1), 101.
- Voragen, A. C. J., & Pilnik, W. (1989). Pectin-degrading enzymes in fruit and vegetable processing. In *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)*.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Laskowski, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6520-6530.
- Zaccari, F., Galeazzi, D., & Rahi, V. (2015). Efecto del tiempo de almacenamiento en condiciones controladas de temperatura sobre atributos físicos y químicos de zapallos “tipo kabutia” (*Cucurbita maximax Cucurbita moschata*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 114-120.
- Zapata Zapata, A. D. (2008). Protopectinasa SE de *Geotrichum klebahnii*: producción, purificación y aplicación al proceso de maceración de tejidos vegetales y extracción enzimática de pectina (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata).

Zapata Zapata, A. D., Montoya, C. A. G., Cavalitto, S. F., Hours, R. A., & Rojano, B. A. (2012). Enzymatic maceration of albedo layer from sour orange (*Citrus aurantium* L.) with protopectinase-se and measurement of antioxidant activity of the obtained products. *LWT-Food Science and Technology*, 45(2), 289-294.

Zardo, D. M., Silva, K. M., Guyot, S., & Nogueira, A. (2013). Phenolic profile and antioxidant capacity of the principal apples produced in Brazil. *International journal of food sciences and nutrition*, 64(5), 611-620.

CAPÍTULO 5

CLARIFICACIÓN DE JUGO DE MANZANA PARA LA ELABORACIÓN DE SIDRA: APLICACIÓN DE PPASA-SE DE *G. klebahnii* Y PGZYME DE *A. sojae*.

RESUMEN

Los jugos de frutas y sidras son naturalmente turbios debido a la presencia de polisacáridos (pectina, celulosa, hemicelulosa, lignina y almidón), proteínas, taninos y metales. La apariencia clara en los jugos es un factor determinante para los consumidores. Los procesos de clarificación convencionales tienen por objeto eliminar los sólidos insolubles y destruir sustancias pécticas por degradación de la pectina y el almidón con enzimas específicas, además de la floculación de la nubosidad formada con agentes clarificantes (bentonita, gelatina y/o silica sol) y/o a través de filtración o centrifugación. Se estudiaron diferentes condiciones de temperatura, concentración de enzima y tiempo en el proceso de clarificación de jugo de manzana para la elaboración de sidra mediante el uso de las enzimas PPasaSE y PGzyme. Se utilizó el diseño estadístico Doehlert para evaluar dichos efectos y determinar los parámetros óptimos para la realización del proceso. PPasaSE no presentó una buena capacidad de clarificación, por lo tanto, los cálculos se realizaron con los resultados obtenidos por PGzyme. Las condiciones óptimas resultaron: 20 °C, Enz. 2.2 U/ml y 4.5 hs. Se realizó un análisis comparativo bajo esas condiciones de los rendimientos obtenidos con las enzimas en estudio y con los obtenidos a partir de la aplicación de las enzimas comerciales. También se comparó la capacidad de clarificación de PGzyme con el proceso tradicional de clarificación de sidras que utiliza bentonita enológica como agente clarificante. Los resultados obtenidos para la clarificación enzimática en porcentaje de clarificación (%C) fueron 56.5 con PPasaSE, 99.4 con PGzyme, 96.5 con BA, 97.6 con J1 y 98.6 con J2. Y para la clarificación con bentonita el %C fue 76.1 a los 15 días y 99.6 a las 4.5 hs con Bentonita + Enzima (PGzyme). PGzyme demostró excelentes condiciones para su aplicación en procesos de clarificación de jugos, demostrando ser igual o mejor que las enzimas comerciales y mejor que los procesos tradicionales con bentonita, otorgando mejores resultados en menores tiempos. Además, se analizaron los °Brix y pHs de los jugos previamente a la clarificación y posteriormente. La medición de estos parámetros no mostró ningún cambio significativo en el jugo al aplicar el proceso.

5.1 INTRODUCCIÓN

Dentro de las tecnologías que pueden aplicarse para la mejora de la calidad de los jugos y diversas bebidas, está la aplicación de las enzimas pécticas, ya sea para mejorar la extracción de jugo o para la clarificación del mosto.

El jugo de manzana crudo obtenido después del prensado es turbio, de color marrón, muy viscoso y tiende a asentarse durante el almacenamiento. Los polisacáridos (pectina, celulosa, hemicelulosa y almidón), proteínas, taninos, metales y microorganismos son los principales responsables de la turbidez de dicho jugo (Vaillant *et al.* 2001). Pero la alta concentración de sustancias pécticas es la que genera, principalmente, la nubosidad.

En cuanto a la clarificación, las enzimas pécticas se utilizan en la preparación de jugo de manzana y sidra para ayudar en la separación de un precipitado floculante por sedimentación, filtración o centrifugación obteniendo de esta manera jugos claros y evitando la formación de la nube posterior (Grampp 1976, Kashyap 2001, Pinelo 2010). El jugo resultante tiene una cantidad mucho menor de pectinas y una viscosidad más baja, lo que es ventajoso para el proceso de filtración subsiguiente. El pretratamiento con enzimas que degradan la pectina ha sido investigado con el objetivo de aumentar el flujo de permeado en la microfiltración, ultrafiltración y la ósmosis inversa de jugos de fruta, debido a que la pectina ensucia las membranas con la consiguiente disminución del flujo.

Las pectinasas le permiten al productor de jugos y sidras controlar y acelerar el mecanismo de formación de coágulo (un gel de pectinatos). El coágulo atrapa pectina, proteínas y taninos, el cual es removido del jugo. La aplicación de las enzimas a estos procesos también resulta beneficiosa en cuanto a la calidad sensorial y nutricional de los productos, debido a que permiten la obtención de células independientes que conservan en gran medida su integridad, manteniendo en su interior los nutrientes propios del tejido natural de los frutos, entre los cuales se cuentan; vitaminas (C, B6, B9 y E), compuestos fenólicos (flavonoides, cinamatos y taninos), etc. La alta calidad del mosto así obtenido produce un jugo o una sidra más aromática y favorece en la sidra a una buena fermentación (Kashyap 2001).

La clarificación está afectada por el pH, temperatura, tiempo de contacto y la concentración de enzima (Kilara 1982). En general, el tiempo requerido para obtener una clarificación es inversamente proporcional a la concentración de enzima utilizada a

temperatura constante en el rango de 5 - 50 ° C y el tiempo de tratamiento es de entre 2 - 16 h (Kashyap 2001).

Los procesos de clarificación convencionales tienen por objeto eliminar los sólidos insolubles y flocular la nube con agentes clarificantes (bentonita, gelatina y / o silicagel) (Grampp 1977). La bentonita es el agente utilizado más tradicionalmente para la clarificación de bebidas fermentadas como sidras y vinos. Es un coadyudante de origen mineral que favorece la floculación de partículas cargadas negativamente. Se puede utilizar en productos alimenticios porque no es tóxica ni alergénica ni por contacto ni por vía digestiva.

En el presente capítulo se evaluó la aplicación de PPasa-SE de *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae* al proceso de clarificación de jugos de manzanas para la elaboración de sidras en función de contribuir a solucionar los problemas del procesado posterior, así como también se tratará de maximizar los rendimientos y la calidad de los productos. Además, se analizó el efecto de la concentración de enzima, la temperatura y el tiempo de incubación sobre el proceso de clarificación. Se realizó una evaluación comparativa de los rendimientos obtenidos con la aplicación de las enzimas con aquellos obtenidos a partir de pectinasas comerciales. El proceso enzimático será también comparado con el método tradicional de clarificación que utiliza bentonita.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Reactivos químicos

Los siguientes reactivos: ácido poligalacturónico (APG) y ácido galacturónico monohidrato (AGA) fueron adquiridos comercialmente de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). Todos los demás reactivos empleados son de grado analítico y están comercialmente disponibles.

5.2.2 Fuentes de enzimas

Se utilizaron los protocolos detallados en el Capítulo 3 para producir las enzimas PPasa-SE de *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae*.

Además, se emplearon las enzimas comerciales descritas en el mismo Capítulo.

5.2.3 Producto a clarificar

Se obtuvo el mosto de jugo de manzana para la elaboración de sidra previo a la clarificación y fermentación del Centro de Formación Profesional Agropecuaria N°2 de San Patricio del Chañar.

Una vez producido el mosto fue congelado a -20 °C y de esa manera se mantuvo hasta el momento de realizar los ensayos.

5.2.4 Clarificación enzimática sobre jugo de manzana para la elaboración de sidra

En principio, se evaluó el efecto de la temperatura, concentración de enzima y tiempo sobre la capacidad de clarificación de las enzimas PPasa-SE y PGzyme a partir de jugo de manzana para la elaboración de sidra. A 10 ml del mosto se le agregó cada enzima diluida convenientemente a fin de lograr una actividad poligalacturonasa en la solución

final definida para cada experimento. También se quiso analizar las consecuencias que provocan el tiempo y las temperaturas de incubación en dicho proceso, por lo tanto, se definieron los mismos para cada experimento. La reacción se interrumpió por inactivación de las pectinasas calentando a 85 °C x 3 min (Kareem y Adebawale 2007). Las condiciones óptimas para la clarificación se determinaron mediante el empleo del diseño experimental Doehlert con superficie de respuesta tomando como rango de trabajo: temperatura (5 – 35 °C), concentración de enzima (1 – 5 U/ml) y tiempo (1 – 10 hs).

5.2.5 Comparación con la capacidad de clarificación de pectinasas comerciales

Una vez determinados los parámetros que resultaron óptimos para la clarificación enzimática del jugo de manzana para la elaboración de sidra, se compararon los rendimientos obtenidos con las enzimas en estudio con los obtenidos a partir de la aplicación de las enzimas comerciales siguiendo la metodología antes mencionada.

5.2.6 Comparación con la clarificación mediante procesos tradicionales

Se compararon los resultados obtenidos con el jugo de manzana para la elaboración de sidra tratado enzimáticamente, con los obtenidos mediante el empleo de bentonita enológica.

El empleo de bentonita consistió en hidratar la misma durante 24 hs y luego agregarla en una concentración de 1 g/l (bentonita seca) a 10 ml de jugo, agitando hasta disolver completamente. Luego se dejó estacionar durante 15 días. Se tomaron muestras para evaluar la clarificación obtenida a las 4.5 hs, a las 48 hs y a los 15 días.

5.2.7 Medida de la actividad enzimática

Se utilizó el método reportado en el Capítulo 2.

5.2.8 Análisis de los jugos clarificados

Los diferentes mostos obtenidos fueron caracterizados con el fin de poder realizar un análisis comparativo a partir de los resultados obtenidos con las diferentes técnicas de clarificación.

5.2.8.1 Medida de la turbidez

Los jugos clarificados fueron centrifugados a 1000g por 10 minutos. Luego se recolectaron y filtraron los sobrenadantes para la posterior evaluación de la clarificación obtenida midiendo la T_{440} y T_{520} en espectrofotómetro (Jasco modelo V-670). Estas longitudes de onda son específicas para jugos claros como es el caso del jugo de manzana. El grado de clarificación se expresa en porcentaje, el cual se calcula a través de los resultados obtenidos en las muestras de jugo clarificado y en las muestras control (jugo sin enzima) de cada ensayo (Baker y Bruemmer 1972, Ranganna 1977).

5.2.8.2 Determinación de sólidos solubles (Ss)

La concentración de Ss se expresa en °Brix. Los °Brix son un índice comercial, aproximado, de esta concentración, que se acepta convencionalmente como si todos los sólidos disueltos fueran sacarosa. Los jugos fueron analizados con refractómetro de masa tipo Abbea a 20°C antes y después de la clarificación.

5.2.8.3 Determinación del pH

A los de manzana para la elaboración de sidra se les determinó el pH antes y después de la clarificación con un pHmetro marca Adwa.

5.2.9 Descripción del diseño estadístico Doehlert

El método de Doehlert es un diseño de superficie de respuesta que permite encontrar máximos o mínimos en la zona del ensayo (Doehlert 1970). Con este método se puede manejar un número apreciable de variables a la vez sin que el número de ensayos se haga operativamente inmanejable. El diseño se fundamenta en la construcción de unas celdas uniformes que definen los niveles de cada factor. La principal ventaja que tiene sobre otros diseños es que tiene la posibilidad de ampliar uniformemente, sobre cualquier dirección, el valor de los niveles, o incluso aumentar el número de factores analizados. Para la realización de este método los valores que se le asignan a las variables se distribuyen uniformemente alrededor de un valor central, generando un cubo-octaedro en el caso de manejar tres variables, o un hexágono al manejar solo dos. Para el caso del hexágono (Figura 5.1.), a fin de determinar el valor en todos los puntos de las variables x e y , y para asegurar estén equidistantes, se toma como imagen generatriz al triángulo equilátero ABC de lado unitario y se determina la posición de cada punto, partiendo arbitrariamente del punto A ($x = 0,000$, $y = 0,000$).

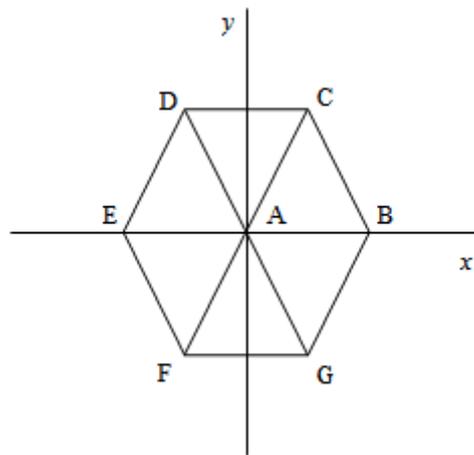


Figura 5.1. Representación esquemática del hexágono en el diseño Doehlert.

Mediante un análisis geométrico basado en las propiedades del triángulo equilátero, se determinan las coordenadas de los puntos B y C, arrojando los siguientes valores: A (0,000, 0,000), B (1,000, 0,000) y C (0,500, 0,866). El resto de los extremos del hexágono se ubican en los siguientes puntos: D (-0,500, 0,866), E (-1,000, 0,000), F (-0,500, -0,866) y G (0,500, -0,866). Al utilizar tres variables, la figura generatriz es un tetraedro de arista

unitaria cuyos vértices se encuentran en (0,000, 0,000, 0,000), (1,000, 0,000, 0,000), (0,500, 0,866, 0,000) y (0,500, 0,289, 0,816), generando las coordenadas de 4 puntos codificados. El resto de puntos surge de la resta de estos puntos entre si, arrojando un total de 13 puntos equivalentes a 15 ensayos, teniendo en cuenta que el punto central se hace por triplicado para determinar la varianza del experimento (Sautour *et al.* 2001, Zapata Zapata 2008).

La Tabla 5.1. muestra los valores codificados de las variables y a partir de ellos se calculan los valores reales de los factores, para lo cual se requiere definir los valores centrales y los $\Delta_{codificado}$ y Δ_{real} , para cada uno de los factores a analizar.

Tabla 5.1. Valores codificados de cada variable según el diseño experimental Doehlert.

Ensayo	X Codificado	y Codificado	z Codificado
1	-0.816	-0.5	-0.289
2	-0.816	0	0.577
3	-0.816	0.5	-0.289
4	0	-1	0
5	0	-0.5	-0.866
6	0	-0.5	0.866
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0.5	0.866
11	0	0.5	-0.866
12	0	1	0
13	0.816	-0.5	0.289
14	0.816	0	-0.577
15	0.816	0.5	0.289

Teniendo en cuenta los intervalos de los factores temperatura, concentración de enzima y tiempo, se deduce un punto central (20 °C, 3 U, 5.5 hs) que corresponde al punto codificado (0,000, 0,000, 0,000). Los valores de $\Delta_{xreal} = 30.0$, $\Delta_{yreal} = 4.0$ y $\Delta_{zreal} = 9.0$; corresponden a $\Delta_{xcodif} = 1.632$, $\Delta_{ycodif} = 2.0$, $\Delta_{zcodif} = 1.732$. Con estos valores y la

Ecuación 5.1. se pueden determinar los valores reales correspondientes a cada valor codificado (Tabla 5.2.).

$$X_{real} = X_{codif} \times \frac{\Delta X_{real}}{\Delta X_{codif}} + X_0 \quad \text{Ec. 5.1.}$$

Una vez realizada la experiencia y medida la variable dependiente (en nuestro caso % de clarificación), se determinan los coeficientes de un polinomio del tipo $z = b_0 + b_1x + b_2y + b_3x^2 + b_4y^2 + b_5xy$, con ayuda del programa estadístico Statgraphics, y luego se procede a realizar la gráfica de superficie de respuesta por medio del programa Matlab.

Tabla 5.2. Valores reales de las variables según el diseño experimental Doehlert.

Ensayo	Temperatura (°C)	Concentración de enzima (U/ml)	Tiempo (hs)
1	5	2	4
2	5	3	8.5
3	5	4	4
4	20	1	5.5
5	20	2	1
6	20	2	10
7	20	3	5.5
8	20	3	5.5
9	20	3	5.5
10	20	4	10
11	20	4	1
12	20	5	5.5
13	35	2	7
14	35	3	2.5
15	35	4	7

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Clarificación enzimática sobre jugo de manzana para la elaboración de sidra

Se utilizó el diseño estadístico Doehlert para evaluar el efecto de la temperatura, la concentración enzimática y el tiempo, sobre el proceso de clarificación enzimática de jugo de manzana para la elaboración de sidra con las enzimas PPasaSE y PGzyme.

En la Tabla 5.3. se muestran los resultados para cada una de las combinaciones de los niveles de los factores arrojados por el diseño experimental.

Tabla 5.3. Clarificación enzimática de jugo de manzana para la elaboración de sidra con PPasaSE y PGzyme, aplicando el diseño estadístico Doehlert.

Ensayo	Temperatura (°C)	Conc. de enzima (U/ml)	Tiempo (hs)	% Clarificación	
				PPasaSE	PGzyme
1	5	2	4	-3.20	83.81
2	5	3	8.5	-21.13	96.02
3	5	4	4	-74.32	89.30
4	20	1	5.5	5.74	97.73
5	20	2	1	19.10	94.94
6	20	2	10	35.07	91.40
7	20	3	5.5	20.89	91.55
8	20	3	5.5	-15.01	96.93
9	20	3	5.5	4.16	95.62
10	20	4	10	6.32	86.45
11	20	4	1	-113.78	94.39
12	20	5	5.5	-46.37	79.45
13	35	2	7	53.61	94.28
14	35	3	2.5	28.25	94.89
15	35	4	7	-49.30	87.27

Como puede observarse los valores obtenidos con la enzima PPasaSE son muy bajos y hasta en algunos casos negativos. Esto da idea de que esta enzima posee muy baja capacidad de clarificación y, por ese motivo, se decidió realizar el análisis del diseño Doehlert únicamente con los valores de clarificación obtenidos por la enzima PGzyme.

La Ecuación 5.2. representa el modelo matemático obtenido ($R^2 = 0.78$), el cual no incluye los efectos no significativos. Este valor concuerda con Abdullah *et al.* (2007) donde publicaron haber obtenido un R^2 mayor a 0.70 durante la optimización del proceso de clarificación de jugo de carambola a través del método de superficie de respuesta utilizando una enzima comercial.

Ecuación 5.2.

$$\begin{aligned} \%C = & 58.51 + 2.85 \times t + 11.46 \times \text{Enz.} + 1.53 \times T - 0.24 \times t \times \text{Enz.} - 0.08 \times t \times T \\ & - 0.18 \times \text{Enz.} \times T - 0.07 \times t^2 - 1.53 \times \text{Enz.}^2 - 0.01 \times T^2 \end{aligned}$$

Posteriormente se calculó, con base en el modelo, el porcentaje de clarificación (%C) obtenido para cada temperatura (5, 20 y 35 °C), y con estos valores se realizaron las superficies de respuesta que se muestran en la Figura 5.2.

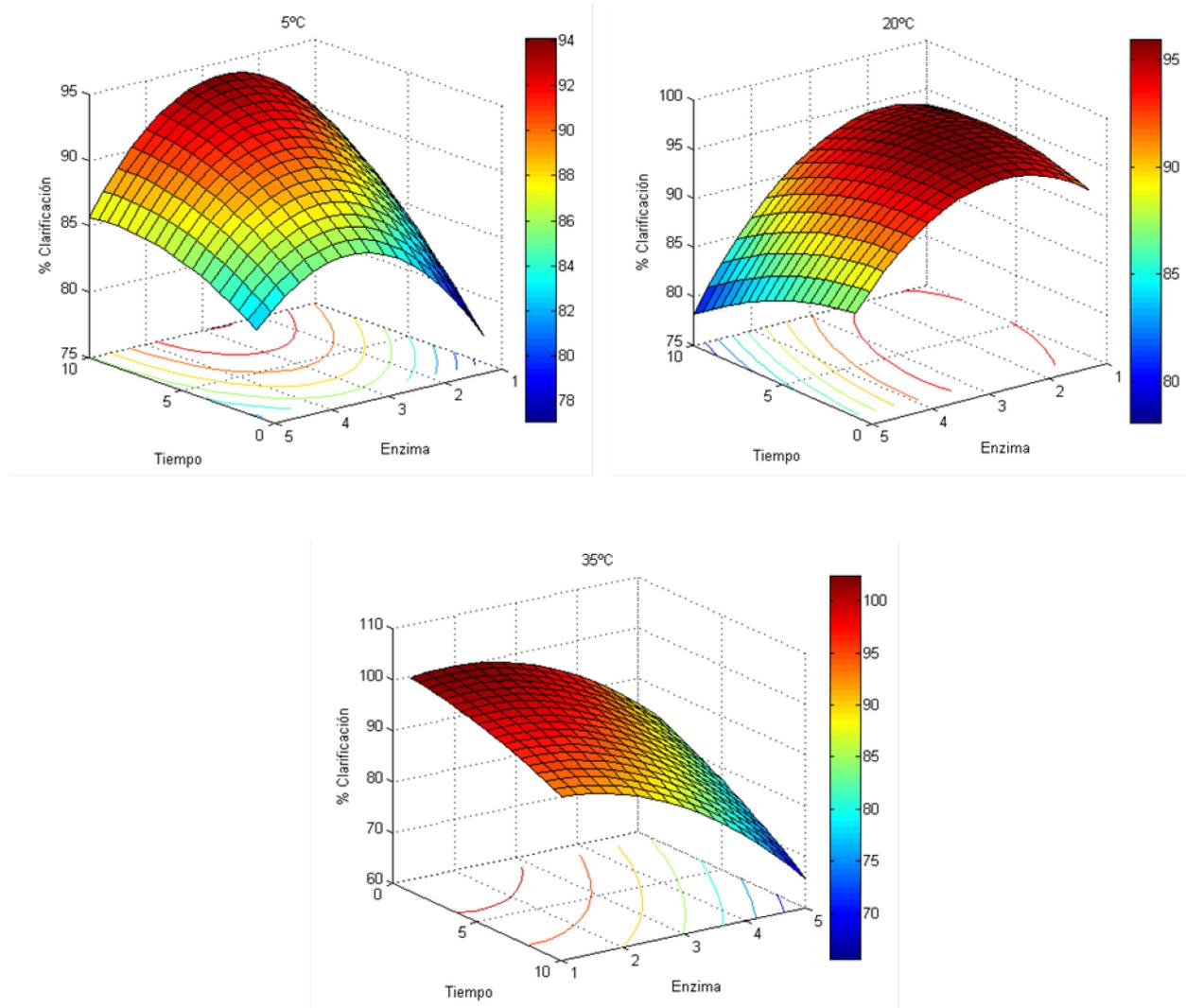


Figura 5.2. Superficies de respuesta de la clarificación de jugo de manzana para la elaboración de sidra con PGzyme a 5, 20 y 35 °C.

A pesar de que matemáticamente el mayor %C se obtuvo a 35 °C (104%), las condiciones arrojadas como óptimas son irracionales ($t = -4.4$ hs). Por lo tanto, el programa Matlab permitió optimizar el modelo, dando como condiciones óptimas para la clarificación de jugo de manzana para la elaboración de sidra con la enzima PGzyme: 20 °C, Enz. 2.2 U/ml y 4.5 hs. Bajo este escenario el %C alcanzado fue de 96%. Estas condiciones óptimas, tienen la ventaja de utilizar Temperatura ambiente, con lo que se evita un gasto energético para lograr la refrigeración o la calefacción del ambiente; y una concentración enzimática baja. Algunos autores también publicaron que consiguieron mejores resultados en la clarificación con menores actividades poligalactosas, como es el caso de Nakkeeran *et al.* (2011) y Dey y Banerjee (2014). Se ha reportado, además, que con temperaturas altas o

tiempos largos, hay una excesiva hidrólisis por lo que el precipitado comienza a hidrolizarse y se resuspende, con la consiguiente disminución de la clarificación (Sin *et al.* 2006, Nagar *et al.* 2012).

A 5 °C se consiguió un %C importante (94%), pero el tiempo necesario para lograr ese valor es de 13.5 hs. Además, el gasto que implica realizar la refrigeración de los mostos es significativo.

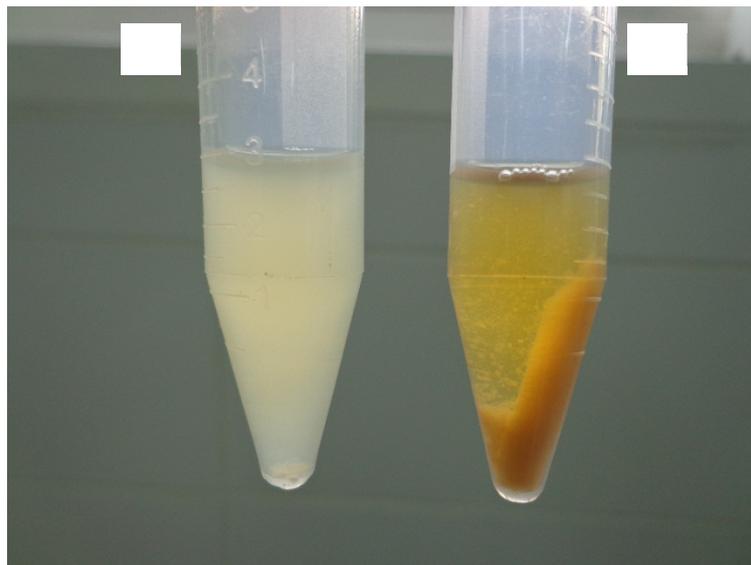


Figura 5.3. Fotografía del jugo de manzana luego del proceso de clarificación (A) Control. (B) Muestra clarificada con enzima.

5.3.2. Comparación con la capacidad de clarificación de pectinasas comerciales y mediante procesos tradicionales

A partir de las condiciones óptimas (20 °C, Enz. 2 .2 U/ml y 4.5 hs) obtenidas con el diseño estadístico Doehlert para la clarificación de jugo de manzana para la elaboración de sidra con la enzima PGzyme, se decidió realizar un análisis comparativo entre las enzimas en estudio y las comerciales. Se realizaron los ensayos también con la enzima PPasaSE bajo las mismas condiciones con fines comparativos.

Los resultados se exponen en la Tabla 5.4. Los mismos corresponden al promedio de tres muestras por duplicado y se expresan en %C teniendo en cuenta los resultados

obtenidos en las muestras de jugo clarificado y en las muestras control (jugo sin enzima) de cada ensayo.

Tabla 5.4. Comparación de la clarificación enzimática de jugo de manzana para la elaboración de sidra obtenida con PPasaSE, PGzyme y las enzimas comerciales (BA, J1 y J2). Condiciones de reacción: 20 °C, Enz. 2.2 U/ml, 4.5 hs.

% Clarificación				
PPasaSE	PGzyme	BA	J1	J2
56.5	99.4	96.5	97.6	98.6

A medida que el proceso se llevó a cabo, la cantidad de pectina en los jugos disminuye debido al accionar de las enzimas y, por lo tanto, la reducción de la turbidez de los jugos en tratamiento (Alvarez *et al.* 1998).

Con las condiciones óptimas implementadas en estos ensayos, la enzima PGzyme otorgó mejores resultados que en los ensayos realizados anteriormente durante la optimización del proceso (Tabla 5.3.). PGzyme presentó una capacidad igual o incluso superior de clarificación que las enzimas comerciales BA, J1 y J2. Demostró un excelente comportamiento, clarificando en un 99% el jugo sometido al tratamiento. Por otro lado, la enzima PPasaSE sólo clarificó el jugo en un 56% comprobando de este modo que no presenta condiciones adecuadas para ser implementada en este proceso.

Según Yamasaki et al. (1964), la turbidez la generan los complejos de proteína-carbohidratos que se forman en los jugos. En el pH del jugo de manzana (3.5), las superficies de estas moléculas de proteína, pectina y otros hidratos de carbono, están cargadas negativamente. Debajo de la capa de carga negativa, hay proteínas con carga positiva. La hidrólisis parcial de esta capa negativa, realizada por las enzimas, poligalacturonasas en estos ensayos, conduce a la exposición de las superficies cargadas positivamente. El sistema de esta manera presenta diferencias de cargas que hacen que las moléculas se atraigan unas a otras dando lugar a la formación de un coágulo (Kilara y Van Buren 1989).

Además, se realizaron estudios comparativos utilizando como método tradicional en el proceso de clarificación de sidras a la bentonita enológica. También, con el fin de optimizar el proceso de clarificación se realizó un ensayo utilizando los dos tratamientos, bentonita + enzima (PGzyme).

La bentonita hace efecto a largo plazo, por lo tanto, se decidió realizar mediciones para observar el progreso de la clarificación a las 4.5 hs, que es el tiempo necesario para la clarificación enzimática; a las 48 horas y a los 15 días, que es el tiempo que se emplea en el Centro de Formación Profesional Agropecuaria N°2 de San Patricio del Chañar para clarificar la sidra con bentonita. En la Tabla 5.5. se muestran los resultados.

Tabla 5.5. Comparación de la clarificación enzimática de jugo de manzana para la elaboración de sidra obtenida con bentonita enológica y bentonita + enzima (PGzyme). Condiciones de reacción: 20 °C, Enz. 2.2 U/ml, Bentonita 1g/l (seca), 4.5 hs – 48 hs – 15 días.

% Clarificación					
Bentonita			Bentonita + PGzyme		
4.5 horas	48 horas	15 días	4.5 horas	48 horas	15 días
18.7	61.3	76.1	99.6	99.4	98.1

Como puede observarse, el resultado obtenido con bentonita a las 4.5 hs es muy bajo. Recién se consigue una mejor clarificación a las 48 hs, siendo el mayor porcentaje alcanzado a los 15 días de aplicado el tratamiento. El %C obtenido con PGzyme supera en 1.3 veces al obtenido con bentonita. La bentonita presenta carga negativa y, por medio de la atracción electrostática, fija en su interior a las pocas proteínas que están cargadas positivamente. De esta manera, se produce la floculación de ambos coloides, seguido de sedimentación. En cambio, podría ser que debido a la acción de las pectinasas se logra obtener una mayor cantidad de moléculas cargadas positivamente que se atraen y coagulan generando un jugo más limpio en menor tiempo. En este caso no se produce sedimentación, por ese motivo, el coágulo formado debe separarse por filtración o centrifugación. En cuanto a los resultados logrados con Bentonita + PGzyme, se puede mencionar que son similares a los obtenidos solamente con la enzima. Por lo tanto, no se puede atribuir el buen funcionamiento conseguido, al empleo de este agente.

Resultados similares a los obtenidos en estos ensayos han sido reportados por otros investigadores sobre clarificación de jugo de manzana: Con poligalacturonasa y amilasa T_{660nm} 97% (Dey y Banerjee 2014). Con una enzima pectinolítica de *A. niger* en presencia de gelatina T_{650} 85% (Singh y Gupta 2004). Con enzima inmovilizada pectolítica T_{650} 55% (Saxena *et al.* 2008).

5.3.3. Análisis de los jugos clarificados

En las Tablas 5.6. y 5.7. se encuentran los resultados del análisis de °Brix y pH obtenidos a partir del jugo de manzana para la elaboración de sidra, previo al tratamiento de clarificación y una vez finalizado el mismo.

Tabla 5.6. Análisis de los jugos de manzana en cuanto al contenido de °Brix y pH, previamente y posterior al tratamiento de clarificación con la enzima PPasaSE.

Ensayo	° Brix			pH		
	Inicial	Final	Control	Inicial	Final	Control
1	13.00	13.50	13.25	3.43	3.45	3.47
2	13.75	13.50	13.00	3.41	3.41	3.42
3	13.00	13.25	13.25	3.43	3.45	3.47
4	13.75	13.50	13.50	3.41	3.41	3.41
5	13.25	13.00	12.75	3.47	3.51	3.50
6	13.75	13.25	13.00	3.42	3.41	3.42
7	13.00	12.50	12.5	3.43	3.46	3.48
8	13.00	13.75	12.75	3.43	3.46	3.48
9	13.00	12.75	12.75	3.43	3.44	3.44
10	13.75	12.75	12.50	3.42	3.40	3.42
11	13.50	13.25	13.25	3.47	3.49	3.50
12	13.00	12.50	12.25	3.43	3.44	3.46
13	13.25	13.00	12.75	3.43	3.42	3.40
14	13.50	13.50	13.50	3.47	3.49	3.50
15	13.75	13.00	12.00	3.41	3.43	3.41

Tabla 5.7. Análisis de los jugos de manzana en cuanto al contenido de °Brix y pH, previamente y posterior al tratamiento de clarificación con la enzima PGzyme.

Ensayo	° Brix			pH		
	Inicial	Final	Control	Inicial	Final	Control
1	13.00	12.5	12.25	3.43	3.47	3.45
2	13.75	13.00	13.25	3.42	3.41	3.42
3	13.75	12.75	11.75	3.41	3.43	3.55
4	13.00	13.00	13.25	3.43	3.45	3.45
5	13.25	12.50	12.50	3.47	3.50	3.50
6	13.75	12.50	12.00	3.42	3.43	3.43
7	13.25	12.50	11.75	3.43	3.50	3.46
8	13.00	12.75	13.00	3.43	3.45	3.46
9	13.75	12.50	12.50	3.41	3.41	3.43
10	13.75	13.00	13.00	3.42	3.42	3.43
11	13.50	12.75	12.50	3.47	3.52	3.51
12	13.25	11.75	10.75	3.43	3.53	3.48
13	13.75	13.25	13.00	3.42	3.42	3.42
14	13.50	13.00	13.00	3.47	3.49	3.49
15	13.75	12.75	12.25	3.42	3.43	3.42

Se puede observar que no se encontró una diferencia significativa entre los valores medidos antes y después del tratamiento de clarificación con ninguna de las dos enzimas, por lo tanto, podemos concluir que la clarificación no generó ningún cambio importante en las propiedades del jugo. Por este motivo, en los ensayos posteriores no se siguieron midiendo estos parámetros.

5.4. CONCLUSIONES

La enzima PGzyme demostró una excelente capacidad de clarificación del jugo de manzana para la elaboración de sidra. Bajo sus condiciones óptimas calculadas a partir del diseño estadístico Doehlert (20 °C, Enz. 2.2 U/ml y 4.5 hs), clarificó en un 99% el jugo sometido al tratamiento. PGzyme presentó una capacidad igual o incluso superior de clarificación que las enzimas comerciales BA, J1 y J2. Sin embargo, la enzima PPasaSE sólo clarificó el jugo en un 56% comprobando de este modo que no presenta condiciones adecuadas para ser implementada en este proceso.

Por otro lado, al comparar la actividad de PGzyme con los procesos tradicionales de clarificación de sidra, como es el caso de la bentonita enológica, sólo se consiguió una clarificación del 76% en un lapso de 15 días. Con el tratamiento enzimático se consiguieron mejores resultados en un tiempo mucho más reducido, demostrando de esta manera los beneficios que presenta este tratamiento.

Sólo con el tratamiento enzimático se consiguieron inmejorables resultados, sin contar con la necesidad de un tratamiento posterior con agentes clarificantes. Si, es necesaria una filtración posterior para eliminar el coágulo formado por las enzimas.

Los jugos clarificados no presentaron variación en la concentración de sólidos solubles (°Brix) ni en el pH de los mismos.

Las condiciones óptimas resultaron sumamente adecuadas, ya que la temperatura de trabajo, al ser temperatura ambiente, no requiere un gasto energético con el fin de calefaccionar o refrigerar. Además, el tiempo del proceso resultó relativamente corto y la concentración enzimática necesaria muy baja.

Todo lo expuesto anteriormente representa un menor gasto productivo. Además, la obtención de una enzima que demuestre óptimas condiciones para el proceso de clarificación de jugos y sidras, junto con la optimización de las condiciones de dicho proceso se traduce en un beneficio directo para las industrias elaboradoras de estos productos.

5.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah, A. L., Sulaiman, N. M., Aroua, M. K., & Noor, M. M. M. (2007). Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 65-71.
- Alvarez, S., Alvarez, R., Riera, F. A., & Coca, J. (1998). Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 138(2), 377-382.
- Baker, R. A., & Bruemmer, J. H. (1972). Influence of pectate-hesperidin floc on orange juice clarification. *Food Chem*, 5, 283-291.
- Dey, T. B., & Banerjee, R. (2014). Application of decolourized and partially purified polygalacturonase and α -amylase in apple juice clarification. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 97-104.
- Doehlert, D. H. (1970). Uniform shell designs. *Applied statistics*, 231-239.
- Grampp, E. A. (1976). New process for hot clarification of apple juice for apple juice concentrate. *Fluss. Obst*, 43, 382-388.
- Grampp, E. A. (1977). Hot clarification process improves production of apple juice concentrate. *Food Technology*, 31, 38-41.
- Kareem, S. O., & Adebawale, A. A. (2007). Clarification of orange juice by crude fungal pectinase from citrus peel. *Nigerian Food Journal*, 25, 1.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource technology*, 77(3), 215-227.
- Kilara, A. (1982). Enzymes and their uses in the processed apple industry: a review. *Process Biochemistry*, 17, 35-41.
- Kilara, A., & Van Buren, J. P. (1989). Clarification of apple juice. *Processed apple products*. Springer US. 83-96.
- Nagar, S., Mittal, A., & Gupta, V. K. (2012). Enzymatic clarification of fruit juices (apple, pineapple, and tomato) using purified *Bacillus pumilus* SV-85S xylanase. *Biotechnology and Bioprocess engineering*, 17(6), 1165-1175.

- Nakkeeran, E., Umesh-Kumar, S., & Subramanian, R. (2011). *Aspergillus carbonarius* polygalacturonases purified by integrated membrane process and affinity precipitation for apple juice production. *Bioresource technology*, 102(3), 3293-3297.
- Pinelo, M., Zeuner, B., & Meyer, A. S. (2010). Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2), 259-265.
- Rai, P., Majumdar, G. C., Dasgupta, S. D. E. S., & De, S. (2004). Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 64(3), 397-403.
- Ranganna, S. (1977) Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products. Tata McGraw-Hill.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Sautour, M., Rouget, A., Dantigny, P., Divies, C., & Bensoussan, M. (2001). Application of Doehlert design to determine the combined effects of temperature, water activity and pH on conidial germination of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 900-906.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- Saxena S, Shukla S, Thakur A, Gupta R (2008) Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 55:33-51.
- Sin, H. N., Yusof, S., Hamid, N. S. A., & Rahman, R. A. (2006). Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 73(4), 313-319.
- Singh, S., & Gupta, R. (2004). Apple juice clarification using fungal pectinolytic enzyme and gelatin. *Indian journal of Biotechnology*, 3(4), 573-576.

- Vaillant, F., Millan, A., Dornier, M., Decloux, M., & Reynes, M. (2001). Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *Journal of Food Engineering*, 48(1), 83-90.
- Yamasaki, M., T. Yasui, and K. Arima. 1964. Pectic enzymes in the clarification of apple juice. 1. Study on the clarification in a simplified model. *Agric. Biol. Chem.*28: 779-87.
- Zapata Zapata, A. D. (2008). Protopectinasa SE de *Geotrichum klebahnii*: producción, purificación y aplicación al proceso de maceración de tejidos vegetales y extracción enzimática de pectina (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata).

CONCLUSIONES GENERALES

Lo que motivó a la realización de esta tesis fue el estudio de diferentes pectinasas con el fin de evaluar su posible aplicación a nivel industrial. Numerosas características hacen que PGI de *A. kawachii*, PPasa-SE de *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae* sean enzimas con alto potencial de aplicación en procesos tecnológicos.

En cuanto a PGI, fue clonada en *S. cerevisiae* y, por lo tanto, se consiguen niveles de producción de enzima superiores con respecto a las cepas naturales. Además, por el mismo motivo, se obtiene pura en el medio de cultivo lo que representa una ventaja operativa y económica. Por medio de sistemas de cultivo por lotes alimentados con una estrategia de alimentación en dos etapas y un flujo bajo en la segunda alimentación (cultivo 4) se consiguieron niveles aún más superiores de producción. Realizar la inducción junto con la alimentación nos permitió mantener la concentración de glucosa en el reactor cercana a cero y, de esta forma, el promotor GAL no se encuentra reprimido, y el gen *pgl* se expresa favoreciendo la producción enzimática. Asimismo, se logró reducir los costos de producción de la expresión de la enzima, mediante el reemplazo de galactosa comercial por galactosa obtenida por hidrólisis enzimática de lactosa en el medio de cultivo.

El hecho de ser PPasaSE la única enzima extracelular expresada por el hongo levaduriforme *G. klebahnii*, se convierte en una ventaja debido a la posibilidad de utilizarla tanto pura como directamente del sobrenadante del cultivo. Además, el medio de cultivo que utiliza para producir la enzima es sintético y económico, formado por glucosa (como fuente de carbono y energía), urea (como fuente de nitrógeno), sales y micronutrientes.

PGzyme se obtuvo de un cultivo de *Aspergillus sojae* llevado a cabo con un medio mineral suplementado con cáscara de naranja y sulfato de amonio como FCE y FN respectivamente. Esta enzima está recientemente en estudio en cuanto a los sistemas de producción.

Al analizar los posibles frutos que podrían ser utilizados para la extracción de pectina, se determinó que las cáscaras de manzanas, peras y membrillos de la producción del Alto Valle de Río Negro presentan elevados contenidos de pectina en comparación con otros frutos. Por lo tanto, resultaron ser un buen sustrato para la extracción de pectina con distintos fines. Al evaluar la aplicación de las enzimas en estudio a dicho proceso, los

resultados demostraron que las tres enzimas presentaron adecuadas capacidades para la extracción de pectina en cuanto al rendimiento, comportandose de igual o mejor forma que las comerciales que se encuentran en el mercado. Sin embargo, al realizar la caracterización de las distintas pectinas se encontró un GE óptimo en todos los casos, pero no fue así en cuanto al contenido de grupos urónicos presentes en el MIE. Sólo PGI conservó la estructura molecular de la pectina extraída y, por lo tanto, se obtuvieron importantes cantidades de MIE y una alta eficiencia en cuanto al contenido de AGA presente en el mismo. Las pectinas con estas características presentan excelentes propiedades funcionales resultando ser muy buenos aditivos. Por otra parte, quedó confirmado que la extracción química, produce una mayor liberación de grupos metoxilos (disminuyendo el GE) y una significativa despolimerización de la pectina aumentando el contenido de los componentes de menor peso molecular cuya presencia hace que tanto el rendimiento como las propiedades del producto obtenido se vean negativamente afectadas.

En cuanto a la maceración enzimática de tejidos de zapallo y manzana utilizando PPasaSE y PGzyme, se consiguió como actividad final óptima 40 U. Con valores superiores se obtuvo una meseta en los rendimientos indicando que la acción de la enzima está limitada por la superficie del sustrato macerable. Al comparar, a esta actividad, la capacidad de maceración de las enzimas en estudio con las comerciales, se pudo observar que PPasaSE y PGzyme se comportaron tan bien o mejor que BA, J1 y J2. La calidad del TM de zapallo no fue la adecuada, mostrando una actividad antioxidante y un contenido en fenoles totales mayor en el S. Esto sumado a la alta concentración de azúcares en el S, demostró que el tejido de zapallo es más débil que el de manzana (en cuanto a la pectina que contiene), siendo ésta la causa de la mayor degradación celular existente. En cambio en las manzanas, se logró una actividad antioxidante y un contenido en fenoles totales en las fracciones de TM y S similares y con valores muy buenos. Esto indica que durante la maceración enzimática se obtuvieron igual cantidad de células sanas que dañadas. De esta manera, se concluye que la manzana es mejor sustrato para utilizarlo en la maceración enzimática con la finalidad de obtener productos nutracéuticos, ya que conserva en mayor medida, en el TM, los nutrientes propios del tejido vegetal. Por otra parte, las maceraciones mecánicas produjeron con ambos vegetales productos de baja calidad nutricional, dejando en evidencia las bondades de los procesos enzimáticos.

La enzima PGzyme demostró una excelente capacidad de clarificación del jugo de manzana para la elaboración de sidra, presentando bajo sus condiciones óptimas, calculadas a partir del diseño estadístico Doehlert (20 °C, Enz. 2.2 U/ml y 4.5 hs), una capacidad igual

o incluso superior de clarificación que las enzimas comerciales BA, J1 y J2. Sin embargo, la enzima PPasaSE no presenta condiciones adecuadas para ser implementada en este proceso. Comparando la actividad de PGzyme con los procesos tradicionales de clarificación de sidra, como es el caso de la bentonita enológica, se consiguieron clarificaciones inferiores y en lapsos de tiempo prolongados. Las condiciones óptimas obtenidas resultaron sumamente adecuadas, ya que la temperatura de trabajo, al ser temperatura ambiente, no requiere un gasto energético con el fin de calefaccionar o refrigerar. Además, el tiempo del proceso resultó relativamente corto y la concentración enzimática necesaria, muy baja. Todo lo expuesto anteriormente representa un menor gasto productivo. Lograr obtener una enzima que demuestre ventajosas condiciones para el proceso de clarificación de jugos y sidras, junto con la optimización de las condiciones de dicho proceso se traduce en un beneficio directo para las industrias elaboradoras de estos productos.

Con la contribución de estas enzimas de producción local, se lograría reducir los costos para los productores, ya que en la actualidad están siendo obtenidas a través de las importaciones y ésto se traduce en un mayor gasto productivo. Además, teniendo en cuenta los resultados, se concluye que es factible su aplicación a los procesos antes mencionados obteniendo productos de mayor valor agregado a partir de lo que hoy son considerados residuos, ingredientes nutracéuticos con posible uso como suplementos alimenticios, y productos clarificados con tecnologías sencillas.

El trabajo realizado durante el desarrollo de la presente tesis representa un aporte científico-tecnológico al conocimiento, con el cual sería posible contribuir con la economía de las diferentes regiones productivas del país.