

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Doctorado en Ciencias Aplicadas

*Doctoranda*  
**Ing. Silvana Andrea MAIDANA**

## **Extracción enzimática de polisacáridos de interés regional en la provincia de Misiones**

**Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de “Doctor en Ciencias Aplicadas”**

*Directora*  
**Dra. María Alicia MARTOS**

*Director*  
**Dr. Luis Alberto BRUMOVSKY**

**Posadas, 2019**



Esta obra está licenciada bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Universidad Nacional de Misiones  
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales



# **EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE POLISACÁRIDOS DE INTERÉS REGIONAL EN LA PROVINCIA DE MISIONES**

**Por Ing. Silvana Andrea MAIDANA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad  
Nacional de Misiones para optar al grado académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS**

**Posadas, República Argentina**

**2019**

**Director**

Dra. María Alicia MARTOS

**Co-director**

Dr. Luis Alberto BRUMOVSKY

TRIBUNAL EXAMINADOR (Resolución Consejo Directivo N° 366/19)

Dr. Sebastián Fernando Cavalitto (CINDEFI - UNLP)

Dra. María Marcela Brousse (FCEQyN - UNaM)

Dra. Marina Inés QUIROGA (FCEQyN - UNaM)

**DEFENSA ORAL Y PÚBLICA** (Resolución Consejo Directivo N°366-19 y su modificatoria:

Resolución N° 433-19)

02 de Diciembre de 2019.

***A mi mamá y papá, mis principales motores y maestros;  
A mis amigas, las hermanas que elijo a diario;  
A la vida, siempre gracias a la vida.***

**EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE POLISACÁRIDOS DE INTERÉS REGIONAL EN LA  
PROVINCIA DE MISIONES**

**Silvana Andrea MAIDANA**

**Lugar de desarrollo del trabajo de tesis:**

Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Biotecnología “Dr. Fernando O. Benassi”, de  
la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, UNaM.

**COMISIÓN DE SUPERVISIÓN** (Resolución Consejo Directivo N° 199-16)

Dr. Sebastián F. CAVALITTO	(CINDEFI - UNLP)
Dra. Beatriz del Valle ARGÜELLO	(FCEQyN - UNaM)
Dr. Andrés LINARES	(FCEQyN - UNaM)

**CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS APLICADAS**

Proyecto de Carrera N° 10933/11

Con reconocimiento de la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU) N°

344/11

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi Directora de Tesis, Dra. María Alicia Martos por aceptar ser parte de este desafío, por su apoyo y dedicación incondicional, por su generosidad y entrega en interminables horas de trabajo, por ser mi maestra y consejera.*

*A mi Co-Director de Tesis, Dr. Luis Alberto Brumovsky por su apoyo, por haber aceptado dirigirme, por su estímulo e interés en el éxito de mi trabajo, y principalmente por la confianza durante todo este trabajo.*

*A mis compañeras de trabajo, Vanesa, Valeria y Adriana, por su esmero y dedicación, por las largas horas de trabajo y vida compartidas, sin ellas este proyecto no hubiera sido posible, el laboratorio no hubiera tenido música.*

*A mi familia, por su eterno apoyo incondicional, por la paciencia interminable.*

*A mis amigos, por su aliento y confianza constante, Naty, Angi, Gaby, Aly, Lore, Erika, Lau, Julia, Anibal, gracias por acompañarme en cada paso.*

*A la vida, siempre gracias a la vida...*

***Esfuérsate, siempre esperando que suceda lo mejor...***

***Cálmate, esfuérsate y vencerás...***

***Máximas de mi padre.***

## Contenido

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS</b> .....	<b>6</b>
<b>CAPITULO I: Introducción General</b> .....	<b>9</b>
<b>i.1. Sustancias pécticas</b> .....	<b>9</b>
I.1.1. Definición, localización y función principal.....	9
I.1.2. Clasificación de las sustancias pécticas .....	10
I.1.3. Estructura química de las sustancias pécticas .....	10
I.1.4. Propiedades de las pectinas: .....	12
<b>I.2. ENZIMAS PÉCTICAS</b> .....	<b>13</b>
I.2.1. Clasificación .....	13
<b>I.3. PRINCIPALES APLICACIONES DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS</b> .....	<b>19</b>
I.3.1. Maceración: .....	19
I.3.2. Extracción y clarificación de jugos de frutas: .....	20
I.3.3. Extracción de aceites: .....	20
I.3.4. Extracción enzimática de pectina .....	20
I.3.5. Extracción de almidón .....	21
<b>I.4. Producción de enzimas pécticas</b> .....	<b>22</b>
I.4.1. Selección de la cepa productora .....	22
I.4.2. Factores que influyen en la producción de enzimas pécticas.....	23
I.4.3. Residuos industriales para la formulación del medio de cultivo .....	24
I.4.4. Fermentación, recuperación y purificación de enzimas pécticas .....	25
<b>I.5. SISTEMAS DE CULTIVOS TIPO BATCH Y BATCH ALIMENTADO</b> .....	<b>26</b>
I.5.1. Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano .....	26
I.5.2. Balances de materia en un biorreactor .....	29
<b>I.6. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>33</b>
<b>I.7. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>33</b>
<b>CAPITULO II: OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA POLIGALACTURONASA POR WICKERHAMOMYCES ANOMALUS</b> .....	<b>34</b>
<b>II.1. INTRODUCCION</b> .....	<b>35</b>
<b>II.2. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>36</b>
II.2.1. Microorganismo, mantenimiento y conservación .....	36
II.2.2. Medios de cultivo .....	36
II.2.3. Producción de la enzima PGasa por <i>W. anomalus</i> .....	37
II.2.4. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de PGasa por <i>W. anomalus</i> .....	38
II.2.5. Efecto de los componentes nutricionales sobre la producción de PGasa por <i>W. anomalus</i> .....	40
II.2.6. Validación de los modelos experimentales .....	44
II.2.7. Cultivos a escala biorreactor .....	44
II.2.8. Determinaciones analíticas.....	46
<b>II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>47</b>
II.3.1. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de PGasa por <i>W. anomalus</i> .....	47
II.3.2. Efecto de los componentes nutricionales en la producción de PGasa por <i>W. anomalus</i> .....	50
II.3.3. Validación del modelo experimental.....	58
II.3.4. Cultivos a escala biorreactor .....	58
<b>II.4. CONCLUSIONES</b> .....	<b>60</b>
<b>CAPITULO III: USO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA POLIGALACTURONASA POR WICKERHAMOMYCES ANOMALUS</b> .....	<b>62</b>
<b>III.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>64</b>

<b>III.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
III.2.1. Microorganismo.....	65
III.2.2. Medios de cultivos.....	65
III.2.3. Producción de la enzima PGasa por <i>W. anomalus</i> a escala frascos agitados.....	66
III.2.4. Caracterización de residuos agroindustriales.....	66
III.2.5. Selección del residuo agroindustrial mediante la metodología de un factor por vez.....	66
III.2.6. Diseños experimentales y análisis estadístico para la optimización del medio de cultivo.....	67
III.2.7 Validación de los modelos experimentales.....	68
III.2.8. Producción de la enzima PGasa por <i>W. anomalus</i> a escala biorreactor.....	68
<b>III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>69</b>
III.3.1. Caracterización de residuos agroindustriales.....	69
III.3.2. Selección del residuo agroindustrial mediante la metodología de un factor por vez.....	71
III.3.3. Diseños experimentales y análisis estadístico para la optimización del medio de cultivo.....	72
III.3.4. Validación del modelo experimental.....	78
III.3.5. Producción de la enzima PGasa por <i>W. anomalus</i> a escala biorreactor.....	78
III.3.6. Comparación de medios.....	80
<b>III.4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>CAPITULO IV: EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN DE MANDIOCA CON PGASA DE <i>WICKERHAMOMYCES ANOMALUS</i> .....</b>	<b>83</b>
<b>IV.1. INTRODUCCION.....</b>	<b>85</b>
<b>IV.2. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>86</b>
IV.2.1. Obtención del Extracto Enzimático.....	86
IV.2.2. Obtención de la materia prima.....	86
IV.2.3. Protocolo de la extracción enzimática de almidón.....	87
IV.2.4. Influencia de diferentes factores en el proceso de extracción enzimática de almidón.....	87
IV.2.5. Metodología de superficie de respuesta: optimización de la temperatura y el tiempo de extracción.....	89
IV.2.6. Comparación de rendimientos de extracción con enzimas comerciales.....	90
IV.2.7. Escalado del proceso de extracción del almidón de mandioca con el EE de <i>W. anomalus</i> .....	90
IV.2.8. Caracterización del almidón extraído.....	90
<b>IV.3. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>94</b>
IV.3.1. Influencia de diferentes factores en el proceso de extracción enzimática de almidón.....	94
IV.3.2. Protocolo del tratamiento del ME modificado.....	101
IV.3.3. Metodología de superficie de respuesta: optimización de la temperatura y el tiempo de extracción.....	101
IV.3.4. Comparación de rendimientos de extracción con enzima comercial.....	104
<b>Enzima.....</b>	<b>104</b>
<b>EE PGasa de <i>W. anomalus</i>.....</b>	<b>104</b>
<b>32,57±0,412.....</b>	<b>104</b>
<b>Enzima comercial.....</b>	<b>104</b>
<b>21,58±0,514.....</b>	<b>104</b>
<b>Control (sin enzima).....</b>	<b>104</b>
<b>6,36±0,615.....</b>	<b>104</b>
<b>La extracción de almidón.....</b>	<b>104</b>
IV.3.5. Extracción enzimática de almidón a mayor escala.....	104
IV:3.6. Protocolo de extracción definitivo.....	107
IV.3.7. Caracterización del almidón extraído.....	108
<b>8.....</b>	<b>113</b>
<b>12.....</b>	<b>113</b>
<b>20.....</b>	<b>113</b>

440 .....	113
80 .....	113
120 .....	113
235 .....	113
<b>IV.4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>116</b>
<b>CAPITULO V: EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE PECTINA A PARTIR DE RESIDUOS DE LIMÓN, CON PGASA DE WICKERHAMOMYCES ANOMALUS.....</b>	<b>118</b>
<b>V.1. INTRODUCCION .....</b>	<b>119</b>
<b>V.2. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>119</b>
V.2.1. Obtención del Extracto Enzimático. ....	119
V.2.2. Obtención de la materia prima. ....	120
V.2.3. Protocolo de extracción de pectina .....	120
V.2.4. Influencia de diversos factores sobre el proceso de extracción de pectina.....	122
V.2.5. Caracterización de la pectina extraída.....	123
<b>V.3. RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>127</b>
V.3.1. Influencia de diversos factores sobre el proceso de extracción de pectina.....	127
V.3.2. Comparación de rendimientos de extracción con una enzima comercial y el método químico .....	132
V.3.3. Protocolo de extracción definitivo .....	134
V.3.4. Caracterización de la pectina .....	135
<b>V.4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>137</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>138</b>

## RESUMEN

Las enzimas pecticas o pectinasas constituyen el único grupo de enzimas que catalizan la degradación de las sustancias pécticas presentes en la pared celular de plantas superiores. Según su modo de acción se clasifican en: poligalacturonasas (PGasas), liasas (pectinliasa (PL) o pectatoliasa (PAL)) y pectinesterasa (PE). Las PGasas y liasas son enzimas depolimerizantes, rompen los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1,4) entre los monómeros de los ácidos galacturónicos de las sustancias pécticas, ya sea por un mecanismo de hidrólisis (PGasas) o por un mecanismos de  $\beta$  eliminación (PL y PAL). PE cataliza la desesterificación de los grupos metoxilos de las moléculas de pectina, formando ácido péctico. Las pectinasas son ampliamente utilizadas en el procesamiento industrial de frutas y vegetales porque disminuyen la viscosidad de los jugos y facilitan los procesos de extracción, maceración, licuefacción y clarificación.

*Wickerhamomyces anomalus*, es una levadura autóctona, aislada a partir de frutas cítricas en la Provincia de Misiones, Argentina, que produce una poligalacturonasa (PGasa) en forma extracelular. Esta enzima es de gran importancia industrial ya que es capaz (a diferencia de otras PGasas) de desintegrar tejidos de mandioca cruda, liberando los gránulos de almidón del interior de las células; y de liberar pectina de tejidos vegetales.

En la presente Tesis Doctoral se plantearon dos etapas claramente diferenciadas pero concatenadas, una dedicada a la producción de la PGasa por *W. anomalus*; y otra en la cual se utilizaron los sobrenadantes de dichos cultivos en el proceso de extracción enzimática de polisacáridos de interés regional (almidón de mandioca y pectina cítrica).

### ***Parte A: Optimización de la producción de la enzima PGasa por W. anomalus.***

1. Se optimizaron las condiciones de cultivo para la producción de PGasa a partir de *W. anomalus*. Las fermentaciones se realizaron inicialmente, en un medio de referencia (MR) compuesto por glucosa, pectina cítrica, sulfato de amonio, vitaminas, aminoácidos,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  y micronutrientes ( $\text{Mo}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ ), a escala frascos agitados, a 30°C, 180 rpm, durante 16 h. Se evaluó el efecto de las condiciones de cultivo: temperatura de incubación (30 a 40 °C), pH (4,5 a 6,5) y velocidad de agitación (150 a 250 rpm) sobre la producción de PGasa. Se aplicó inicialmente un diseño factorial  $2^3$  y posteriormente la metodología de superficie de respuesta. El pH y la temperatura influyeron significativamente en la producción de la enzima PGasa, mientras que la influencia de la velocidad de agitación fue no significativa. Los mayores títulos se obtuvieron a 30°C y pH de 5,1; con un valor máximo de actividad PGasa de 18,84 UE/mL.

2. Se estudió la influencia de la composición de los componentes del medio de cultivo sobre la producción de PGasa, en busca de un medio económico y de simple preparación. El efecto de la fuente de nitrógeno (FN) y de los elementos traza, se estudió por el método de un factor por vez. Según el análisis de varianza no hubo diferencias significativas entre los valores de síntesis de PGasa con urea o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. El pH se mantuvo ~4,0 en el transcurso del proceso fermentativo al utilizar urea como FN, a diferencia de lo observado en el medio que contenía sulfato de amonio, en el cual el pH disminuyó

hasta 2,6 luego de 16 h. Se decidió utilizar urea como FN para los estudios posteriores. La ausencia de elementos traza en el medio de referencia tuvo un efecto represivo sobre la síntesis enzimática. Posteriormente, se aplicó el diseño experimental de Plackett-Burman (PB) para evaluar el efecto en el MR, de la pectina comercial, extracto de levadura, presencia/ausencia de elementos traza,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , los factores significativos y con efecto positivo se optimizaron por el método de superficie de respuesta (MSR). Del diseño experimental de PB, resultó que la pectina y el extracto de levadura influyeron positivamente sobre la producción de PGasa, mientras que el  $\text{Ca}^{+2}$  influyó de manera negativa. Mediante la MSR se observó un aumento en la producción de la enzima hasta una concentración de 0,75 g/L de extracto de levadura y 6 g/L de pectina, alcanzando valores de PGasa de ~ 25,5 U/mL.

El medio de cultivo optimizado quedó compuesto de la siguiente manera: glucosa 10 g/L; pectina cítrica comercial 6 g/L; urea 1,4 g/L; extracto de levadura 0,75 g/L;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  0,5 g/L;  $\text{CaCl}_2$  0,05 g/L;  $\text{MgSO}_4$  0,25 g/L.

3. Se estudió la producción enzimática a escala bioreactor, en las condiciones y con el medio de cultivo optimizados en las etapas anteriores, mediante dos sistemas de cultivo: tipo batch y tipo batch alimentado. Se utilizó un biorreactor de 5 L conteniendo 3 L de medio, a 30 °C, 550 rpm, con suministro de aire estéril.

Mediante el cultivo batch, *W. anomalus* creció en fase exponencial hasta las 10 h de cultivo. La glucosa se agotó cuando el cultivo alcanzó la fase de crecimiento estacionario. La biomasa producida condujo a un rendimiento de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) de 0.30 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>. Se calculó una tasa de crecimiento específica máxima ( $\mu_m$ ) de 0.164 h<sup>-1</sup> ( $R^2$ : 0.92). La síntesis de PGasa pareció estar asociada al crecimiento de la levadura, alcanzando  $25.52 \pm 0.147$  UE/mL al final del cultivo. El pH se mantuvo en valores cercanos a 4.0 en el curso del proceso. Durante el crecimiento de *W. anomalus*, usando cultivo tipo batch alimentado a caudal constante ( $F = 60$  mL/h), se observó un incremento en la expresión de la enzima. La actividad PGasa obtenida fue de  $48.93 \pm 0.38$  UE/mL, correspondiente a una productividad de 3.19 UE/mLh.

4. Se optimizó otro medio de cultivo utilizando residuos agroindustriales. Los residuos agroindustriales se caracterizaron por la determinación de su composición centesimal, y el contenido de pectina. Las fermentaciones se realizaron en el medio de referencia (MR), a escala frascos agitados, a 30°C, 150 rpm, durante 16 h. Se evaluó el uso de ocho residuos agroindustriales crudos (residuos de cáscara de naranja, limón, banana, pomelo, maracuyá, ananá y mamón) como inductores de la producción de PGasa de *W. anomalus*, en lugar de pectina de citrus comercial, por el método de un factor por vez. El residuo de limón, fue el mejor inductor para la producción de PGasa por *W. anomalus*, se obtuvo una actividad relativa de 5.09 % superior (21.735UE/mL) a la obtenida en el MR. Posteriormente se aplicó el diseño experimental de Plackett-Burman, para evaluar los siguientes factores: residuo agroindustrial seleccionado,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , presencia/ausencia de extracto de levadura, aminoácidos, elementos traza y  $\text{Fe}^{+2}$ . Los cultivos realizados en el MR, con pectina de citrus comercial como inductor, fueron considerados como control. El diseño Plackett-Burman mostró que el residuo de limón,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  tuvieron un efecto significativo en la producción de PGasa. El efecto de las otras variables (extracto de levadura,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ , aminoácidos y solución de elementos traza) no fue significativo. Los factores significativos y positivos ( $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ ) se

mantuvieron en su nivel más alto. Las otras variables no significativas (extracto de levadura,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ , aminoácidos y solución de elementos traza), se omitieron y la pectina comercial se reemplazó por el residuo de limón. A continuación, se empleó un método de superficie de respuesta, utilizando el diseño experimental de Doehlert, para encontrar la concentración óptima del residuo de limón y el tiempo de fermentación, para la producción de la enzima. La síntesis de la enzima aumentó cuando la concentración del residuo de limón disminuyó del 10% (p/v) al 2% (p/v). A medida que el tiempo de fermentación aumentó de 3 a 12 h, se observó una mayor producción de PGasa. Se obtuvo un valor máximo de PGasa de  $30.06 \pm 1.27$  UE/mL, en el medio con 2% (p/v) de residuo de limón a las 12 h de cultivo.

El nuevo medio de cultivo optimizado, conteniendo residuo agroindustrial como inductor quedó compuesto de la siguiente manera: glucosa 10 g/L; residuo de limón 2 % p/v; urea 1,4 g/L;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  0,5 g/L;  $\text{MgSO}_4$  0,25 g/L; solución de vitaminas 1000X. La producción de la enzima en este medio optimizado se realizó a escala biorreactor, mediante sistema tipo batch. La producción detectable de PGasa comenzó a las 2 h, obteniendo una producción máxima a las 12 h, la que coincidió con el agotamiento de la glucosa. A partir de este momento, la actividad enzimática en el sobrenadante del cultivo se mantuvo constante. Se obtuvo una producción enzimática máxima de  $31,28 \pm 0,93$  UE/ml a las 12 h.

### ***Parte B. Aplicación del extracto enzimático de *W.anomalous* en procesos tecnológicos de interés regional.***

1. Se puso a punto un protocolo para la extracción enzimática de almidón a partir de mandioca cruda, utilizando los sobrenadantes del cultivo de *W. anomalous* (extracto enzimático – EE). Para el proceso de extracción, la mandioca pelada y cortada, se colocó en frascos Erlenmeyers a los que se les agregó el EE y buffer de reacción. La mezcla se incubó a 40°C, durante 6 h, en una incubadora con agitación y posteriormente se filtró. El filtrado, denominado material extraído (ME), se centrifugó, lavó y secó a 45°C hasta peso constante. Se estudiaron diferentes factores sobre el rendimiento del proceso extractivo: tamaño de tejido (bastones, cubos, láminas, rallado y triturado); dosis de la enzima (15, 30 y 45 mL); relación sólido/líquido (g/mL) (30:20, a 30:100); temperatura (30 a 50°C) y tiempo de extracción (1 a 6 h), a los efectos de encontrar las condiciones óptimas que permitan alcanzar los mayores rendimientos de producto. La mandioca “procesada (MP)” permitió un mayor rendimiento de extracción. Los blancos con el EE inactivo arrojaron valores despreciables. Los mayores rendimientos de almidón se obtuvieron con una relación sólido/líquido de 30:60 g/mL. La dosis de enzima, influyó significativamente en el rendimiento del proceso extractivo, los mayores rendimientos resultaron con un volumen del EE de 30 mL (PGasa en el medio de reacción: ~15,5 UE/mL). Posteriormente, se optimizó la temperatura y tiempo de extracción, utilizando metodología de superficie de respuesta, según el diseño experimental de Doehlert. El óptimo rendimiento de extracción de almidón se presentó a 40°C y 5 h de extracción. La ecuación polinomial de segundo orden determinó un valor máximo de extracción de almidón de  $32,57 \pm 0,41$  % (p/p). Al realizar la extracción a escala reactor, en las condiciones optimizadas, se obtuvo un rendimiento de  $33,06 \pm 0,49$  % (p/p). El protocolo final de extracción resultó ser: mandioca cruda, lavada y procesada (MP) + EE (relación

S/L 30/60 – PGasa = 15 UE/mL), incubación (40 °C, 5 h, 400 rpm), filtración, lavado (2 veces), sedimentación y descarte sobrenadante, secado, molido y tamizado.

2. Se evaluaron las características químicas y funcionales del almidón extraído por vía enzimática (AE) y se comparó con el del almidón comercial (AC). EL AE presentó contenidos de humedad, proteína, fibra cruda y grasa levemente mayores a los que presentó el AC. El contenido de cenizas y carbohidratos del AE, resultó ligeramente menor al de AC y estos valores estuvieron dentro de los parámetros exigidos por el Código Alimentario Argentino. El mayor índice de solubilidad en agua (% ISA) y poder de hinchamiento (PH) se presentó a los 70 °C en ambos almidones. El PH del AE presentó un valor ligeramente menor respecto al del AC, siendo los valores obtenidos de 1,97  $\text{g}_{\text{agua}}/\text{g}_{\text{AE}}$  y 2,08  $\text{g}_{\text{agua}}/\text{g}_{\text{AC}}$ , para AE y AC, respectivamente. Dichos valores se encuentran dentro del rango de referencia establecido por la Food and Agriculture Organization (FAO, 2007). Respecto a los valores de ISA, el AC no presentó diferencia significativa en comparación con el AE (3,14% y 3,97% respectivamente). El AE presentó una temperatura de empastamiento (comienzo de la gelatinización) de 63,5 °C, un pico de viscosidad máxima de 355 UB, la viscosidad de la pasta a los 95 °C fue de 352,5 UB, la estabilidad de la pasta durante la cocción (breakdown) fue de 132,5 UB y la tendencia a la retrogradación (setback) fue de 80 UB. La sinéresis debido a la refrigeración y congelación de las pastas de AE fue más alta respecto a la del AC. Esto implica que la pasta de AE resultó ser menos estable a ambos procesos que la de AC. Los valores de transmitancia (%T) obtenidos fueron de 52,32%T para AE, semejante al obtenido para AC (55,17%T). La pasta de AE es considerada una pasta clara o transparente. La temperatura de gelificación resultante para AE fue de 63°C. El AE podría ser utilizado en alimentos como mermeladas, gelatinas, y en confitería para la elaboración de gomitas, etc.

3. Se puso a punto un protocolo para la extracción enzimática de pectina a partir de residuos de limón, utilizando los sobrenadantes del cultivo de *W. anomalous*. El proceso de extracción de pectina se realizó en frascos Erlenmeyers conteniendo albedo de limón, buffer de reacción y el extracto enzimático crudo de *W. anomalous*. La mezcla se incubó a 30°C, durante 6 h, con agitación, pH 5,0, y luego se centrifugó. El material polimérico obtenido, se precipitó con etanol y el peso seco del gel obtenido se denominó material insoluble en etanol (MIE). El rendimiento de extracción de pectina se reportó como g de MIE por cada 100 g de albedo seco. Los factores evaluados fueron: relación sólido/líquido (1:20, 1:40, 1:50 y 1:60), actividad enzimática (3,125, 6,25, 12,5 y 25 mL), temperatura (30 a 50°C) y tiempo de extracción (1 a 8 h). Estos rendimientos se compararon con la pectina obtenida utilizando un método químico. Los mejores rendimientos de MIE (35,93± 0,67 % (p/p)) se obtuvieron con una relación sólido/líquido de 1/50, 12,5 mL del EE (actividad PGasa en el medio de reacción: 4,28 UE/mL), 40°C, 4 h y pH 5,0. Este valor fue superior al obtenido utilizando el método químico. La pectina se determinó como la cantidad de ácido galacturónico (AGA) solubilizado, por el método del *m*-hidroxidifenilo. Se caracterizó mediante la determinación del grado de esterificación (GE), empleando el método titulométrico; y la capacidad de gelificación en un producto alimenticio mediante la elaboración de una mermelada. Se observó que los rendimientos obtenidos en el presente estudio empleando el EE de *W. anomalous* fueron mayores a los obtenidos por el método químico y con la enzima comercial. El grado de esterificación de la pectina extraída fue del 79,10 %, siendo una pectina

HM. La riqueza en ácido galacturónico (AGA) de la pectina extraída fue del 82,57 %, indicando que la misma es lo suficientemente pura. La pectina extraída presentó buena capacidad gelificante.

## PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

### 1. Presentaciones a Congresos

- Título: Caracterización química y microscópica de almidón de mandioca extraída por PGasa de *Wickerhamomyces anomalus*. Autores: MAIDANA, Silvana A.; NOVO, Paola S.; ESTECHE, Vanesa P.; BRUMOVSKY, Luis A.; MARTOS, María A. Nombre de la Reunión Científica: II Jornada Internacional de Biotecnología para el Desarrollo Sostenible Evento: Jornada. Organizado por: Facultad de Ciencias y Tecnología – Universidad Nacional de Itapúa. Modalidad: Oral. Lugar: Encarnación, Paraguay – 2019.
- Título: Optimización del proceso de extracción enzimática de almidón de mandioca. Autores: S.A. Maidana; V. P. Esteche; V. Fernández Muller; E.R.Zubreski; A. P. Butiuk; L. A. Brumovsky; M.A. Martos. Nombre de la Reunión Científica: Simposio Argentino de Bioprocesos. Evento: Jornadas. Organizado por: PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos). Modalidad: Poster y oral. Lugar: San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina – 2018.
- Título: Efecto de diferentes factores sobre el proceso de extracción de almidón de mandioca con una poligalacturonasa microbiana. Autores: S.A. Maidana; V. P. Esteche; V. Fernández Muller; E.R.Zubreski; A. P. Butiuk; L. A. Brumovsky; M.A. Martos. Nombre de la Reunión Científica: Simposio Argentino de Bioprocesos. Evento: Jornadas. Organizado por: PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos). Modalidad: Poster. Lugar: San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina – 2018.
- Título: Influencia de diferentes factores sobre el proceso de extracción enzimática de almidón de mandioca. Autores: S.A. Maidana; E.R.Zubreski; V. P. Esteche; V. Fernández Muller; L. A. Brumovsky; M.A. Martos. Nombre de la Reunión Científica: Jornadas Científico Tecnológicas UNaM. Evento: Jornadas. Organizado por: Universidad Nacional de Misiones. Modalidad: Poster. Lugar: Posadas, Misiones, Argentina – 2018.
- Título: Optimización de la producción de una enzima microbiana utilizando un residuo agroindustrial como inductor. Autores: S.A. Maidana; E.R.Zubreski; V. P. Esteche; V. Fernández Muller; L. A. Brumovsky; M.A. Martos. Nombre de la Reunión Científica: Jornadas Científico Tecnológicas UNaM. Evento: Jornadas. Organizado por: Universidad Nacional de Misiones. Modalidad: Poster. Lugar: Posadas, Misiones, Argentina – 2018.
- Título: Residuos agroindustriales como inductor efectivo de bajo costo para la producción de una polialacturonasa de interés en tecnología de alimentos. Autores: S.A. Maidana; E.R.Zubreski; V. P. Esteche; V. Fernández Muller; L. A. Brumovsky; M.A. Martos. Nombre de la Reunión Científica: XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología. Evento: Congreso. Organizado por: Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. Modalidad: Poster. Lugar: Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina – 18-20 de Septiembre 2017.

- Título: Escalado en la producción de una poligalacturonasa para su utilización en extracción de almidón de mandioca. Autores: S.A. Maidana; E.R.Zubreski; V. P. Esteche; V. Fernández Muller; L. A. Brumovsky; M.A. Martos. Nombre de la Reunión Científica: XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología. Evento: Congreso. Organizado por: Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. Modalidad: Poster. Lugar: Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina – 18-20 de Septiembre 2017.
- Título: Optimización del medio de cultivo para la producción de una poligalacturonasa microbiana. Autores: Maidana SA, Steckler AV, Zubreski ER, Brumovsky LA, Martos MA. Evento: VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Organizado por: Dirección de Vinculación Tecnológica, Secretaría de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Industria, Comercio, Minería y Desarrollo Científico Tecnológico del Gobierno de la Provincia de Córdoba. Fecha: 02 al 04 de noviembre de 2016. Lugar: Córdoba, Argentina. Tipo de trabajo: Trabajo Completo. Modalidad: Poster. ISBN-978-987-45380-0-0.
- Título: Diseños estadísticos aplicados a la mejora de producción de una endo-PGasa microbiana. Autores: Maidana SA, Steckler AV, Zubreski ER, Brumovsky LA, Martos MA. Evento: VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Organizado por: Dirección de Vinculación Tecnológica, Secretaría de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Industria, Comercio, Minería y Desarrollo Científico Tecnológico del Gobierno de la Provincia de Córdoba. Fecha: 02 al 04 de noviembre de 2016. Lugar: Córdoba, Argentina. Tipo de trabajo: Trabajo Completo. Modalidad: Poster. ISBN-978-987-45380-0-0.
- Título: Cinética de extracción de pectina con una poligalacturonasa de origen microbiano. Autores: Maidana S.A.; Danovich L.; Steckler A.; Zubreski, E.R; Martos M.A.Nombre de la Reunión Científica: XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología. Evento: Congreso. Organizado por: Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. Modalidad: Poster. Lugar: Buenos Aires, Argentina – Noviembre 2015. ISBN: 978-987-45738-5-8.
- Título: Caracterización parcial de almidón de mandioca extraído por vía enzimática. Autores: Maidana S.A.; Zubreski, E.R; Martos M.A.; Brumovsky L.A.Nombre de la Reunión Científica: XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología. Evento: Congreso. Organizado por: Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. Modalidad: Poster. Lugar: Buenos Aires, Argentina – Noviembre 2015. ISBN: 978-987-45738-5-8.
- Título: Extracción de almidón nativo de mandioca mediante un método enzimático. Autores: Maidana S.A.; Cruz, N. E.; Zubreski, E.R; Martos M.A. Nombre de la Reunión Científica: IX Jornadas Científico Tecnológicas FCEQyN – UnaM. Evento: Jornada. Organizado por: Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Modalidad: Poster. Lugar: Posadas, Misiones, Argentina - 2015

- Título: Extracción enzimática de albedo de limón con una endo-poligalacturonasa de *Wickerhamomyces anomalus*. Autores: Danovich L.; Maidana S.A.; Steckler A.; Zubreski, E.R; Martos M.A. Evento: IX Jornadas Científico. Tecnológicas FCEQyN – UNaM Tipo de reunión científica: Jornada. Organizado por: Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Modalidad: Poster. Lugar: Posadas, Misiones, Argentina - 2015

## 2. Publicaciones

- Silvana A. Maidana, Vanesa P. Esteche, Roque A. Hours, Luis A. Brumovsky, María A. Martos. (2019). Use of agro-industrial wastes for the production of a wild yeast enzyme with disintegration activity on plant tissues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, (presentado 28/08/2019).
- Maidana, Silvana A.; Danovich, Claudia L.; Zubreski, Emilce R.; Martos, María A. (2019). Extracción de pectina a partir de albedo de limón con una poligalacturonasa de *Wickerhamomyces anomalus*. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 32 (en prensa).
- Maidana, Silvana A.; Mieres, Alicia A.; Zubreski, Emilce R.; Martos, María A. (2019). Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de una poligalacturonasa microbiana. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 32 (en prensa).
- Silvana A. Maidana, Ana P. Butiuk, Emilce R. Zubreski, Roque A. Hours, Luis A. Brumovsky, María A. Martos. (2019). Production of an endopolygalacturonase from *Wickerhamomyces anomalus* with disintegration activity on plant tissues. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18: 101042, (en prensa).

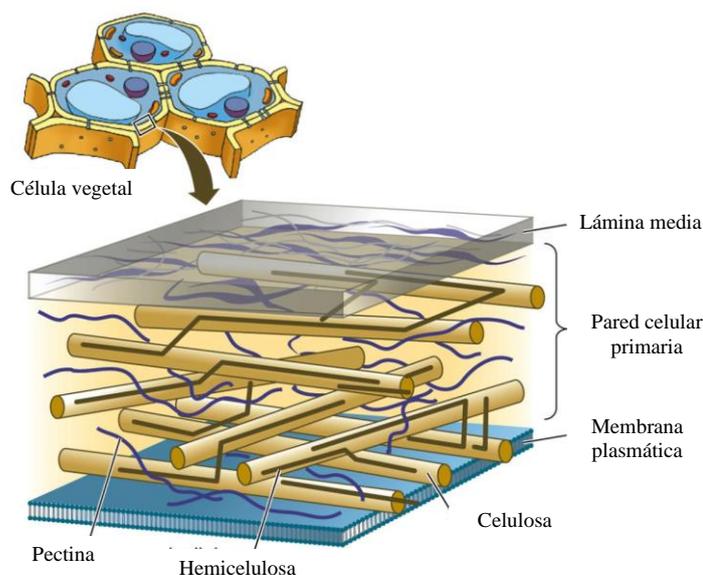
## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

### I.1. SUSTANCIAS PÉCTICAS

#### *I.1.1. Definición, localización y función principal*

Las sustancias pécticas son polisacáridos ácidos complejos, de elevado peso molecular, presentes en la pared celular de plantas superiores. Se las encuentra en la mayor parte de los tejidos vegetales, donde desempeñan una importante función en el mantenimiento de su textura.

La pared celular de las células vegetales está formada por dos capas: la pared secundaria más interna compuesta básicamente de fibras de celulosa y hemicelulosa y la pared primaria, más externa, formada por las mismas fibras embebidas en sustancias pécticas y algo de proteínas. Las paredes primarias de dos células contiguas se hallan unidas por la laminilla media. La misma, está formada principalmente por sustancias pécticas, libre de celulosa y hemicelulosa, las que se encuentran en forma libre o como sales cálcicas y que cumplen el rol de “sustancia cementante” (Fig. I.1) (Ishii, 1976). La degradación de las mencionadas estructuras, mediante enzimas específicas, conduce a la desintegración de los tejidos con separación de las células, proceso denominado “maceración” (Rombouts & Pilnik, 1980).



**Figura I.1:** Detalle de los componentes de la pared celular de vegetales superiores

(Life- The Science of Biology 9ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2011)

Las sustancias pécticas representan entre el 0,5 % al 4 % del peso húmedo del material vegetal. Como todos los polisacáridos, no tienen un peso molecular definido, este depende de la fuente de la cual se obtienen, generalmente está entre 25 a 369 kDa (Tabla I.1) (Jayani y col., 2005).

**Tabla I.1:** Peso molecular de algunas sustancias pécticas.

Fuente	Peso molecular (kDa)
Manzana y limón	200-360
Pera	25-35
Naranja	40-50

(Jayani y col., 2005).

### ***1.1.2. Clasificación de las sustancias pécticas***

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

Las sustancias pécticas pueden ser clasificadas en cuatro grupos principales según la American Chemical Society (Committee for the Revision of the Nomenclature of Pectic Substances, 1944):

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

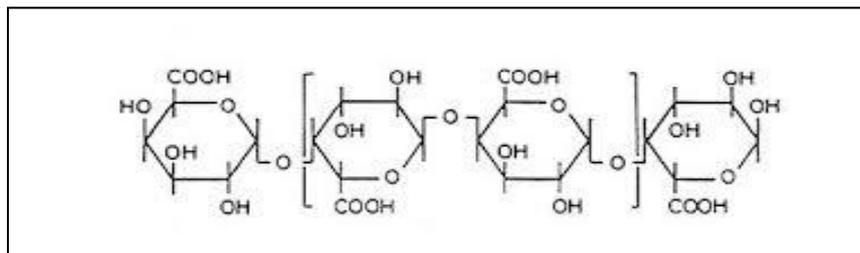
b) Acidos pectínicos: son sustancias pécticas coloidales, parcialmente esterificadas con grupos metílicos.

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

d) Protopectina: es la sustancia péctica insoluble en agua en el estado en la cual se halla naturalmente en los tejidos vegetales. Produce pectina soluble luego de una hidrólisis limitada mediante tratamiento con enzimas, ácidos u otros reactivos. Se encuentra fija en los tejidos vegetales, ligada a los componentes celulósicos de las paredes celulares. Se la puede considerar como un derivado de ácido poligalacturónico de alto peso molecular que está químicamente unido y mecánicamente inmerso dentro de otros constituyentes de la pared celular vegetal. Puede ser extraída del tejido vegetal por métodos degradativos únicamente (Naidu & Panda, 1998; Obergozo, 2002; Jayani y col., 2005).

### ***1.1.3. Estructura química de las sustancias pécticas***

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



**Figura I.2:** Estructura del ácido poligalacturónico.

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

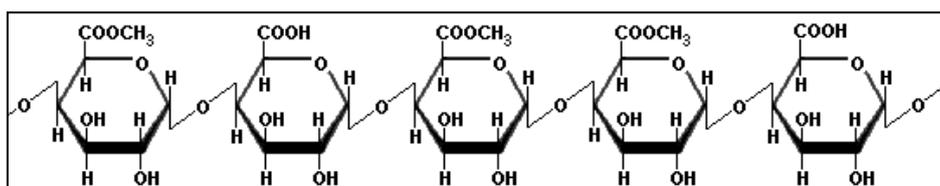
Como parámetro de la cantidad de grupos esterificados con metanol se usan alternativamente dos criterios distintos, a saber: el grado de esterificación (GE) y el contenido de metoxilos. El GE, se define como el número de residuos de AG esterificados sobre el total de ellos, expresado en tanto por ciento.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

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

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

Pocos son los vegetales que presentan una estructura tan simple, en su mayoría las pectinas poseen una estructura más compleja. Las pectinas contienen dos regiones bien definidas. La primera es la región denominada *lisa* y la segunda es la denominada región *pilosa* (Contreras Esquivel, 2003; Zapata Zapata, 2008).

a) *Región lisa*: compuesta principalmente por los esqueletos de restos de AG, parcialmente esterificados con metanol en el C-6 y/o con ácido acético en C-2. A esta estructura se la denomina *homogalacturonano* (HG) y debido a que no contiene esencialmente ramificaciones o cadenas laterales se la denomina región *lisa*. La Figura I.3 muestra una porción de la región del esqueleto del HG.



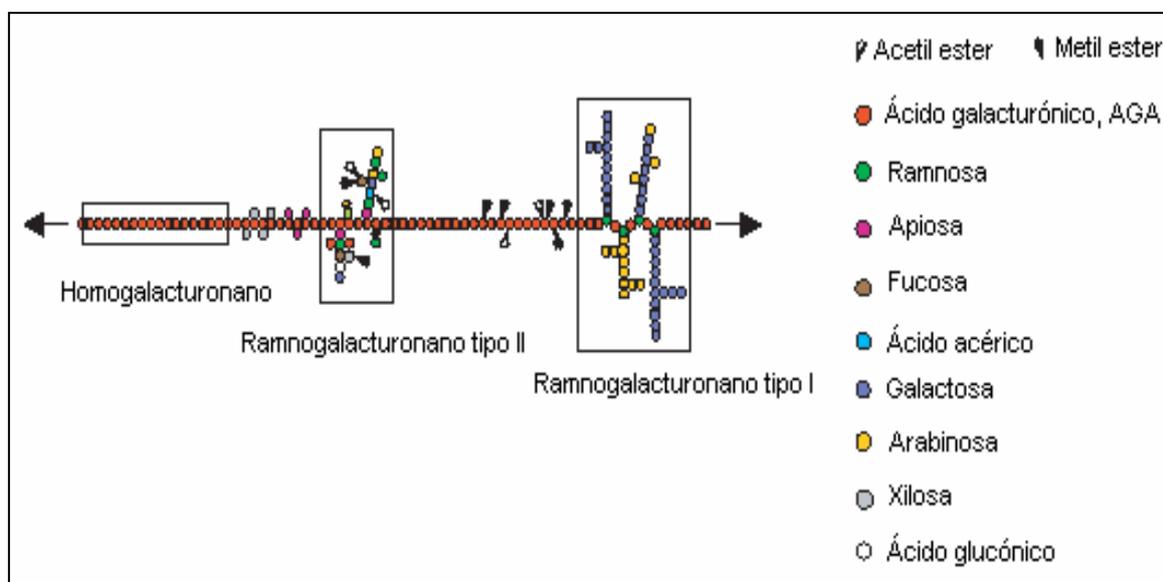
**Figura I.3:** Estructura del homogalacturonano encontrado en las regiones lisas de la molécula de pectina.

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

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

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

En la Figura I.4 se muestra la estructura esquemática de la pectina, y se identifican claramente las regiones principales que la conforman.



**Figura I.4:** Estructura esquemática de la pectina. (Pedrolli y col., 2009).

#### ***1.1.4. Propiedades de las pectinas:***

##### *Solubilidad:*

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

##### *Gelificación:*

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

a) *Pectinas de alto metoxilo (HM)*: las pectinas HM sólo gelifican en presencia de concentraciones relativamente altas de azúcar y en medio ácido. Se producen zonas de unión en la molécula por interacciones hidrofóbicas entre los ésteres metílicos y formación de puentes de hidrógeno. Para la gelificación de las pectinas de HM es necesario un pH inferior a 3,5, de esta manera, los grupos ácidos se encuentran no disociados y pueden formar puentes de hidrógeno. Además es necesaria una concentración de sólidos solubles mayor al 60 % para que se favorezcan las interacciones hidrofóbicas. La mermelada es un ejemplo claro, es ácida, tiene alta concentración de azúcares, y por ello la pectina está en estado de gel. Para elaborar estos geles, se solubiliza la pectina por calentamiento y se gelifica al enfriar.

La fuerza del gel vendrá dada en función del grado de esterificación; a mayor grado de esterificación, mayor serán las interacciones hidrofóbicas por lo que el gel será más fuerte. Además, comenzará a gelificar a temperaturas más altas (Hours y col., 1988).

b) *Pectinas de bajo metoxilo (LM)*: las pectinas LM, gelifican en ausencia de azúcar pero en presencia de concentraciones de iones, particularmente divalentes ( $\text{Ca}^{+2}$ ). Las condiciones que deben darse son: presencia de calcio, un pH entre 1,0 y 7,0 o incluso mayor. Si la cantidad de calcio es muy elevada dará lugar a la precipitación de pectato cálcico.

## **I.2. ENZIMAS PÉCTICAS**

Las enzimas que hidrolizan sustancias pécticas se conocen como enzimas pécticas, enzimas pectinolíticas o simplemente pectinasas. Las enzimas pécticas constituyen el único grupo de enzimas que catalizan la degradación de las sustancias pécticas presentes en la pared celular de las plantas, por lo tanto juegan un rol significativo en los cambios que ocurren en el almacenamiento post cosecha de frutas y vegetales.

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

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

### **I.2.1. Clasificación**

Debido a la diversidad de sustancias pécticas que existen en la naturaleza, las enzimas pécticas presentan diferentes mecanismos de acción y se las puede clasificar en tres grupos: enzimas desesterificantes, enzimas depolimerizantes y protopectinasas (Fig. I.5) (Jayani, 2005).

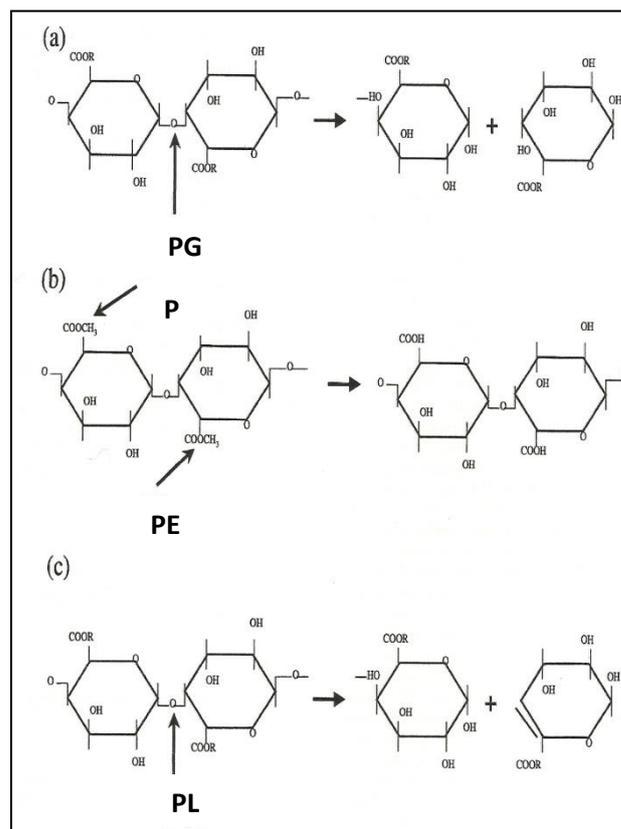
- *Enzimas desesterificantes (pectinesterasa)*:

La enzima pectinesterasa (PE, EC 3.1.1.11), cataliza la desesterificación de los grupos metil-éster de los galacturonanos de las sustancias pécticas liberando ácido péctico y metanol. (Fig. 1.5). PE remueve los grupos metoxilos de la molécula de pectina mediante un ataque nucleofílico de la enzima sobre el éster, que resulta en la formación de un intermedio entre el grupo acilo y la enzima con liberación de metanol. Luego se produce la hidrólisis del intermedio regenerándose la enzima y produciéndose ácido carboxílico.

Las pectinesterasas son producidas por plantas superiores, numerosos hongos y algunas bacterias (Ranveer y col., 2005).

La actividad pectinesterasa puede ser medida por diferentes métodos, usualmente por titulación de los grupos carboxilos producidos a partir de pectina o por métodos colorimétricos, utilizando un indicador de pH.

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



**Figura I.5:** Mecanismo de acción de las diferentes enzimas pécticas. (Gummadi & Panda, 2003).

- *Enzimas depolimerizantes (poligalacturonasas y liasas):*

a) *Poligalacturonasas*:

Las poligalacturonasas (PGasas) son enzimas pécticas que catalizan la ruptura de los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1,4) de las cadenas de APG (Fig. I.5). Se clasifican según su modo de acción en endo-PG (EC 3.2.1.15) y exo-PG (EC 3.2.1.67) (Van Rensburg & Pretorius, 2000).

Las endo-PG producen ruptura al azar de los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4 del ácido péctico, liberando monómeros de AG y oligómeros de dos o tres restos.

Son producidas por una gran variedad de hongos filamentosos, levaduras y bacterias, como así también por plantas superiores (Souza y col., 2003).

Las endo-PG pueden ser medidas por determinación de los grupos reductores liberados, mediante métodos colorimétricos, pero los más utilizados hacen uso de viscosímetros, ya que producen más de un 50 % de caída en la viscosidad. Su actividad disminuye con el grado de polimerización, de manera tal que resulta nula en presencia del dímero.

Las exo-PG hidrolizan las uniones  $\alpha$ -1,4 de los enlaces glicosídicos a partir del extremo no reductor de la cadena de ácido péctico, dando AG como producto mayoritario de la reacción. La depolimerización se interrumpe por la ramificación que ocurre en el sustrato. Son menos frecuentes y se encuentran en plantas superiores, en el tracto intestinal de numerosos insectos, en hongos y en algunas bacterias [Ranveer y col., 2005]. Se ha informado que exo-PG fúngica produce AG como producto final, mientras que la exo-PG bacteriana produce ácido digalacturónico como principal producto final. La acción de exo-PG produce un gran incremento en la formación de grupos reductores.

La actividad exo-PG se mide por determinación de grupos reductores liberados mediante métodos colorimétricos.

*Propiedades fisicoquímicas y biológicas de poligalacturonasas (PGasas)*: las PGasas, aisladas de diferentes fuentes microbianas, difieren marcadamente unas de otras con respecto a sus propiedades físicoquímicas y bioquímicas y su modo de acción.

Independientemente de la fuente microbiana, las PGasas, son activas bajo condiciones de acidez moderada, presentando un pH óptimo en el rango de 3,5 a 5,5, apropiado para el procesamiento de frutas y vegetales (Ortega y col., 2004; Favela-Torres, 2006). Sin embargo, se han informado algunas PGasas alcalinas provenientes de *Bacillus licheniformis* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersci*, con un pH óptimo de 11,0 o PG ácidas como la de *A. kawachi*, la que presentó actividad a pH entre 2,0 y 3,0 (Contreras Esquivel y col., 1999).

La mayoría de las PGasas presentan mayor actividad a temperaturas moderadas, entre 30-50 °C [Maldonado & Strasser de Saad, 1998; Blanco y col., 1999]. Se encontraron algunas PGasas que pueden hidrolizar sustancias pécticas a mayores temperaturas como las producidas por *Bacillus licheniformis* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersci* (Jayani y col., 2005).

En la Tabla I.2 se presentan las propiedades más importantes de algunas PGasas producidas por diferentes microorganismos.

**Tabla I.2:** Propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de algunas PGasas microbianas.

Fuente	PM (kDa)	pI	K <sub>m</sub>	T ópt. (°C)	pH ópt.	T estab. (°C)	pH estab.	Ref.
<i>Aspergillus japonicus</i>	38 (PG I)	5,6	-	30	4 – 5,5	-	-	Ishii, 1976
<i>Aspergillus niger</i>	65 (PG II)	3,3	-	30	4 – 5,5	-	-	Jayani, 2005
<i>A. niger</i>	61 (PG I)	-	0,12	43	3,8–4,3	50	-	Hara y col., 1982
<i>A. niger</i>	38 (PG II)	-	0,72	45	3 – 4,6	51	-	Nagai y col., 2000
<i>Aspergillus awamori</i>	46	-	-	55	4,5	-	-	Ranveer y col. 2005
<i>Penicillium frequentans</i>	41	6,1	-	40	5	50	4 – 6	Jayani, 2005
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	50	5 - 5,8	-	-	Zheng & Shetty, 2000
<i>Lentinus edodes</i>	38	-	-	69	11	-	7 – 11	Jayani, 2005
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-	-	50	5,0	-	-	Jayani, 2005
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	38	-	-	69	11	-	7 – 11	Jayani, 2005
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	42	4,8	0,8	50	4	-	-	Jayani, 2005
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	41,5	4,8	0,5	50	3,5	-	-	Jayani, 2005
<i>S. cerevisiae</i> UCLMS-39	43	5,4	-	50	4,2	-	-	Fernández González, 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	50	3,5	-	-	Jayani, 2005
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39	-	4,7	45	5,5	50	4,5–6	Jayani, 2005

**b) Liasas:**

Las liasas (o transeliminadas) producen una ruptura no hidrolítica de las sustancias pécticas, mediante un mecanismo de transeliminación. Rompen los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4 de la molécula de ácido péctico por un mecanismo de  $\beta$ -eliminación, descubierto por Albersheim y col. (1960), formando un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 por cada enlace glicosídico roto (Fig. 1.5). Los mejores sustratos para esta enzima son las pectinas altamente esterificadas.

Las liasas se pueden clasificar en función del tipo de sustrato que ellas degradan y según su modo de acción en: pectatoliasas (PAL), las que actúan sobre sustancias pécticas de bajo grado de metoxilación (endo-PAL, EC 4.2.2.2 y exo-PAL, EC 4.2.2.9) y pectinliasas (PL) (EC 4.2.2.10) que actúan sobre pectina altamente metoxilada. Las liasas son producidas principalmente por bacterias y hongos filamentosos (Jayani y col., 2005).

El método más conveniente para medir la actividad de las PL o PAL, se basa en el incremento de la absorbancia a 235 nm producido por la formación de dobles enlaces.

PL actúa sobre pectina altamente esterificada, sin la acción previa de PE, por lo que su utilización en la industria de jugos puede resultar ventajosa. Aumenta la estabilidad de los jugos de frutas porque se reducen los efectos floculantes que aparecen cuando, por acción de PG y PE, se generan derivados de pectina desesterificados los que se ponen en contacto con el  $\text{Ca}^{+2}$  proveniente de la fruta (Alaña y col., 1989; Delgado y col., 1992).

*Propiedades físicoquímicas y químicas:* PL en general necesitan iones  $\text{Ca}^{+2}$  para tener actividad y por ello los agentes quelantes como el EDTA actúan como inhibidores. La mayoría de las liasas tienen pesos moleculares entre 30 y 40 kDa, con un pI de 7,0 a 11,0. Tienen un pH óptimo de actividad en la región alcalina (7,5 - 10) y temperaturas óptimas de 40-50 °C. Una exo-PL termoestable de *Bacillus* sp., presentó máxima actividad a pH 11,0 y 69 °C y fue dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ . Otras liasas termoestables fueron producidas por *Bacillus* sp. TS 47 y *Fusarium moniliforme* (Jayani y col., 2005).

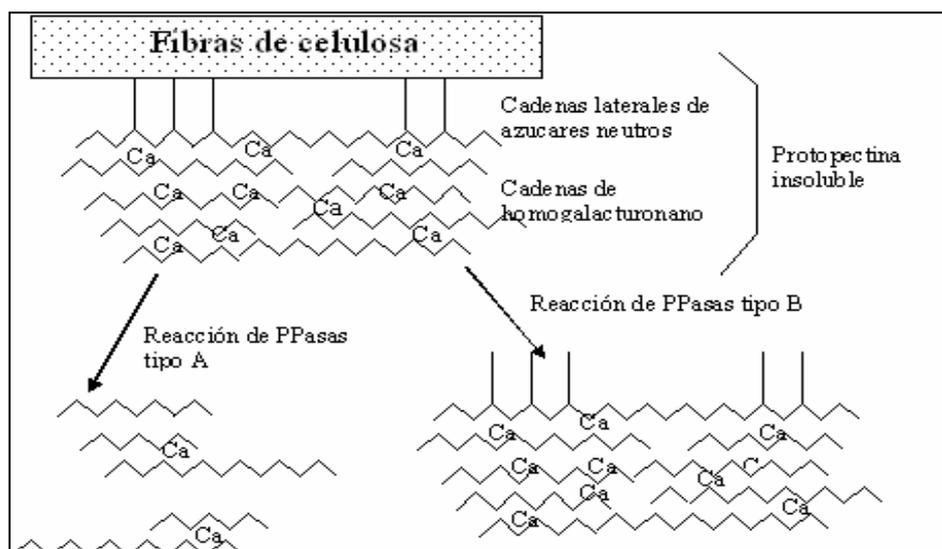
*Protopectinasas (PPasas):*

Las enzimas que catalizan la solubilización de protopectina, liberando pectina soluble de los tejidos vegetales, se conocen como enzimas solubilizadoras de pectina o protopectinasas (PPasas) (Sakai & Okashima, 1978). Estas PPasas son un grupo heterogéneo de enzimas con diferentes actividades catalíticas. Varias PPasas han sido aisladas y caracterizadas y han sido clasificadas en dos tipos dependiendo de sus mecanismos de acción: PPasas tipo A y tipo B. Las PPasas tipo A son aquellas que reaccionan sobre una región específica del homogalacturonano (región lisa) de la protopectina, liberando pectina de alto peso molecular.

Las PPasas tipo B son las que actúan sobre las cadenas de azúcares neutros que conectan la región del ramnogalacturonano (región ramificada) con los demás constituyentes de la pared celular, liberándose pectina de mayor peso molecular que en el caso particular de las PPasas tipo A (Nakamura y col., 1995; Zapata Zapata, 2008).

La actividad PPasa se determina midiendo la cantidad de sustancias pécticas liberadas a partir de protopectina. La pectina solubilizada es cuantificada y expresada como equivalentes de AG liberado (Cavalitto y col., 1997).

En la Figura I.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 I.6:** Estructura esquemática de protopectina. (Nakamura y col., 1995).

La existencia de este grupo de enzimas se pone en duda ya que se caracterizó la actividad enzimática de varias de ellas y se vio que su mecanismo de acción es prácticamente igual al de las enzimas descritas anteriormente para sustratos solubles. Parecería más apropiado considerar a la actividad PPasa como una característica particular de algunas enzimas pécticas que tienen una afinidad particularmente alta por sustratos insolubles (Cavalitto y col., 1999).

La primer PPasa reportada se encontró en el sobrenadante de un cultivo de *Trichosporum penicillatm*, cepa SON-3 y se denominó PPasa SE. Esta cepa fue reclasificada como *Geotrichum klebahnii* (ATCC 42397). La PPasa SE fue aislada, parcialmente caracterizada e identificada como una endo-poligalacturonasa (endo-PG, EC 3.2.1.15). Esta enzima resultó ser eficiente en la extracción enzimática de pectina de cáscaras de citrus y en la maceración de tejidos de papa (Cavalitto y col., 2000).

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

**Tabla I.3:** Algunos microorganismos productores de enzimas pécticas.

Microorganismos	PE	PG	PL	PAL
<i>Aeromonas</i> sp				+
<i>Bacillus</i> sp				+
<i>Erwinia aroideae</i>		+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp	+			+
<i>Xantomonas campestris</i>	+			+
<i>A. niger</i>	+	+	+	
<i>Kluyveromyces fragilis</i>		+		
<i>Penicillium</i> sp.	+	+	+	
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+		+

PE: pectinesterasa; PG: poligalacturonasa; PL: pectinliasa, PAL: pectatoliasa. (Jayani y col., 2005).

### **I.3. PRINCIPALES APLICACIONES DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS**

Las pectinasas microbianas son importantes desde el punto de vista industrial principalmente por su uso en el procesamiento de frutas y vegetales (elaboración de vinos, extracción y clarificación de jugos de frutas, extracción de aceites vegetales, maceración de vegetales, etc.) (Alkorta y col., 1998; Hoondal y col., 2002; Kashyap y col., 2000; Ranveer y col., 2005; Lee y col., 2006; Nighojkar y col., 2006). Estas enzimas han sido utilizadas desde hace más de 60 años y sus aplicaciones continuarán expandiéndose ya que constituyen una herramienta indispensable en esta rama de la tecnología.

La mayoría de las enzimas pécticas provenientes de hongos o levaduras, son activas bajo condiciones de acidez moderada (3,5 a 5,5), apropiado para el procesamiento de frutas y vegetales, considerando la naturaleza ácida de los mismos (Ortega y col., 2004; Favela-Torres, 2006) y a temperaturas relativamente bajas (30 – 50 °C), lo que permite retener el color y el sabor de los alimentos (Maldonado & Strasser de Saad, 1998; Blanco y col., 1999).

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

#### ***I.3.1. Maceración:***

Algunas pectinasas (particularmente las PPasas) tienen la capacidad de liberar sustancias pécticas cementantes de la pared celular de las plantas, produciendo la maceración de los tejidos vegetales. En el proceso de maceración, la pectina insoluble presente en la laminilla media es degradada, con la consiguiente liberación de células individuales y agregados celulares. Para tal propósito, únicamente el material cementante intercelular (laminilla media) y parte de la pared celular primaria de las plantas debe ser degradado, sin dañar la pared celular secundaria, a los efectos de evitar la lisis celular (Ishii & Yokotsuka, 1971). Por esta razón, las celulasas son indeseables en esta mezcla enzimática (Nakamura y col., 1995). Este método presenta ventajas sobre la disgregación mecánica ya que conserva intactos el flavor, los pigmentos y los componentes celulares, compuestos con propiedades sumamente interesantes en ciertos productos alimenticios.

El proceso de maceración mediante enzimas pécticas es empleada en la industria alimenticia para la obtención de néctares de frutas como peras, duraznos, damascos, frutillas; y de purés de vegetales como papa, zanahoria, ají rojo y otros, con alto contenido de sólidos, pigmentos y vitaminas, que se emplean en la alimentación de bebés y adultos mayores (Call y col., 1985; Pilnik & Voragen, 1991). Por el contrario, los procesos de maceración química o mecánica provocan un alto rompimiento celular, lo que implica que las propiedades nutritivas de los tejidos vegetales se vean afectadas negativamente.

La maceración enzimática depende de la concentración de enzima, del pH, tiempo de reacción y de la velocidad de agitación (Nakamura y col., 1995). La velocidad de agitación debe ser tal de manera de generar el suficiente esfuerzo de corte como para minimizar las fuerzas de atracción entre las células y así promover su separación, pero a su vez no debe ocasionar el rompimiento de ellas de tal forma que se deteriore la calidad del producto obtenido (Biekman, 1992).

Por otra parte, existen preparados enzimáticos capaces de degradar completamente el material vegetal, proceso denominado desintegración. Están formados por una mezcla de celulasas, hemicelulasas y pectinasas. Son utilizados mayoritariamente para elaborar purés (ej. tomate) y para mejorar el rendimiento durante la extracción de jugos de frutas (Rombouts & Pilnik, 1980).

### ***1.3.2. Extracción y clarificación de jugos de frutas:***

Las pectinas aumentan la turbidez y la viscosidad de los jugos de frutas, dificultando los procesos de extracción, filtración y clarificación. Los jugos de frutas son generalmente extraídos bajo presión, pero esto no es fácil en el caso de frutas blandas como frutillas, manzanas, frambuesas, arándanos, etc. Las pectinasas se adicionan a la masa prensada de frutas para degradar a la pectina que causa la gelificación de la pulpa, facilitando así el proceso de filtración y asegurando altos rendimientos de jugo (De Vos & Pilnik., 1973; Kashyarp y col., 2000, Tari y col., 2007).

Los jugos que habitualmente se someten al proceso de clarificación son aquellos cuyas características organolépticas y su aceptación por el público mejoran por el hecho de ser transparentes como por ejemplo los jugos de manzana, pera y uva. Estos jugos deben ser tratados enzimáticamente a fin de degradar las pectinas y los polisacáridos. Se utilizan pectinasas que hidrolizan las pectinas y provocan la precipitación de complejos proteína-pectina. Mientras que en los jugos de naranja y pomelo, debe lograrse una estabilización de las suspensiones coloidales mediante el uso de enzimas pécticas, ya que el consumidor prefiere un jugo turbio (Sin, 2006).

### ***1.3.3. Extracción de aceites:***

Los aceites de girasol, coco, palma, oliva, etc., se extraen normalmente con solventes orgánicos. El más utilizado es el hexano, el cual es un potencial cancerígeno. Las pectinasas se utilizan para degradar las paredes celulares y extraer el aceite vegetal en un proceso acuoso por liquefacción. Para la extracción del aceite de oliva, las enzimas son adicionadas durante la molienda de las aceitunas, así el aceite es liberado y se separa fácilmente. El tratamiento enzimático incrementa los costos, pero produce un mayor rendimiento en la extracción del aceite (Hoondal, 2002; Kashyap y col., 2000; Ortiz y col. 2017).

### ***1.3.4. Extracción enzimática de pectina***

La otra alternativa biológica es la enzimática. En este proceso se utilizan enzimas purificadas de origen microbiano o extractos enzimáticos crudos provenientes del cultivo de levaduras, bacterias u hongos filamentosos (pero sin la presencia de ellos), que tienen la capacidad de solubilizar pectina a partir de la protopectina (Donaghy y Mckay, 1994; Sakamoto y col, 1994; Matora y col., 1995). Este es un proceso de catálisis heterogénea, donde una enzima soluble actúa sobre un sustrato insoluble, generalmente particulado. Los rendimientos de pectina extraída por vía enzimática son variables y dependen del sustrato y tipo de enzima empleados.

Se han realizado diversos estudios de extracción de pectina por vía enzimática. Contreras-Esquivel y col., (2006) extrajeron pectina de pomaza de limón utilizando una endo-PGasa de *Aspergillus niger* y obtuvieron un rendimiento de 17,6% (g pectina/100 g de pomaza seca), siendo las condiciones de extracción 37°C, pH 4,5, tiempo 12 h y relación enzima sustrato de 1,6 µg proteína/g sustrato. Otro estudio utilizó Protopectinasa-

SE, enzima producida por un hongo levaduriforme (*Geotrichum klebahnii*) y albedo de limón y protopectina como sustratos. Bajo condiciones óptimas de reacción se obtuvieron rendimientos de 28 y 37% (g de pectina/100 g de tejido base seca) a partir de albedo y protopectina, respectivamente. La pectina extraída en ambos casos presentaba un contenido de grupos urónicos del 60% y un grado de esterificación de 78% (Zapata Zapata y col., 2009). El rendimiento de pectina extraída de limón reportado por Nagai y col., (2000) fue del 29 % empleando PPasa-AS de *A. awamori* a pH 2,0 luego de incubar 16 h a 37°C.

Los resultados obtenidos para la extracción enzimática fueron similares a aquellos reportados con anterioridad por Donaghy y McKay (1994), quienes empleando extractos crudos de endo-PG de *Kluveromyces fragilis* lograron solubilizar pectina de cáscara de limón con un rendimiento de 18% luego de 24 h a 25°C. Sakamoto y col., (1994) extrajeron pectina de limón usando rhamnogalacturonasa de *Trametes sanguinea* y reportaron un rendimiento mucho menor del 10,9%. Contreras-Esquivel y col., (1999), utilizando extractos crudos de endo-PG de *Aspergillus kawachii* extrajeron pectina de similar sustrato con rendimientos de 17,4 %, siendo las condiciones de extracción de 50°C, pH 3,5 y tiempo 2 h. Correa y col., (1999) obtuvieron pectinas de bajo metoxilo mediante extracción enzimática y al comparar con geles de pectina obtenidos por vía química, encontraron que los geles obtenidos por vía enzimática eran más resistentes.

### ***1.3.5. Extracción de almidón***

El almidón es un polímero que sirve como almacén de nutrientes en las plantas. No sólo es una importante reserva para las plantas sino también en los seres humanos, con una alta importancia energética, proporcionando gran parte de la energía diaria necesaria a través del consumo de los alimentos.

El almidón es uno de los principales componentes de muchas raíces entre ellas de la mandioca, el mismo que se obtiene separando los gránulos de almidón del resto de las materias contenidas en la raíz. Los gránulos de almidón se encuentran en el interior de las células conjuntamente con la proteína, las grasas y los carbohidratos solubles entre otros, los mismos pueden ser aislados por un proceso de extracción y posterior purificación.

El proceso tradicional de extracción del almidón de yuca consiste fundamentalmente en romper las paredes celulares para liberar los gránulos de almidón mediante un rallado, seguido de la adición de agua y filtración, lo que permite la separación de las partículas de almidón suspendidas en el medio líquido de aquellas que son relativamente más grandes, como los componentes de la fibra, posteriormente se elimina el agua y se lava el material sedimentado para eliminar las últimas fracciones diferentes del almidón para finalmente someter al almidón purificado a un secado (Alarcón y Dufour, 1998).

Hasta el momento se encontraron pocos reportes sobre el uso de enzimas para la liberación de almidón por vía enzimática (Dzogbefia y col., 2008; Sit y col., 2015). A través del uso de enzimas pécticas se puede lograr la degradación completa de la pared celular, dando lugar a la lisis y la consiguiente liberación del almidón (Berlanga-Malacara y col. 2005).

## I.4. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PÉCTICAS

### I.4.1. Selección de la cepa productora

El campo de aplicación de las enzimas pécticas se encuentra expandiéndose, lo que demanda seguir descubriendo nuevas cepas productoras de pectinasas con propiedades diferentes de las existentes en el mercado (Nighojkar, 2006; Tari y col., 2007).

Una seria restricción en la búsqueda de nuevas cepas productoras de enzimas pécticas es el hecho de que pocos microorganismos tienen la aprobación oficial para su uso en la industria alimenticia. Los organismos adecuados para ser usados en la producción de enzimas deben tener un cierto número de propiedades, entre las que se incluye la facilidad y rapidez de crecimiento en fermentadores grandes con nutrientes sencillos y relativamente baratos. Además, se debe obtener un alto rendimiento de la enzima, de forma que sea fácil aislarla, purificarla y concentrarla, sin que se produzca la formación concomitante de metabolitos tóxicos. El organismo debe tener características fisiológicas estables y ser fácilmente aceptado por las autoridades encargadas de controlar los alimentos y los fármacos.

Aunque muchos estudios se han hecho con enzimas pécticas de diferentes fuentes, las enzimas pécticas comerciales, utilizadas en las industrias alimenticias, se producen a partir de hongos principalmente del género *Aspergillus*. Los hongos son buenos productores de enzimas pécticas, cuyo pH óptimo se encuentra cerca del pH de muchas frutas el cual está entre 3,0 y 5,5 (Mukherjee & Majumdar, 1971; Soares y col., 1999; Couri y col., 2000; Zheng & Shetty, 2000; Ortega y col., 2004; Favela-Torres, 2006). Además estos microorganismos son capaces de excretar al medio de cultivo casi el 90 % de las enzimas que producen, lo cual facilita el proceso de purificación (downstream processing) (Souza y col., 2003).

El hongo filamentoso *A. niger* tiene la ventaja de poseer el status GRAS (generalmente aceptado como seguro), que permite el uso de sus metabolitos, incluyendo sus enzimas extracelulares en las industrias de alimentos, siendo por lo tanto muy utilizado en diversos procesos fermentativos para la producción de enzimas pécticas (Taragano & Pilosof, 1999; Tari y col., 2007). Las preparaciones comerciales de este hongo contienen una mezcla compleja de diferentes enzimas con actividad pectinolítica, incluyendo PG, PL y PE y otras enzimas que degradan otros polisacáridos de la pared celular como celulasas y xilanasas (Nagai y col., 2000; Rogerson, y col., 2000; Singh & Appu Rao, 2002; Hasunuma y col., 2003). Esta variedad de enzimas les permite crecer sobre materiales pécticos.

Las levaduras en general son capaces de producir un único tipo de enzimas pécticas las que suelen ser endo-PG (no presentan actividad PE, capaz de liberar metanol) (Blanco y col., 1999). Las levaduras son organismos unicelulares por lo que su crecimiento es relativamente simple y además también son microorganismos GRAS. Estas enzimas pueden ser producidas a bajo costo, como subproductos durante la producción de proteína unicelular (da Silva, 2005). Los primeros autores en describir la producción de pectinasas por *Saccharomyces fragilis* fueron Luh and Phaff (1951). Desde 1980 se han descrito varias especies de levaduras capaces de producir enzimas pécticas las que pertenecen a los géneros *Candida*, *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Zygosaccharomyces*, diversas especies del género *Saccharomyces* incluyendo *S.*

*cerevisiae* y *S. pastorianus*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. fragilis*, *K. lactis*, *Geotrichum lactis* (Blanco y col., 1999).

#### ***I.4.2. Factores que influyen en la producción de enzimas pécticas***

Para la producción de enzimas pécticas es importante, además de seleccionar la cepa productora, estudiar los factores que influyen en su producción como la composición del medio de cultivo, el pH del medio, la temperatura de incubación, el tiempo de fermentación, el volumen del inóculo y el oxígeno disuelto. Todos estos factores son críticos en la producción de enzimas pécticas y varían de acuerdo al tipo de cepa utilizada, por lo que estos parámetros deben ser estudiados y especificados para cada cepa de interés (Tari y col., 2007). Ellos pueden afectar tanto el crecimiento del microorganismo como la producción de las enzimas y pueden influir además en la estabilidad de las mismas (Malvessi & da Silveira, 2004).

La síntesis de enzimas pécticas está muy influenciada por los componentes del medio de crecimiento, especialmente por la fuente de carbono [Díaz y col., 2005]. Estudios relacionados a los aspectos regulatorios de la producción de pectinasas mediante hongos filamentosos, informaron que las enzimas fueron inducidas por pectina o alguno de sus derivados y que la glucosa reprimió la síntesis de las mismas (Kilara, 1982; Maldonado y col., 1989; Solís Pereira y col., 1993; Blanco y col., 1997; Zheng & Shetty, 2000). En general, el proceso de represión ocurre en presencia de altas concentraciones de glucosa u otros azúcares rápidamente metabolizables, que promueven una alta velocidad de crecimiento microbiano.

En varias especies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. tubigiensis*, *A. flavus*, *A. aculeatus*, etc.), la síntesis de las enzimas pectolíticas como PG, PE, PL o PAL, fue inducida por pectina, APG y AG y reprimida por glucosa (De Vries y col., 1982). Maldonado y col. (1989) demostraron que la síntesis de PE y PG mediante una cepa de *A. niger* fue inducida por pectina, AG y APG, siendo la pectina el mejor inductor. Esta cepa también produjo PE y PG en un medio que contenía glucosa como única FCE, lo que indicó que hubo un cierto nivel de enzimas constitutivas. Los efectos de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de exo y endo-pectinasas por *A. niger* CH4, tanto en medio sólido como líquido, fue informado por Solís Pereira y col. (1993), quienes concluyeron que altas concentraciones de azúcar estimularon la producción de pectinasas en cultivo en medio sólido, mientras que en medio líquido esta producción fue inhibida probablemente por represión catabólica. Alaña y col. (1989) demostraron, al estudiar la producción de PL por *P. italicum* en un medio conteniendo distintas concentraciones de pectina, que la misma era una enzima inducible y no detectaron actividad PL en ausencia de dicho sustrato.

Por el contrario, en la mayoría de las levaduras, la producción de pectinasas es una capacidad constitutiva porque no se requieren pectina, APG o AG para inducir la síntesis de dichas enzimas (Blanco y col., 1999). Por ejemplo *Kluyveromyces marxianus*, una levadura aislada de la fermentación espontánea de la pulpa del cacao, produjo casi exclusivamente endo-PG, constitutivamente, el agregado de sustancias pécticas no tuvo efecto sobre el crecimiento o la producción de PG (Schwan y col., 1994). Sin embargo, la capacidad pectinolítica de unas pocas especies tales como *Cryptococcus albidus*, *Geotrichum lactis* y *Kluyveromyces fragilis* han sido descritas como inducibles. A su vez, la PG de *Saccharomyces fragilis* fue considerada

parcialmente constitutiva porque la actividad fue mayor al crecer en un medio con glucosa y pectina que cuando se utilizó sólo glucosa (Blanco y col., 1997).

La expresión de ciertos genes que codifican pectinasas u otras enzimas hidrolíticas está controlada por el pH del medio de cultivo. De este modo, regulando el pH del medio de cultivo es posible modificar la composición del pool enzimático liberado al medio, como fue reportado para el caso de las diferentes pectinasas producidas por *A. foetidus* (Cavalitto y col., 1996).

Los organismos productores de enzimas pécticas son eminentemente aerobios, por lo que la provisión de oxígeno, en condiciones asépticas, durante la fermentación es fundamental (Channe & Shewal, 1995; Cavalito y col., 1996).

#### ***1.4.3. Residuos industriales para la formulación del medio de cultivo***

Teniendo en cuenta que el costo del medio de fermentación es uno de los factores determinantes en la producción de enzimas pécticas, es importante formular medios de cultivos de bajo costo y que al mismo tiempo provean los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento adecuado del microorganismo y la producción de las enzimas extracelulares (Maldonado & Navarro, 1995; Laxman y col., 2005). El diseño de medios de cultivos de bajo costo ha sido de interés para la mayoría de los investigadores, especialmente cuando falta información sobre los requerimientos nutricionales del microorganismo en estudio (Tari y col., 2007).

En muchos casos, la biotecnología encuentra en los residuos agroindustriales materias primas de bajo costo que hacen factibles, desde el punto de vista económico, procesos que de otra manera no lo serían. Existen residuos provenientes del procesamiento de alimentos vegetales, tales como pomaza de limón, naranja y manzana, que contienen, además de celulosa y hemicelulosa, apreciables cantidades de pectina y otros azúcares (glucosa, ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, etc.) (Bonnin y col., 2001). Estos residuos pueden ser utilizados como fuente de sustancias pécticas y así disminuir los costos del medio de cultivo (Zheng & Shetty, 2000; Hellín y col., 2001; Costa, 2007).

Couri y col. (2000), utilizaron cáscaras de mango como materia prima para el crecimiento en medio sólido de *A. niger* y la producción de PG. Numerosas investigaciones se realizaron utilizando residuos de las industrias de frutas cítricas en la producción de enzimas pécticas. Hara y col. (1982) emplearon cáscara deshidratada de mandarina en procesos de fermentación en medio líquido por *A. niger* y encontraron que la efectividad de la cáscara de mandarina para la producción de PG fue similar a la obtenida en medios suplementados con pectina. Hellín y col. (2001) utilizaron cáscaras de limón como única fuente de carbono para el crecimiento y producción de PG en cultivos líquidos de *Rhizopus nigricans*. En la Tabla I.4 se muestra la composición química de residuos vegetales potencialmente utilizables como fuente de sustancias pécticas en procesos de producción de pectinasas.

**Tabla I.4:** Composición química de diversos materiales vegetales

Descripción	Pomaza de	Pomaza de	Pulpa de	Receptáculo de
-------------	-----------	-----------	----------	----------------

	limón	mango	remolacha	girasol
<b>Azúcares (mg/g)</b>				
Ramnosa	6	5	7	5
Fucosa	3	2	1	0,5
Arabinosa	74	60	159	16
Xilosa	25	17	13	49
Manosa	22	27	12	28
Galactosa	50	44	44	11
Glucosa	180	165	170	274
A. galacturónico	296	216	189	111
<b>Proteínas:</b>				
N × 6,25 (%)	6,7	4,2	7,1	6,7
Humedad (%)	8,2	8,3	6,6	7,1
<b>Relación C/N</b>	24	32	21	15

(Contreras Esquivel, 2003).

#### ***1.4.4. Fermentación, recuperación y purificación de enzimas pécticas***

La producción de una enzima por los métodos de la biotecnología clásica incluye dos etapas secuenciales: la de fermentación, en la que se multiplica el microorganismo productor de la enzima y luego la de recuperación y purificación, en la que se aísla la enzima y se la lleva al grado de pureza adecuado para su uso.

Las pectinasas pueden ser producidas ya sea en fermentación en sistema sumergido o en sustrato sólido. El primero permite un mayor control de las condiciones de crecimiento que la fermentación en medio sólido (Maldonado y col., 1996; Nair & Panda, 1997; Costa, 2007).

El proceso de producción se realiza en aerobiosis, a una temperatura y pH que dependen del microorganismo seleccionado y de la enzima que se desea obtener (Solís Pereira y col., 1993; Cavalitto y col., 1996; Costa y col., 2007).

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

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

pécticas producidas por hongos filamentosos, el filtrado contiene una mezcla de enzimas pectinolíticas, otros productos metabólicos y restos de nutrientes no asimilados. Para uso como clarificante de jugos no se requiere la separación de cada una de las enzimas.

En algunas aplicaciones, como por ejemplo durante el procesamiento de ciertos alimentos, se requiere que la enzima de interés este en estado puro, a los efectos de garantizar la calidad del producto final y evitar los cambios de color y aroma debido a la presencia de enzimas contaminantes en el preparado o cuando se necesita garantizar la ausencia de otros componentes tóxicos. Por ejemplo, algunos hongos pueden producir, en determinadas condiciones de crecimiento, micotoxinas, que son muy venenosas o carcinogénicas, como por ejemplo la aflatoxina producida por el hongo *A. flavus*.

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

## **I.5. SISTEMAS DE CULTIVOS TIPO BATCH Y BATCH ALIMENTADO**

La fermentación en medio líquido para la producción de enzimas, se puede llevar a cabo en sistemas tipo *batch*, *batch alimentado (BA)* o *cultivo continuo*. El *cultivo continuo* no es muy recurrido para la producción ya que gran número de generaciones que transcurren en el mismo hace que sea proclive a la contaminación y a la aparición de mutaciones espontáneas con el consiguiente cambio en la cepa de producción. Los procesos *batch* son simples y robustos pero el hecho de que los microorganismos crezcan a velocidades específicas máximas ( $\mu_m$ ) durante buena parte del cultivo, hace que el consumo de oxígeno sea alto cuando la concentración celular deseada es alta, tal como ocurre en los procesos en los cuales el producto a obtener está asociado al crecimiento celular. La transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida representa generalmente un reto en los cultivos microbianos. Además, la única forma de obtener una alta concentración de biomasa es a partir de un medio con una alta concentración de sustrato, hecho que puede generar problemas de inhibición y/o alteraciones en el medio de cultivo durante el proceso de esterilización. Además algunos microorganismos presentan metabolismo de sobreflujo en el cual, cuando crece a velocidades específicas elevadas, posee un metabolismo respirofermentativo en el que genera producto (etanol) a pesar de poseer suficiente cantidad de oxígeno. Las altas velocidades de crecimiento inducen el efecto Crabtree. Para subsanar estos inconvenientes se elige generalmente el sistema de cultivo en *BA*, ya que la alimentación restricta de glucosa permite que las células crezcan a una alta densidad con metabolismo respiratorio manteniendo una baja velocidad específica de crecimiento (Ertola y col., 1994; Gummati & Kumar, 2008).

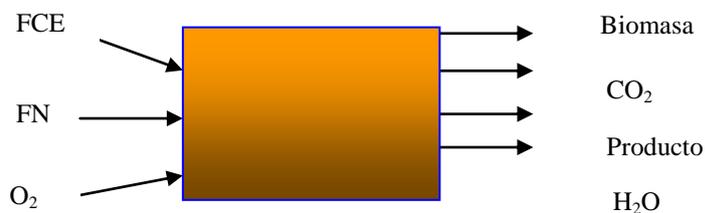
### ***I.5.1. Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano***

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

El medio de cultivo debe contener básicamente, una fuente de carbono y energía (FCE), una fuente de nitrógeno (FN), sales ( $\text{PO}_4^-$ ,  $\text{SO}_4^-$ , etc.), microelementos (Cu, Zn, Mn, Mo, etc.), pueden haber también factores de crecimiento (vitaminas). Si pensamos al cultivo como si fuese una reacción química, estos serán los reactivos y las células,  $\text{CO}_2$ , algún otro compuesto que se forme durante el proceso serán los productos de la reacción.

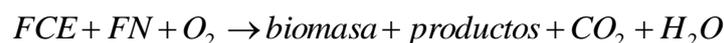
Teniendo en cuenta únicamente aquellos compuestos del medio de cultivo que se encuentran en mayor cantidad y se consumen en forma significativa, el crecimiento aerobio de las células puede describirse en base al denominado modelo de “caja negra”. En este modelo se considera que la célula es un compartimento abierto que recibe un flujo de FCE, uno de FN y uno de  $\text{O}_2$  y del cual salen flujos de biomasa,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , algún producto (si lo hubiera) y energía (como calor). En este modelo no se hace ninguna suposición sobre el metabolismo celular (Ertola y col., 1994; Cavalitto, 2003).

En la Figura I.9 se observa un esquema del modelo utilizado.



**Figura I.7:** Esquema del crecimiento celular según el modelo de caja negra.

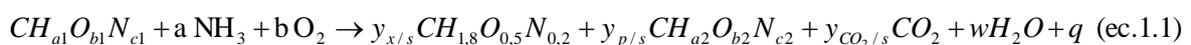
En base a este modelo se puede plantear la ecuación de crecimiento microbiano de la siguiente manera:



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

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

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



Los correspondientes coeficientes estequiométricos son:

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

b: moles totales de O<sub>2</sub> consumido/c-mol de FCE.

y<sub>x/s</sub>: c-mol de biomasa /c-mol de FCE.

y<sub>p/s</sub>: c-mol de producto/c-mol de FCE.

y<sub>co2/s</sub>: moles totales de CO<sub>2</sub> producidos/c-mol de FCE.

Para calcular los coeficientes estequiométricos de la ecuación de crecimiento se deben medir todas las variables del cultivo: biomasa, FCE, velocidad de consumo de O<sub>2</sub> y de producción de CO<sub>2</sub> y concentración de producto (si lo hubiera).

Los coeficientes estequiométricos y<sub>x/s</sub> e y<sub>p/s</sub> corresponden al valor del rendimiento de biomasa y producto (expresado en c-mol), respectivamente. El coeficiente “a” puede ser calculado de un balance de nitrógeno. La cantidad total de O<sub>2</sub> consumido y CO<sub>2</sub> producido durante el cultivo se calculan como la integral de las correspondientes velocidades en función del tiempo:

$$O_2 \text{ total consumido} = \int_{t_0}^{t_f} r_{O_2} \cdot dt \quad (\text{ec. I.2})$$

$$CO_2 \text{ total producido} = \int_{t_0}^{t_f} r_{CO_2} \cdot dt \quad (\text{ec. I.3})$$

Midiendo la composición de los gases a la salida del reactor y mediante balances de materia en fase gaseosa y líquida se pueden obtener las ecuaciones que permiten medir las velocidades de consumo de O<sub>2</sub> (r<sub>O2</sub>) y producción de CO<sub>2</sub> (r<sub>CO2</sub>) en el transcurso del cultivo (Anexo).

*Balance de carbono y nitrógeno:*

El crecimiento de las células obedece a la ley de conservación de la materia. Todos los átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y otros elementos consumidos durante el crecimiento se incorporan a las nuevas células o se eliminan como productos.

Aplicando *balance de carbono* a la ec. 1.1, se obtiene:

$$1 = y_{x/s} + y_{p/s} + y_{CO_2/s} \quad (\text{ec.1.4})$$

Aplicando *balance de nitrógeno* a la ec. 1.1, se obtiene:

$$a = y_{x/s} \cdot 0,2 + y_{p/s} \cdot c_2 \quad (\text{ec.1.5})$$

Si la FN fuese urea (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO en lugar de amonio los respectivos balances de carbono y nitrógeno serían:

$$\text{Balance de carbono: } 1 + a = y_{x/s} + y_{p/s} + y_{CO_2/s} \quad (\text{ec.1.6})$$

$$\text{Balance de nitrógeno: } 2a = 0,2 \cdot y_{x/s} + c_2 \cdot y_{p/s} \quad (\text{ec. I.7})$$

*Balance de electrones:*

De un balance similar al anterior pero para los electrones surge que, en un cultivo aerobio, todos los electrones disponibles de la FCE deben repartirse entre el O<sub>2</sub>, la biomasa y los productos (si los hubiera).

Para cuantificar la cantidad de electrones disponibles de una sustancia se define un parámetro llamado grado de reducción (γ). Este parámetro es igual a la cantidad de electrones que una sustancia puede entregar durante su combustión hasta un nivel de referencia dado, usualmente CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y NH<sub>3</sub>, los que se toman

como estado de referencia y como tal tienen un valor de  $\gamma$  igual a 0 ya que no tienen electrones disponibles. Mediante el uso de balances elementales se demuestra formalmente que para un c-mol de cualquier sustancia genérica  $\text{CH}_a\text{O}_b\text{N}_c$ , el valor de  $\gamma$  (para la referencia antes mencionada) viene dado por:

$$\gamma^{\text{NH}_3} = 4 \cdot n = 4 + a - 2 \cdot b - 3 \cdot c \quad (\text{ec. I.8})$$

Aplicando el balance de electrones a la ecuación de crecimiento microbiano (ec.I.1) y utilizando amoníaco como fuente de nitrógeno se obtiene:

$$\gamma_s + \gamma_{\text{NH}_3} - 4 \cdot b = \gamma_x \cdot y_{x/s} + \gamma_p \cdot y_{p/x}$$

Siendo:

$\gamma_s$  = grado de reducción del sustrato

$\gamma_x$  = grado de reducción de la biomasa

$\gamma_p$  = grado de reducción del producto

Si  $\gamma^{\text{NH}_3} = 0$  (porque lo tomamos como nivel de referencia), reordenando y dividiendo por  $\gamma_s$  se obtiene:

$$y_{x/s} \cdot \frac{\gamma_x}{\gamma_s} + y_{p/s} \cdot \frac{\gamma_p}{\gamma_s} + \frac{4 \cdot b}{\gamma_s} = 1 \quad (\text{ec. I.9})$$

En cuanto al balance de grado de reducción, no se ve alterado si se utiliza como nivel de referencia para el nitrógeno a la urea.

Mediante las ecuaciones de *balance de carbono* y *grado de reducción* se puede comprobar la consistencia de los datos experimentales y verificar si las determinaciones han sido correctas. En un cultivo microbiano, tanto el balance de carbono como el de grado de reducción tienen que dar 1 (o  $1 + a$ , para el balance de carbono con urea como fuente de nitrógeno).

### 1.5.2. Balances de materia en un biorreactor

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

$$\left( \begin{array}{c} \text{velocidad} \\ \text{acumulación} \end{array} \right) = \left( \begin{array}{c} \text{Veloc.} \\ \text{Entrada} \end{array} \right) - \left( \begin{array}{c} \text{Veloc.} \\ \text{Salida} \end{array} \right) + \left( \begin{array}{c} \text{Veloc.} \\ \text{Form.} \end{array} \right) - \left( \begin{array}{c} \text{Veloc.} \\ \text{Cons.} \end{array} \right)$$

$$\frac{d(\text{VC}_i)}{dt} = F_1 \cdot C_{i1} - F_2 \cdot C_i + V \cdot r_{fi} - V \cdot r_{ci} \quad (\text{ec.1.10})$$

Siendo:

V: volumen del cultivo.

$F_1$ : caudal de alimentación.

$F_2$ : caudal de salida.

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

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

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

### **Cultivo batch:**

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

Aplicando el balance a la biomasa, la ec. I.10 se reduce a:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (\text{ec. I.11})$$

Siendo:

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

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento (tiempo<sup>-1</sup>).

$X$ : biomasa (g<sub>x</sub>/l).

Introduciendo la ec de Monod en la ec. I.11, se obtiene:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{k_s + S} \cdot X \quad (\text{ec. I.12})$$

Siendo:

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

$\mu_m$ : velocidad específica de crecimiento máxima.

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

Al principio del cultivo batch, todos los nutrientes son saturantes, aún el sustrato limitante ( $s \gg k_s$ ) y el microorganismo crecerá a  $\mu_m$  máximo y constante, entonces la ec. I.12 se reduce a la siguiente ecuación:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_m \cdot X \quad (\text{ec. I.13})$$

Integrando se obtiene:

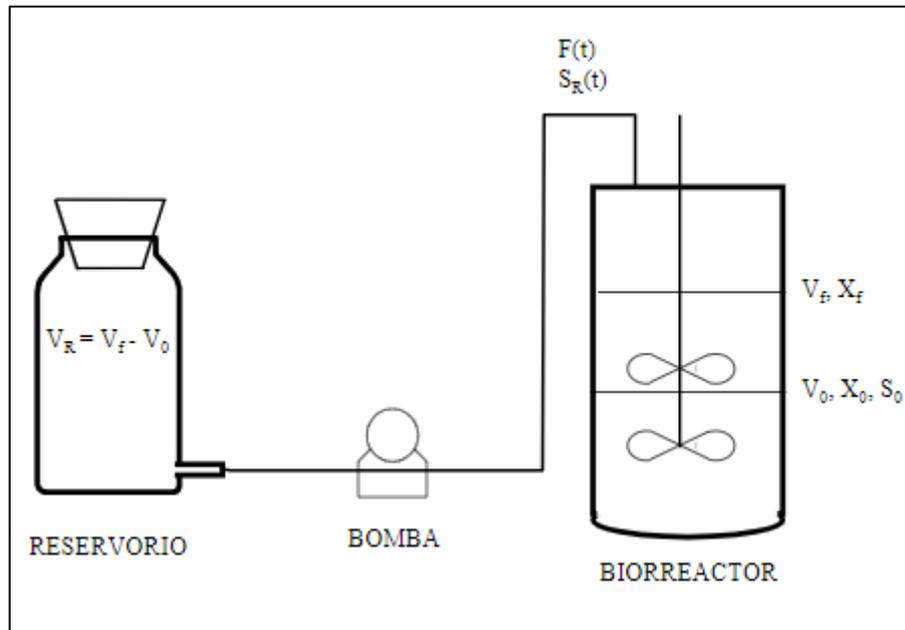
$$\ln X - \ln X_0 = \mu_m \cdot t \quad (\text{ec. I.14})$$

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

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

### **Cultivo batch alimentado:**

El término cultivo *batch alimentado* (BA) se refiere a un cultivo *batch* al cual se alimenta continuamente con medio de cultivo fresco o con alguno de sus componentes. Si el nutriente que se alimenta es el limitante del crecimiento, esta técnica permite controlar la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) del microorganismo (Fig. I.10)



**Figura I.8:** Esquema de un cultivo batch alimentado

Considerando que en un cultivo *BA* el caudal de salida es nulo y por lo tanto  $V$  varía con el tiempo, la ec. I.10 se reduce a:

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = F \cdot C_{i1} + V \cdot r_{fi} - V \cdot r_{ci} \quad (\text{ec. I.15})$$

Para comenzar un cultivo *BA* se deben tener células en el reactor, por lo tanto primero se debe hacer un cultivo *batch* y cuando las células entran en fase estacionaria se empieza a alimentar.

A partir de la ec. I.15, haciendo balance para sustrato se obtiene:

$$\frac{d(V \cdot S)}{dt} = F \cdot S_R - V \cdot r_s \quad (\text{ec. I.16})$$

Recordando que el consumo de sustrato viene dado por la ec. de Pirt (Pirt, 1975):

$$r_s = \frac{r_x}{Y'_{x/s}} + m_s \cdot X \quad (\text{ec. I.17})$$

Asumiendo que el mantenimiento celular ( $m_s$ ) es despreciable y reemplazando en la ec. 1.16, se obtiene:

$$\frac{d(V \cdot S)}{dt} = F \cdot S_R - \frac{V \cdot \mu \cdot X}{Y_{x/s}} \quad (\text{ec. I.18})$$

Considerando que en el sistema *BA*, en todo momento la concentración de sustrato limitante es despreciable ( $S \cong 0$ ), la ec. 1.18 se transforma en:

$$F \cdot S_R = \frac{V \cdot \mu \cdot X}{Y_{x/s}} \quad (\text{ec. I.19})$$

Siendo:

$X$ : concentración de biomasa (g/l).

$Y_{x/s}$ : factor de rendimiento de biomasa (g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>).

$S_R$ : concentración de la FCE en el medio de alimentación (g/l).

$F$ : flujo de alimentación (l/h).

$V$ : volumen de medio (l).

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento microbiano (h<sup>-1</sup>).

Para iniciar un cultivo *BA* y evitar que se acumule sustrato, a partir de la ec. I.19, se deberá cumplir la siguiente condición:

$$F \cdot S_R \leq \frac{\mu_0 \cdot V_0 \cdot X_0}{Y_{x/s}} \quad (\text{ec. I.20})$$

La ec. I.20 asegura que no se acumulará sustrato en el reactor porque se le está dando al cultivo, menos de su capacidad de consumo. Despejando  $F$  se obtiene el caudal de alimentación:

$$F = \frac{\mu_0 \cdot V_0 \cdot X_0}{Y_{x/s} \cdot S_R} \quad (\text{ec. I.21})$$

Los valores de  $V_0$  y  $X_0$  corresponden a los valores finales del cultivo *batch*, el valor de  $\mu_0$  se lo elige a voluntad siempre que sea menor a  $\mu_m$ . Queda por calcular el valor de  $S_R$ . A partir de la ec. I.15, haciendo balance para biomasa se obtiene:

$$\frac{d(VX)}{dt} = V \cdot r_x = V \cdot \mu \cdot X \quad (\text{ec. I.22})$$

Combinando las ec. I.19 y I.22 se obtiene:

$$F \cdot S_R \cdot Y_{x/s} = \frac{d(VX)}{dt} \quad (\text{ec. I.23})$$

Integrando la ec. I.23, para las condiciones iniciales y finales del cultivo *BA*, se obtiene la ecuación de una línea recta que indica cómo se acumula la biomasa con el tiempo en el transcurso del cultivo:

$$X_f \cdot V_f = X_0 \cdot V_0 + Y_{x/s} \cdot F \cdot S_R \cdot t \quad (\text{ec. I.24})$$

Siendo:

$X_0$ : concentración inicial de biomasa en el cultivo *BA* que corresponde a la concentración final del cultivo en la etapa *batch*.

$X_f$ : concentración de biomasa al final del proceso de alimentación.

$V_0$ : volumen del medio de cultivo al inicio del proceso de alimentación (corresponde al volumen de trabajo en la etapa *batch*).

$V_f$ : volumen del medio de cultivo al final del proceso de alimentación.

En el cultivo *BA* a caudal constante, se obtiene:

$$V_f - V_0 = F \cdot t_f$$

Reemplazando en la ec. I.24 y despejando  $S_R$  se obtiene:

$$S_R = \frac{X_f \cdot V_f - X_0 \cdot V_0}{Y_{x/s} \cdot (V_f - V_0)} \quad (\text{ec. I.25})$$

Ecuación que permite calcular la concentración de sustrato limitante en el reservorio.

Las ecuaciones I.21 y I.25 son denominadas **ecuaciones de diseño** de un sistema de cultivo *BA*.

Para saber cómo varía  $\mu$  en el transcurso del proceso *BA*, desde el valor de  $\mu_0$  (seleccionado arbitrariamente), se despeja  $\mu$  de la ec. I.22:

$$\mu = \frac{1}{X \cdot V} \frac{d(VX)}{dt} \quad (\text{ec. I.26})$$

Introduciendo la ec. I.23 y la ec. I.24 en la I.26, se obtiene:

$$\mu = \frac{Y_{x/s} \cdot F \cdot S_R}{X_0 \cdot V_0 + Y_{x/s} \cdot F \cdot S_R \cdot t} \quad (\text{ec. I.28})$$

Es decir que  $\mu$ , disminuye con el tiempo durante el transcurso del cultivo.

## I.6. OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo de tesis es estudiar procesos biotecnológicos para la extracción de polisacáridos (pectina y almidón), mediante tecnologías innovadoras de extracción por vía enzimática, utilizando extractos con elevada actividad poligalacturonasa producidos por *Wickerhamomyces anomalus*.

## I.7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Optimizar la producción de la enzima poligalacturonasa por *Wickerhamomyces anomalus* en medios de cultivos de bajo costo, a escala frascos agitados y posteriormente a escala biorreactor.
- Desarrollar diferentes estrategias para la extracción por vía enzimática de pectina y almidón, utilizando los extractos enzimáticos de *W. anomalus*.
- Evaluar diferentes factores que influyen en los procesos de extracción.
- Evaluar los rendimientos de extracción en las condiciones óptimas seleccionadas.
- Caracterizar los polisacáridos obtenidos desde el punto de vista químico y funcional.

## CAPITULO II: OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA POLIGALACTURONASA POR WICKERHAMOMYCES ANOMALUS

### RESUMEN

---

El objetivo de la presente etapa fue producir una poliglacturonasa por *Wickerhamomyces anomalus*, en un medio de cultivo simple de preparar y de bajo costo, mediante los sistemas de cultivo batch y batch alimentado.

El efecto de varios nutrientes sobre la producción de la enzima poliglacturonasa (PGasa) por *W. anomalus*, se evaluó a escala frascos agitados, a partir de un medio de fermentación de referencia, utilizando el método de un factor por vez, el diseño de Plackett-Burman (PB) y la metodología de superficie de respuesta (MSR). El medio de fermentación optimizado se utilizó para evaluar el crecimiento de la levadura y la producción de la PGasa, por medio de cultivos batch y batch alimentado, a escala biorreactor de laboratorio.

La actividad PGasa obtenida en el medio de referencia fue de ~ 20 UE/mL. La ausencia de elementos trazas en el medio de cultivo tuvo un efecto represivo sobre la síntesis de enzimas. La adición de extracto de levadura, en lugar de vitaminas y aminoácidos, en el medio de cultivo, mejoró la producción de la enzima. El diseño de Plackett-Burman determinó que solo la pectina cítrica comercial y el extracto de levadura tuvieron un efecto significativo y positivo en la producción de PGasa. El diseño de Doehlert determinó una máxima producción de PGasa al agregar 6,0 y 0,8 g/L de pectina y extracto de levadura, respectivamente, en el medio de cultivo. El medio de fermentación optimizado incluyó glucosa, pectina de citrus, urea, extracto de levadura y sales. En este medio, la síntesis de PGase alcanzó ~25 UE/mL y ~49 UE/mL, en cultivos batch y batch alimentado, respectivamente, a escala biorreactor de laboratorio.

En esta etapa, se logró obtener un extracto enzimático con alta actividad PGasa de *W. anomalus*, en un medio de cultivo de simple preparación, mediante sistemas batch y batch alimentado, apropiado para su uso futuro en la extracción enzimática de polisacáridos de interés regional.

---

**Palabras claves:** poliglacturonasa, *Wickerhamomyces anomalus*, optimización, producción enzimática.

## II.1. INTRODUCCION

Las enzimas pecticas o pectinasas son las responsables de la degradación de las sustancias pécticas presentes en la laminilla media y en la pared celular primaria de las plantas superiores. Según su modo de acción se clasifican en: poligalacturonasa (PGasa), pectinesterase (PE), pectinliasa (PL) y pectatoliasa (PAL). Estas enzimas juegan un importante rol en la industria de alimentos, principalmente en la maceración de tejidos vegetales y en la clarificación de jugos de frutas y vinos, (Jayani y col., 2005, Tari y col. 2007; Rehman, H. U. y col., 2012).

Las enzimas pécticas son producidas por una gran variedad de microorganismos como hongos filamentosos, levaduras y bacterias (Souza y col., 2003, Anuradha y col., 2014). Las levaduras presentan una fuente alternativa para la producción a gran escala de enzimas comerciales. Las levaduras son organismos unicelulares por lo que su crecimiento es relativamente simple y fácil de cambiar de escala y a muchas de ellas se las considera como microorganismos GRAS (da Silva y col. 2005).

Teniendo en cuenta que el costo de los medios de fermentación es uno de los factores determinantes en la producción de enzimas microbianas, es importante formular medios de cultivos con el menor costo posible y que al mismo tiempo provean los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento adecuado del microorganismo y la producción enzimática (Nighojkar y col. 2006).

El estudio de la formulación de medios de cultivos para el crecimiento de los microorganismos, ha sido objeto de estudio de numerosos trabajos tendientes a disminuir los costos de producción del metabolito de interés, especialmente cuando no se tiene conocimiento de los requerimientos nutricionales de la cepa en estudio. Los medios de cultivos definidos son convenientes porque brindan no solo reproducibilidad al sistema, sino también pureza para las proteínas que son secretadas al medio.

En general la producción de enzimas ha sido tradicionalmente optimizada por la estrategia de modificar una variable por vez, mientras se mantienen las otras a un nivel constante. Esta estrategia es laboriosa y consume tiempo, especialmente para un gran número de variables y no considera la interacción entre factores. Un procedimiento más eficiente es el uso de métodos estadísticos. Para la evaluación de más de cinco factores, se recomienda el diseño Plackett-Burman. (Sharma y Satynarayana, 2006). El diseño de Plackett-Burman (PB) es un diseño factorial fraccionario, que permite discernir que variables influyen sobre el resultado experimental pero no permite estudiar la existencia de interacciones entre ellas. Es de gran utilidad para estudios preliminares en donde se debe investigar gran número de variables y en los cuales la utilización de un modelo factorial completo se hace impracticable debido a la gran cantidad de ensayos requeridos. Este tipo de experimento deja de lado las interacciones entre variables en aras de la sencillez. Según el diseño de PB, el número de experiencias debe ser múltiplo de cuatro. La metodología de Superficie de Respuesta permite examinar la variación de todos los componentes simultáneamente y permite estimar las interacciones entre las variables. Sin embargo, esta metodología es útil para un pequeño número de variables, pero inviable para un mayor número de factores debido al elevado número de experiencias que se requieren realizar. Para evaluar más de cinco factores, se recomienda realizar previamente un screening mediante el diseño PB.

La producción de la enzima se puede realizar mediante cultivo batch, batch alimentado o continuo. El cultivo batch alimentado, tiene la ventaja de permitir el control de la velocidad específica de crecimiento microbiano ( $\mu$ ), manteniendo en todo momento en el biorreactor, condiciones de sustrato limitante y por lo tanto permite una mayor producción de biomasa, características importantes en la expresión de PGasa, si la enzima está asociada al crecimiento.

*Wickerhamomyces anomalus*, re-clasificación de la especie *Pichia anomala* (Kurtzman y col. 2008), es una levadura autóctona aislada a partir de frutas cítricas, en la Provincia de Misiones, Argentina. Esta levadura, al crecer en un medio de cultivo sintético compuesto por glucosa, pectina de citrus, sales, elementos traza, vitaminas y aminoácidos, produce en forma asociada al crecimiento, una enzima con actividad poligalacturonasa (PGasa). Esta enzima es de gran importancia industrial ya que posee actividad PPasa o capacidad macerante de tejidos vegetales.

La presente etapa de este trabajo de tesis tuvo como objetivo estudiar el efecto que ciertos nutrientes del medio de cultivo ejercen sobre la expresión de la enzima poligalacturonasa de *W. anomaus*, en un medio de cultivo sintético y mediante cultivo batch. Con el propósito de aumentar la producción de la enzima, se estudió posteriormente un sistema batch alimentado.

## **II.2. MATERIALES Y METODOS**

### ***II.2.1. Microorganismo, mantenimiento y conservación***

Se utilizó una levadura autóctona de la Provincia de Misiones, Argentina, aislada a partir de cáscaras de frutas cítricas en el laboratorio de Microbiología de Alimentos y Biotecnología “Dr. Fernando O. Benassi”, de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, UNaM. Esta levadura fue identificada por métodos moleculares como *Wickerhamomyces anomalus* en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro Regional Mendoza, San Juan (Martos y col., 2013a). La cepa fue mantenida en estrías de un medio de mantenimiento, a 5 °C, hasta 2 meses y conservada por liofilización.

Para la conservación por liofilización, se realizó una suspensión de células, a partir de estrías jóvenes (24 h) de la levadura, en una solución crioprotectora de leche descremada (Nestlé) al 10 % (p/v) e inositol trifosfato (Anedra) al 5 % (p/v). La suspensión fue congelada a – 80 °C y posteriormente liofilizada. Al final del proceso, las ampollas con el liofilizado fueron selladas y conservadas a 5 °C. Cuando fue necesario, una ampolla que contenía la levadura fue recuperada luego de re-hidratación con agua estéril, seguida de cultivo en estrías de medio de mantenimiento.

### ***II.2.2. Medios de cultivo***

a) *Medio de mantenimiento* (Yeast Medium - g/L): extracto de levadura (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA), 5; Triptona (Difco-Becton Dickinson & Co., Sparks, MD, USA), 5; Glucosa (Britania, Buenos Aires, Argentina), 10; Agar (Britania), 15; pH 5,0.

b) *Medio de fermentación y de referencia (medio FR)* (g/L): glucosa (Britania), 10; pectina de citrus (Parafarm, Buenos Aires, Argentina), 5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub>, 0,5; CaCl<sub>2</sub>, 0,1; solución de

vitaminas (1000 ×), 1 mL/L; solución de aminoácidos (100 ×), 10 mL/L; solución de elementos traza (1000×), 1 mL/L; pH 5,0 (Cavalitto y col., 2000).

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

*Solución de aminoácidos* 100× (Sigma, mg/L): histidina, 10; metionina, 20 y triptófano, 20.

*Solución de elementos traza* 1000 × (µg/L): CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O, 40; FeCl<sub>3</sub>•6 H<sub>2</sub>O; 200; MnSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 400; NaMoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O, 200; ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 400.

Todos los componentes del medio fueron autoclavados (121°C, 15 min), excepto las vitaminas, que se esterilizaron por separado a través de un papel de filtro celulósico de 0,22 µm de diámetro de poro (Sartorius Stedim Biotech, Alemania).

La pectina cítrica fue lavada para eliminar los azúcares y otros excipientes presentes en la pectina comercial. Los lavados se realizaron con alcohol 70 % v/v en HCl (0,05 N) (Cavalitto y col. 1996).

Antes de su utilización, se mezclaron las cantidades correspondientes de cada una de las soluciones en forma aséptica.

### **II.2.3. Producción de la enzima PGasa por *W. anomalus***

Se inocularon frascos Erlenmeyers de 250 mL que contenían 45 mL del medio FR con 5 mL de una suspensión de un cultivo joven de *W. anomalus* (24 h) en agua destilada estéril (DO<sub>620</sub> = 1,10). Los mismos se incubaron a 30 °C en una incubadora con agitación orbital (MRC, TOU-50N 25 mm de excentricidad) a 180 rpm, durante 16 h. Finalizado este tiempo, las células se cosecharon por centrifugación (2350 × g durante 10 min), fueron lavadas y resuspendidas en agua destilada estéril (DO<sub>620</sub> = 1,10) y utilizadas como inóculo para el siguiente cultivo. Se realizaron 3 (tres) pasajes sucesivos de 16 h cada uno (precultivos) y se evaluó el crecimiento y la producción de la enzima en el 4to cultivo. Finalizada la etapa de fermentación, el cultivo fue centrifugado, para remover las células de levaduras y el sobrenadante, denominado extracto enzimático (EE), se mantuvo a – 18 °C hasta su utilización como fuente de enzima extracelular. Cuando fue necesario, las muestras se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 30 °C con agitación, a los efectos de acelerar el proceso de modo de minimizar la desnaturalización de las proteínas presentes (Martos y col., 2013a) (Fig. II.1).



**Figura II.1:** Esquema del proceso de producción de PGasa por *W. anomalus* a escala frascos agitados.

#### ***II.2.4. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de PGasa por *W. anomalus****

En esta etapa se evaluó el efecto de la temperatura de incubación, pH y velocidad de agitación, mediante la aplicación de un diseño factorial  $2^3$ . Luego los factores significativos se optimizaron por la metodología de superficie de respuesta.

- ***Diseño factorial  $2^3$***

Las fermentaciones se realizaron variando las siguientes condiciones de cultivo, a dos niveles, alto (+1) y bajo (-1): temperatura de incubación (30 a 40°C), pH (4,5 y 6,5) y velocidad de agitación (150 y 250 rpm), mediante la aplicación de un diseño factorial  $2^3$ . Las variables codificadas y las respectivas variables reales, se presentan en la Tabla II.1. Basado en el diseño factorial, se confeccionó una matriz con 8 experimentos (Tabla II.2). Las experiencias se realizaron en un orden aleatorio, con tres repeticiones y los resultados se presentan como valores medios. El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo con el programa estadístico Statgraphics Centurión XV (Statgraphics Centurión XV, 2009).

Los cultivos se llevaron a cabo según se describió anteriormente y se incubaron bajo las condiciones determinadas según el diseño experimental planteado, durante 16 h. Se midió la actividad PGasa de los sobrenadantes (Ferreya y col., 2002).

**Tabla II.1:** Valores reales y codificados de los factores según el diseño factorial 2<sup>3</sup>

Factor	Código	Niveles del factor	
		Alto (+1)	Bajo (-1)
Temperatura (°C)	A	50	30
pH	B	6	3
Agitación (rpm)	C	250	150

**Tabla II.2:** Diseño a niveles alto y bajo para cada factor.

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

A: temperatura (°C); B: pH; C: agitación (rpm)

- **Superficie de respuesta: diseño de Doehlert**

La metodología de superficie de respuesta (MSR) permite examinar la variación de todos los componentes simultáneamente y estimar las interacciones entre las variables. Actualmente, esta técnica ha sido ampliamente usada por diferentes investigadores para optimizar las condiciones de cultivo para la producción de metabolitos microbianos (Díaz y col. 2005; Tari y col. 2007; Göğüş y col. 2015).

Teniendo en cuenta los factores con efecto significativo del diseño factorial anterior, se aplicó la MSR para optimizar las condiciones de cultivo sobre la producción de PGasa por *W. anomalus*. Se utilizó el diseño experimental propuesto por Doehlert, en el cual el número de experiencias requeridas está dado por  $N = n*2 + n + n_0$ , donde  $n$  es el número de variables y  $n_0$  es el número de puntos centrales. El valor de  $n_0$  se fijó en 3; por lo tanto, el número total de puntos de la matriz de Doehlert fue de 9 (Doehlert, D. H., 1970, Butiuk y col., 2015). Las repeticiones en el nivel central se realizan con objeto de validar el modelo a los datos experimentales y determinar el error experimental. Los valores reales de las variables independientes fueron codificados utilizando la siguiente función lineal:

$$X = Z \times \frac{\Delta X}{\Delta Z} + X_0$$

Siendo

X: valor real del punto central.

$\Delta X$ : diferencia entre el valor más alto y el más bajo de los valores reales.

$\Delta Z$ : diferencia entre el valor más alto y el más bajo de los valores codificados.

En la Tabla II.3 se presenta la matriz utilizada en el diseño experimental de Doehlert. El orden de los experimentos se seleccionó al azar, lo que proporcionó protección contra efectos de las variables indeseables. Las fermentaciones se realizaron según se describió anteriormente. Los experimentos se desarrollaron por triplicado y los resultados corresponden a los valores medios de las actividades.

Los resultados se analizaron aplicando un programa estadístico Statgraphics Centurion XV. Luego las curvas de superficie de respuesta se graficaron mediante el paquete de gráficos y visualización SigmaPlot 10.0.

**Tabla II.3:** Valores codificados y reales utilizados en el diseño experimental de Doehlert.

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

### II.2.5. Efecto de los componentes nutricionales sobre la producción de PGasa por *anomalus*

- *Metodología de un factor por la vez*

Se llevaron a cabo estudios preliminares para evaluar el efecto de algunos componentes del medio FR en la producción de PGasa por *W. anomalus*, utilizando el método de "un factor por vez" (Rehman y col., 2012). Las fermentaciones se llevaron a cabo como se mencionó anteriormente, y las pruebas experimentales en el medio de cultivo original (medio FR) se consideraron como control.

- *Efecto de los elementos traza*

Para estudiar el efecto de los elementos traza sobre la expresión de PGasa, se realizaron una serie de cultivos en medio FR, omitiendo la adición de un elemento en cada experiencia, lo que permitió evaluar la influencia de ese único nutriente (Ferreya y col., 2002). Para ello, se prepararon cinco medios de cultivos denominados MR<sub>1</sub> a MR<sub>5</sub> (Tabla II.4).

**Tabla II.4:** Soluciones para los microelementos para los medios MR<sub>1</sub> a MR<sub>5</sub>.

Elemento traza	MR	MR <sub>1</sub>	MR <sub>2</sub>	MR <sub>3</sub>	MR <sub>4</sub>	MR <sub>5</sub>
Mo	+	-	+	+	+	+
Fe	+	+	-	+	+	+
Zn	+	+	+	-	+	+
Cu	+	+	+	+	-	+
Mn	+	+	+	+	+	-

Las experiencias se realizaron por duplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios.

- *Selección de la fuente de nitrógeno*

Se investigó el efecto de fuentes de nitrógeno sencillas en el medio de cultivo sobre la producción de PGasa. El medio de FR fue suplementado con urea o sulfato de amonio (alternativamente). Se utilizaron cantidades equivalentes en nitrógeno (0,64 g<sub>N</sub>/L) de ambas fuentes. Considerando biomasa estándar (CH<sub>1,79</sub>O<sub>0,5</sub>N<sub>0,2</sub>), la demanda estequiométrica de nitrógeno resulta ser del 0,108 g<sub>N</sub>/g<sub>x</sub>. Para 5 g<sub>x</sub>/L de biomasa, se requerirán 0,6 g<sub>N</sub>/L, suponiendo un rendimiento máximo teórico de 0,5 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> y 10 g/L de la fuente de carbono y energía (FCE). La composición en nitrógeno total de cada una de las fuentes ensayadas se detalla en la Tabla II.5.

**Tabla II.5:** Concentración de las fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo.

Fuente de nitrógeno	Composición nitrógeno total (% p/p)	Concentración del compuesto en el medio (g/L)	Concentración de Nitrógeno en el medio de cultivo (g/L)
Sulfato de amonio	21,2	3	0,636
Urea	45,16	1,408	0,636

El medio FR se preparó según se mencionó anteriormente. El sulfato de amonio se esterilizó en autoclave 15 min a 121 °C, previo ajuste del pH a 5,0; y la urea por filtración, utilizando membranas de nitrato de celulosa de 0,22 μm de tamaño de poro (Sartorius).

Las experiencias se realizaron por triplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios.

- *Efecto del extracto de levadura*

El extracto de levadura es un reactivo muy utilizado en la preparación de medios de cultivos microbiológicos, debido a que contiene vitaminas esenciales, minerales y aminoácidos que son útiles para el crecimiento de los microorganismos y suele ser muy utilizado a nivel industrial para la producción de metabolitos. El extracto de levadura es rico en vitaminas especialmente del complejo B, aminoácidos (alanina, arginina, ácido aspártico, cistina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina,

metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina) y cationes (calcio, magnesio, potasio, sodio) (Tesis Cavalitto, 2003).

En la presente etapa del trabajo se investigó el uso de extracto de levadura en reemplazo de las vitaminas y aminoácidos del medio FR, a fin de obtener un medio de cultivo económico y más simple de preparar para su posterior utilización a mayor escala.

El medio FR se preparó según se mencionó anteriormente pero sin el agregado de vitaminas y aminoácidos. El extracto de levadura se esterilizó por separado, en autoclave 15 min a 121 °C, previo ajuste del pH a 5,0. Se evaluaron distintas concentraciones de extracto de levadura en un rango de 0,1 a 1 g/L, en el medio de cultivo.

Las experiencias se realizaron por duplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios.

- *Diseños experimentales*
- *Diseño experimental Plackett-Burman*

El diseño de Plackett-Burman (PB) es una herramienta útil que permite realizar un screening de una gran número de variables (mayor a 5) que influyen sobre el resultado experimental (Cavalitto y Mignone, 2007; Shabbiri y col., 2012; Brzozowski, 2014).

En la presente etapa se aplicó el diseño PB para analizar el efecto de siete factores nutricionales sobre la producción de PGasa por *W. anomalus*. Los factores nutricionales estudiados fueron: concentración de pectina cítrica comercial (A), extracto de levadura (B), presencia/ausencia de elementos traza (C), concentración de Fe<sup>+2</sup> (D), Ca<sup>+2</sup> (E), Mg<sup>+2</sup> (F) y PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> (G). Estos factores se analizaron en dos niveles: alto (+1) y bajo (-1). Las variables codificadas y las respectivas variables reales, se presentan en la Tabla II.6. El rango de los factores evaluados se seleccionó en base a resultados obtenidos anteriormente al variar un factor por vez y de referencias bibliográficas. Basado en el diseño PB, se obtuvo la matriz correspondiente.

Para el diseño de PB se utilizó el medio FR sin el agregado de vitaminas y aminoácidos. Las fermentaciones se realizaron según se describió anteriormente.

**Tabla II.6:** Valores reales y codificados de los factores para diseño Plackett-Burman

Factor	Código	Niveles del factor	
		Alto (+1)	Bajo (-1)
Pectina (g/L)	A	10	2,5
Extracto de levadura (g/L)	B	1,5	0,1
Elementos traza 1000 × (mL/L)	C	1	0
Fe <sup>+2</sup> (mg/L)	D	0,2	0,1

Ca <sup>+2</sup> (g/L)	E	0,1	0,05
Mg <sup>+2</sup> (g/L)	F	0,5	0,25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	G	1	0,5

Las experiencias se realizaron en un orden aleatorio, por triplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios. El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo con el programa estadístico Statgraphics Centurión XV.

- *Metodología de Superficie de Respuesta: Diseño de Doehlert*

El diseño de PB no permite estudiar la existencia de interacciones entre las variables, ni predecir valores óptimos (Chen y col., 2009).

Teniendo en cuenta los factores que presentaron efecto significativo sobre la producción de PGasa mediante el diseño PB, en la presente etapa se aplicó la metodología de superficie de respuesta, para encontrar las concentraciones óptimas de dichos factores, utilizando el diseño experimental propuesto por Doehlert, el que se describió anteriormente. El valor de  $n_0$  se fijó a 3; por lo tanto, el número total de puntos de la matriz de Doehlert fue de 9. En la Tabla II.7 se presenta la matriz utilizada en el diseño experimental de Doehlert.

Las curvas de superficie de respuesta se obtuvieron a través del programa estadístico Statgraphics Centurión XV, software para determinar los niveles óptimos de las variables para la producción máxima de la enzima PGasa por *W. anomalus*. Luego se graficó mediante el paquete de gráficos y visualización SigmaPlot 10.0.

**Tabla II.7:** Valores codificados y reales utilizados en el diseño experimental de Doehlert

Experiencia	Valores codificados		Valores reales	
	Ext. de levadura (g/L)	Pectina (g/L)	Ext. de levadura (g/L)	Pectina (g/L)
1	1	0	1,5	6,25
2	0,5	-0,866	1,15	10
3	-0,5	-0,866	0,45	10
4	-1	0	0,1	6,25
5	-0,5	0,866	0,45	2,5
6	0,5	0,866	1,15	2,5
7	0	0	0,8	6,25
8	0	0	0,8	6,25
9	0	0	0,8	6,25

### II.2.6. Validación de los modelos experimentales

Para validar el modelo aplicado, se llevaron a cabo ensayos adicionales para la producción de PGasa por *W. anomalous* a escala frascos agitados que contenían el medio de fermentación optimizado (FO), previsto por la superficie de respuesta (Shabbiri y col., 2012; Uzuner y Cekmecelioglu, 2015).

Los cultivos se realizaron en frascos Erlenmeyers de 500 mL conteniendo 90 mL del medio FO, inoculados con 10 mL de una suspensión de células ( $Abs_{620}=0,96$ ) proveniente de una estría joven (24 h) en medio de conservación de la levadura en estudio. Los frascos Erlenmeyers se incubaron bajo las condiciones y medio de cultivo optimizadas anteriormente, en una incubadora con agitación orbital (MRC, TOU-50N 25 mm de excentricidad). Se midió actividad PGasa del EE, libre de células.

Las experiencias se realizaron por triplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios.

### II.2.7. Cultivos a escala biorreactor

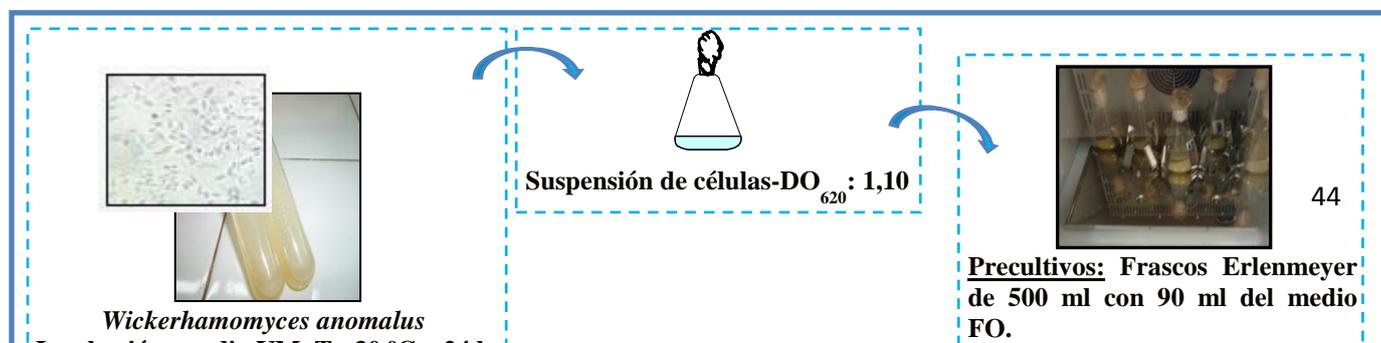
La cinética de crecimiento y la producción de PGasa de *W. anomalous* en cultivos batch y batch alimentado se llevaron a cabo en un biorreactor de 5 L (New Brunswick Scientific CO. INC.; Edison, N. J., U. S. A.; Modelo MA 107), a 30° C, con aireación (2,82 L/min) y agitación (500 rpm).

- **Cultivo batch**

**Precultivos:** se inocularon cuatro frascos Erlenmeyers de 500 mL que contenían 90 mL del medio de FO, con 10 mL de inóculo ( $DO_{620} = 0,98$ ) proveniente de un cultivo joven (24 h) de *W. anomalous* en medio YM. Los frascos Erlenmeyers se incubaron en las condiciones anteriormente optimizadas, en una incubadora con agitación orbital (MRC, TOU-50N 25 mm de excentricidad), durante 16 h. Al cabo de este tiempo, los cultivos se utilizaron como inóculo para la etapa de fermentación.

**Fermentación:** se utilizó un biorreactor de 5 L de capacidad, conteniendo un volumen final de 3 L de medio de FO. El fermentador se esterilizó en autoclave (121°C, 15 min) con la solución de glucosa y pectina a la que se le agregó 300  $\mu$ L de antiespumante (Sigma). El resto de las soluciones de nutrientes y el inóculo, se agregaron por separado al biorreactor utilizando frascos Erlenmeyers con salida lateral, antes de su utilización. El cultivo se agitó a 500 rpm y se le suministró aire estéril con un caudal de 2,82 L/min. Luego de 5 min se comenzaron a tomar muestras en función del tiempo. Se extrajeron primeramente 20 mL, los que fueron descartados y posteriormente 10 mL. Se midió crecimiento microbiano por medida de DO a 620 nm, y luego las muestras se centrifugaron a  $2350 \times g$  por 10 min, para remover las células de levadura. El sobrenadante se utilizó para evaluar actividad PGasa, glucosa residual y pH.

La experiencia se realizó por duplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios (Fig. II.2).



**Figura II.2:** Esquema del proceso de producción de PGasa por *W. anomalus* a escala biorreactor, mediante cultivo batch.

- **Cultivo batch alimentado**

Con el propósito de aumentar la expresión de la enzima y por consiguiente la productividad del proceso, se realizó la producción de la enzima en un sistema de cultivo tipo batch alimentado (BA).

El cultivo BA se inició con un cultivo batch con el medio de cultivo optimizado (medio FO, 3 L), como se describió previamente, y cuando se agotó la glucosa, se inició la alimentación de medio fresco, bajo régimen de flujo constante (F), por medio de una bomba peristáltica (Fig. II.3).

Para controlar la velocidad de alimentación de la glucosa y evitar la acumulación de la FCE (sustrato limitante), la concentración de glucosa en el reservorio ( $S_R$ ) y el valor de F, fueron estimados con las siguientes ecuaciones que derivan de balances de masa para el sustrato y biomasa en cultivos limitados (ecuaciones de diseño del cultivo BA), utilizando los parámetros cinéticos y estequiométricos del cultivo batch (Rojas y col., 2011).

$$S_R = \frac{X_f \cdot V_f - X_0 \cdot V_0}{Y_{x/s} \cdot (V_f - V_0)} \qquad F = \frac{\mu_0 \cdot V_0 \cdot X_0}{S_R \cdot Y_{x/s}}$$

Siendo:

$S_R$ : concentración del sustrato limitante (glucosa) en el medio de alimentación.

$X_0$  y  $X_f$ : las concentraciones de biomasa al comienzo y al final de la fase de alimentación (g/L), respectivamente.

$V_0$  y  $V_f$ : volúmenes inicial y final (L), respectivamente.

F: caudal de alimentación (mL/h).

$\mu_0$ : velocidad específica inicial de crecimiento ( $\mu_0 < \mu_{max}$ ).

$Y_{x/s}$ : coeficiente de rendimiento celular basado en el consumo de fuente de carbono ( $g_{celula}/g_{FCE}$ ).

El medio de alimentación se formuló con medio FO y concentrado (5 ×), pero sin la adición de pectina de citrus y con la concentración de glucosa ( $S_R$ ) estimada mediante la ecuación 1.

Durante la etapa de alimentación, se tomaron muestras en función del tiempo (cada 1 h). Se calculó el volumen de medio en el reactor a los diferentes tiempos, biomasa, glucosa residual y actividad PGasa.

El reservorio de alimentación conteniendo la FCE, fue esterilizado previamente en autoclave (15 min, a 121 °C). El resto de los componentes (vitaminas, urea y sales), fueron agregados al reservorio antes de su utilización.



**Figura II.3:** Cultivo batch alimentado para la producción de PGasa por *W. anomalus*, a escala biorreactor.

### **II.2.8. Determinaciones analíticas**

Medida de la actividad PG: la actividad PGasa se midió por determinación de los grupos reductores liberados a partir de una solución de ácido poligalacturónico 2 g/L (Sigma), en una solución tampón de acetato sódico/ácido acético (BAC, 0,2 M, pH 5,0) usando el método Somogy-Nelson, usando ácido galacturónico (AG) como referencia (Herber y col., 1971).

Procedimiento: En baño agua-hielo, se agregan 20  $\mu$ L de la solución enzimática diluida convenientemente, a tubos de ensayos que contienen 180  $\mu$ L de sustrato (APG, 2 g/L, en Buffer acetato de sodio/ácido acético (BAC: 0,2 M, pH 5,0). Los mismos son incubados a 37°C durante 10 min. Luego, los tubos se colocan nuevamente en baño de agua-hielo y se agrega a cada uno de ellos, 200  $\mu$ L de reactivo Somogy. Se transfieren los tubos a baño de agua hirviente, durante 10 min. Luego se agregan 200  $\mu$ L de reactivo Nelson, se agita en vortex vigorosamente y se deja en reposo por 30 min. Finalmente se adicionan 1,8 mL de agua

destilada y se lee la  $A_{660}$ . El blanco de la reacción se realiza con la enzima inactivada térmicamente (5 min, 100°C). Mediante una curva de calibración de AG (Sigma) en el rango de 0 a 500 mg/L, se determina la cantidad equivalente de grupos reductores producidos durante la reacción.

Una unidad de actividad PG se define como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturónico por minuto bajo las condiciones de ensayo. (Cavalitto y col., 2000; Ferreyra y col., 2002).

Determinación de biomasa: el crecimiento microbiano (g/L) se determinó por medidas de  $\text{DO}_{620}$  y peso seco. Luego del proceso de centrifugación, las células fueron lavadas con agua destilada, centrifugadas y colocadas en estufa a 80°C, hasta peso constante.

Glucosa residual: se utilizó el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (Glicemia, Wiener, Argentina).

## II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

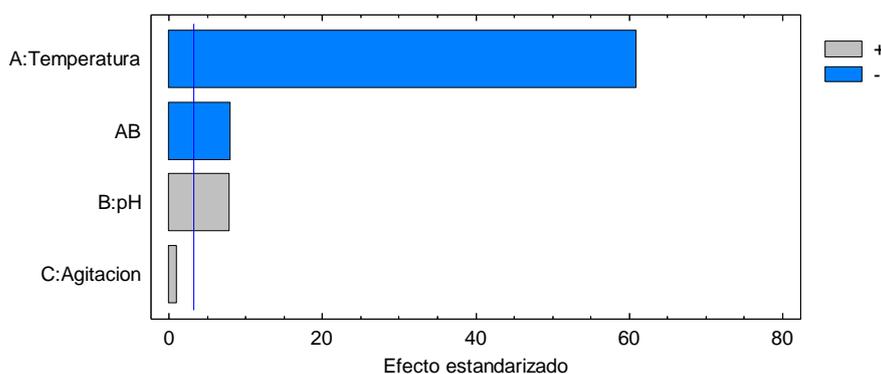
### II.3.1. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de PGasa por *W. anomalous*

- **Diseño factorial  $2^3$**

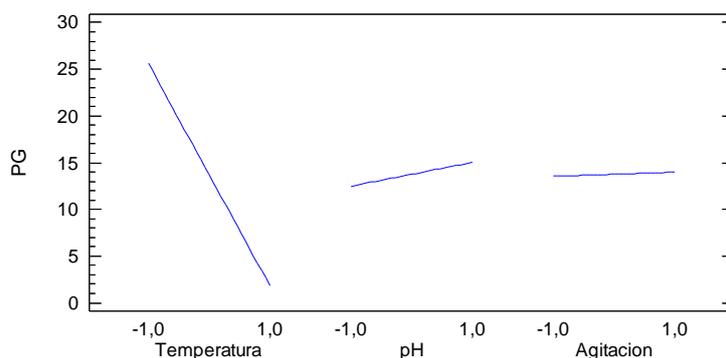
En la Tabla II.8 se presenta el Análisis de Varianza para la producción de PGasa por *W. anomalous* mediante el diseño factorial  $2^3$ . En la Figura II.4 se presenta el Diagrama de Pareto y en la Figura II.5 el gráfico de los Efectos Principales.

**Tabla II.8:** Análisis de Varianza para la producción de PG por *W. anomalous* mediante el diseño factorial  $2^3$ .

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	1139,08	1	1139,08	3722,3	0,0000
B:pH	18,7884	1	18,7884	61,40	0,0043
C:Agitación	0,26645	1	0,26645	0,87	0,4196
AB	19,7192	1	19,7192	64,44	0,0040
Error total	0,91805	3	0,30602		
Total (corr.)	1178,77	7			



**Figura II.4:** Diagrama de Pareto para la producción de PG por *W. anomalus*.



**Figura II.5:** Gráfica de los efectos Principales para la producción de PG por *W. anomalus*

La Tabla de Análisis de Varianza (Tabla II.8) muestra que la temperatura, el pH y la interacción entre éstos, influyeron significativamente en la producción de la enzima, siendo el valor de P menor a 0,05, para un nivel de confianza del 95,0%. El  $R^2$  estadístico (0,99) indicó que el modelo presentó un buen ajuste a los datos experimentales. El valor  $R^2$  es siempre entre 0 y 1, y un valor  $> 0,75$  indica idoneidad del modelo.

El pH influyó de manera positiva sobre la producción de la enzima, mientras que la temperatura lo hizo de manera negativa, al igual que la interacción entre ambos factores. La velocidad de agitación no influyó sobre la misma variable de respuesta (Fig. II.4). El aumento de temperatura mostró una marcada disminución en la producción de la PGasa (Fig. II.5).

- **Superficie de respuesta: diseño de Doehlert**

Los dos factores que influyeron significativamente en la producción de PGasa (temperatura de incubación y pH) se optimizaron utilizando la MSR, mediante el diseño experimental de Doehlert.

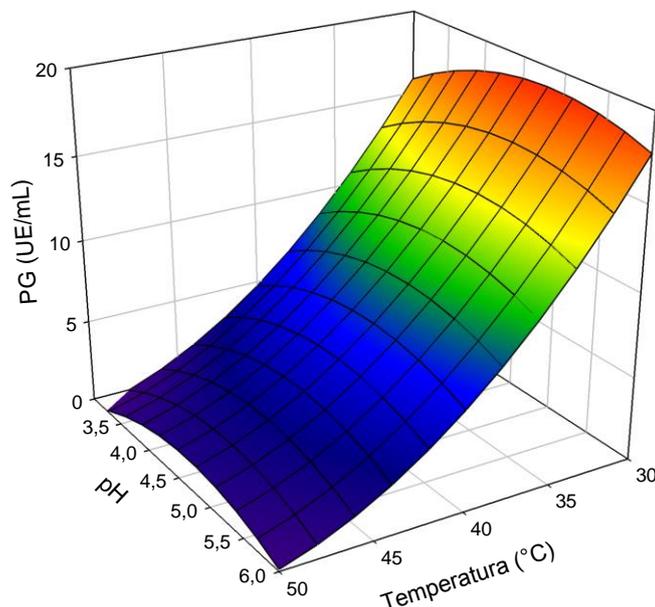
Los datos de la Tabla II.3 fueron convertidos en una ecuación polinomial de segundo orden. La producción de PGasa puede ser predicha por la ecuación de regresión que se presenta a continuación:

$$PGasa \left( \frac{UE}{mL} \right) = 7,363 - 8,525 * T + 0,759 * pH + 2,892 * T^2 - 2,645 * pH^2 \quad (\text{ec. III. 3})$$

En dicha ecuación, la temperatura de incubación (T) y pH representan los datos codificados. El valor de  $R^2$  para la ecuación (2) resultó 0,99, de modo que la ecuación presentó un muy buen ajuste a los datos experimentales.

Según la ec. III.3, se puede puntualizar que las dos variables independientes tuvieron un efecto lineal significativo, positivo (pH) y negativo (T). La temperatura fue la variable lineal más importante que afectó la producción de la PGasa, ya que posee el mayor coeficiente de regresión. Ambos factores tuvieron efectos cuadráticos significativos, negativo (pH) y positivo (T), indicando la existencia de un máximo de producción para la temperatura y un mínimo para el pH.

En la Figura II.6 se presenta la superficie de respuesta para la producción de la PGasa en función de las dos variables independientes.



**Figura II.6:** Superficie de respuesta mostrando el efecto de la temperatura y el pH sobre la producción de PGasa por *W. anómalus*.

La Figura II.6 muestra que la mayor producción de la enzima se obtuvo a temperaturas bajas y pH en el rango de 5 a 6. La ec. 3 arrojó un valor máximo de producción de PGasa de 18,84 UE/mL a 30°C y pH 5,1. Esta temperatura de 30°C coincide con el valor de temperatura más bajo ensayado, por lo tanto es posible suponer que la misma no se corresponde con la temperatura óptima para la producción de la enzima y que la temperatura óptima se encontraría a valores aún más bajos. Sin embargo, se seleccionó esta temperatura mínima, a los efectos de evitar costos adicionales en el proceso, debido a la necesidad de refrigerar el cultivo en el biorreactor, en las épocas de elevadas temperaturas en la región.

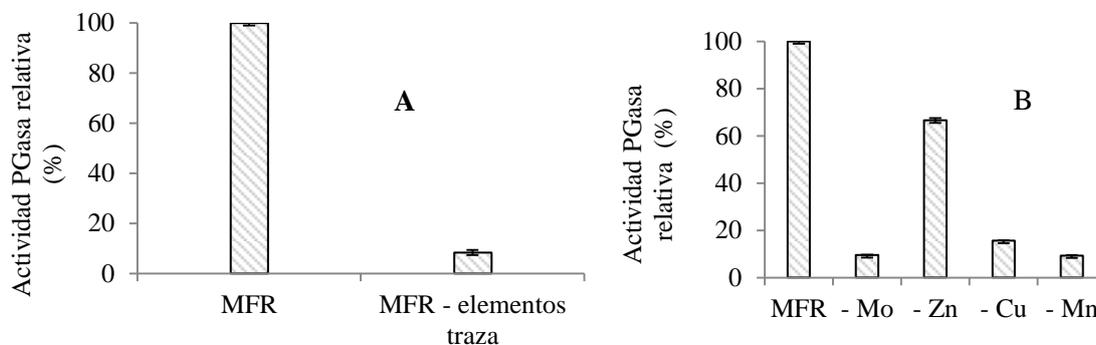
Moyo y col. (2003) determinaron que los efectos de la temperatura y el pH fueron los factores más significativos en la producción de enzimas con actividad pectinolítica de *Kluyveromyces wickerhamii*. Las condiciones óptimas estimadas fueron pH 5,0 y temperatura a 32°C. Según informó Tari y col. (2008), en general, las PGasas fúngicas presentan su mayor actividad a pHs ácidos, en el rango de 3,5 – 5,0. Martos y col. (2009) reportaron un valor de pH óptimo de 4,1 para la producción de PGasa por *A. niger*. Rehman y col. (2012) obtuvieron valores de pH y temperatura óptimos para la enzima poligalacturonasa por *B. licheniformis* KIBGE IB-21 de 7,0 y 37°C respectivamente. Siddiqui y col (2012) informaron valores de pH y temperatura óptimos para la enzima poligalacturonasa por *Rhizomucor pusillus* de 5 y 55°C respectivamente. Ray (2014) informó valores de pH óptimos entre 4 y 7; y temperatura óptima de 27°C para

la enzima poligalacturonasa por *Saccharomyces cerevisiae*. Otros autores informaron que la temperatura de fermentación ejerció un efecto significativo sobre la producción de PGasa por *Bacillus subtilis*, obteniéndose elevados rendimientos entre 30-35°C (Uzuner y Cekmecelioglu, 2015).

### II.3.2. Efecto de los componentes nutricionales en la producción de PGasa por *W. anomalus*

- Metodología de un factor por vez
- Efecto de los elementos traza sobre la expresión de PGasa

La Figura II.7 muestra la producción de PGasa por *W. anomalus* en el medio FR sin la adición de elementos traza (A) y omitiendo la adición de un elemento a la vez (B). En estas figuras, los resultados se presentan como porcentaje del valor alcanzado con el medio FR ( $19,57 \pm 0,55$  UE/mL) y este valor corresponde al 100% de la actividad de la enzima.



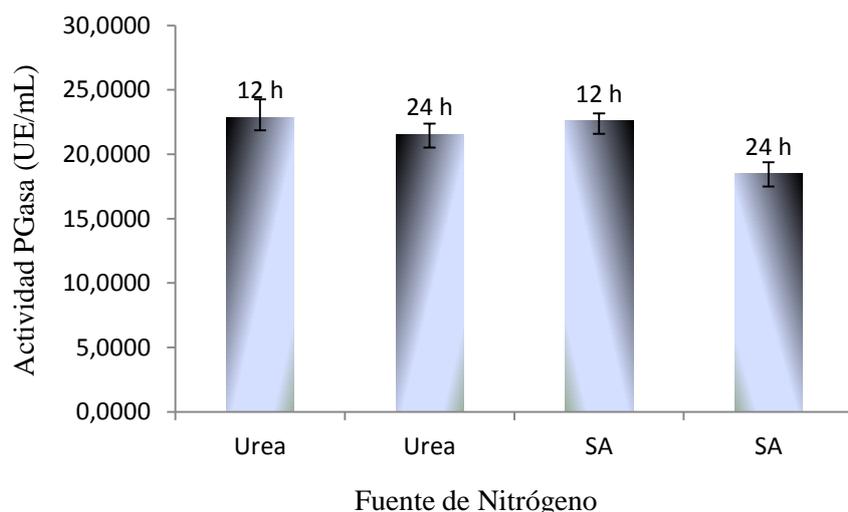
**Figura II.7:** Efecto de omisión de los elementos trazas (A), y efecto de omisión de un elemento por vez (B), en el medio FR, sobre la producción de PGasa por *W. anomalus*.

Como se observa en la Figura II.7A, la ausencia de la solución de elementos traza en el medio de FR tuvo un efecto represivo sobre la síntesis de la enzima, siendo el nivel de significación menor a 0,05 % para el 95 % de nivel de confianza, observándose una disminución del 93% respecto a los valores obtenidos en el medio FR completo.

Para determinar cuál o cuáles de los elementos traza fueron responsables de la disminución en la producción de PGasa, se realizó una serie de cultivos en los que al medio FR le fue extraído alternativamente cada uno de ellos. En la Figura II.7B se muestran los valores de actividad PGasa de los sobrenadantes de los cultivos de *W. anomalus*, obtenidos a las 16 h, en ausencia de los diferentes elementos traza y se comparan con los valores obtenidos en el medio FR completo. La ausencia de  $Mn^{+2}$ ,  $Mo^{+2}$  y  $Cu^{+2}$  y disminuyeron en un 93,7, 93,5 y 81,4%, respectivamente la producción de PGasa respecto al medio FR completo. El efecto represor fue menor en ausencia de  $Zn^{+2}$ , con una disminución el 54,8 %. Esto demuestra que algunos elementos trazas son necesarios para una buena producción de PGasa de *W. anomalus*. Cavalitto y Mignone (2007) estudiaron el efecto de Ca, Mg, Mo, I, B, Co, Mn, Zn, Fe, Cu y  $K_2HPO_4$ , sobre la producción de protopectinasa por *G. klebahnii*, un microorganismo similar a la levadura, y concluyeron que solo Fe tuvo un efecto positivo en la producción de enzimas.

- Selección de la fuente de nitrógeno

En la Figura II.8 se presentan los valores de actividad PGasa por *W. anomalus* obtenidos a las 12 y 24 h de cultivo en el medio de FR, al utilizar sulfato de amonio o urea como fuentes de nitrógeno.



**Figura II.8:** Producción de PGasa utilizando fuentes sencillas de nitrógeno. SA: sulfato de amonio.

Según el análisis de varianza, no se observaron diferencias significativas en la síntesis de PGasa con urea (12 y 24 h) o sulfato de amonio (12 h) como fuente de nitrógeno, siendo el nivel de significación superior al 0,05 % para el 95 % de nivel de confianza (Fig. 8). Sin embargo, se observó una disminución en los valores de PGasa luego de 24 h de cultivo, en el medio que contenía sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

El pH se mantuvo en valores cercanos a 4,0 en el transcurso del proceso fermentativo al utilizar urea como FN, a diferencia de lo observado en el medio que contenía sulfato de amonio, en el cual el pH disminuyó de un valor de 5,0 al inicio de la fermentación hasta 2,6 luego de 24 h.

*W. anomalus* es un microorganismo ureasa +, de manera que la urea es hidrolizada en forma periplasmática por esta enzima, liberando amoníaco y dióxido de carbono. Mientras haya FCE en el medio, el  $NH_3$  es

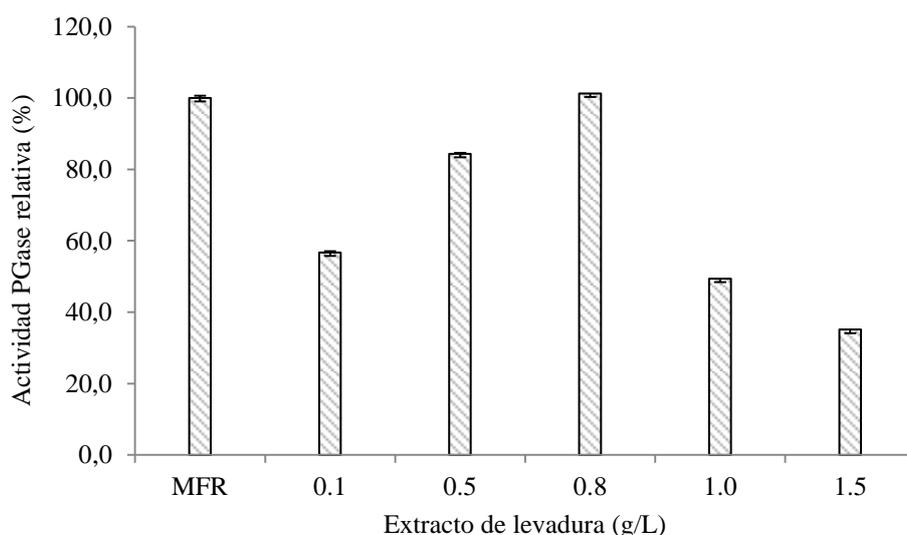
asimilado a la biomasa y por lo tanto el pH se mantiene a un valor constante (Cavalitto, 2003). Con sulfato de amonio como FN, es sabido que el consumo de amonio por parte del microorganismo, implica el incremento equivalente en la concentración de protones en el medio de cultivo, con el consiguiente descenso continuo en el pH, resultado que efectivamente se observó ya que el mismo alcanzó valores de 2,6.

De estudios previos se determinó que PGasa de *W. anomalus* no es estable a estos bajos valores de pH y a ello se podría atribuir los menores títulos obtenidos en la actividad PGasa en el medio de cultivo con sulfato de amonio como FN luego de 24 h de cultivo (Martos y col, 2014).

Si bien el uso de una sal de amonio en el medio de cultivo simplifica el proceso de esterilización (puede hacerse en autoclave conjuntamente con el resto del medio), el uso de sulfato de amonio como FN fue descartado en las experiencias posteriores, teniendo en cuenta la potencial pérdida de actividad enzimática por efecto del pH. Considerando que al utilizar urea como FN, el pH del medio permaneció prácticamente constante, se decidió utilizar esta FN para los estudios posteriores.

- *Efecto del extracto de levadura*

La Figura II.9 muestra la producción de PGasa en el medio de FR con diferentes concentraciones de extracto de levadura (EL) pero omitiendo la adición de soluciones de aminoácidos y vitaminas.



**Figura II.9:** Efecto del extracto de levadura sobre la producción de PGasa por *W. anomalus*.

En la Figura II.9 se observa un incremento en los valores de producción de PGasa con el aumento en las concentraciones del extracto de levadura, hasta un nivel máximo ~0,8 g/L, por encima de esta concentración, la síntesis de enzimas disminuyó.

La disminución observada a valores superiores de EL podría deberse a que dicho nutriente tiene vitaminas esenciales, minerales y aminoácidos que son útiles para el crecimiento de la levadura y la producción de enzimas, sin embargo, a altas concentraciones otros componentes podrían inhibir la producción de la enzima. Según informaron Ertola & Hours (1998), el efecto inhibitorio ejercido por el extracto de levadura sobre la

formación de diversos productos estuvo relacionado principalmente con la producción de enzimas tales como polifenoloxidasa, glucoamilasa y alfa-amilasa. La producción de PGasa de *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 aumentó con un aumento en la concentración de EL y la producción máxima se logró cuando se incorporó un 0,3% al medio (Rehman y col., 2012).

- **Diseño experimental de Plackett-Burman**

En la Tabla II.9 se presenta la matriz del diseño PB y los resultados obtenidos al estudiar el efecto de las diferentes variables (pectina, extracto de levadura, presencia/ausencia de microelementos, Fe<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> y PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub>) sobre la producción de PGasa por *W. anomalous*. En la Tabla 10 se presenta el análisis de varianza correspondiente y en la Figura II.10 el gráfico de Pareto.

**Tabla II.9:** Matriz experimental del diseño Plackett-Burman y la actividad PGasa obtenida.

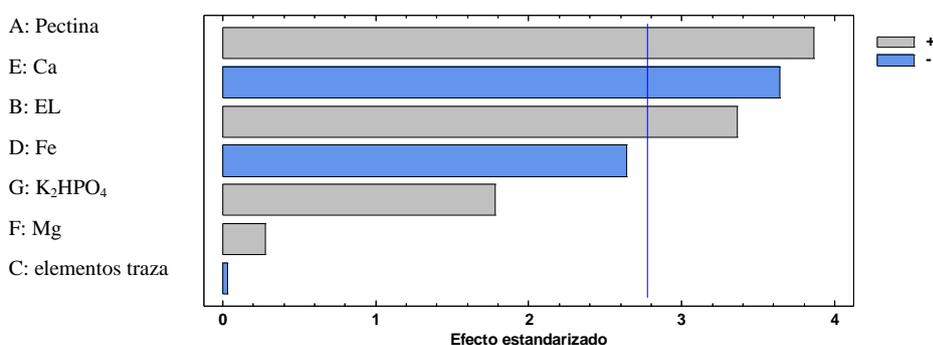
Exp. N°	Factores							PGasa <sup>(a)</sup> (UE/mL)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	20,447
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	20,839
3	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	6,616
4	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	17,184
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	16,098
6	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	18,440
7	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	20,632
8	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	11,921
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	14,942
10	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	13,899
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	19,540
12	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	9,658

Pectina (A), extracto de levadura (B), elementos traza (C), Fe<sup>+2</sup> (D), Ca<sup>+2</sup> (E), Mg<sup>+2</sup> (F), PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> (G) R<sup>2</sup>=93,4%. <sup>(a)</sup> Media de tres valores, desviación estándar dentro del 10 %.

**Tabla II.10:** Análisis de varianza para la producción de PGasa por *W. anomalus* usando diseño Plackett-Burman.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	p-Valor
A: Pectina	65,2494	1	65,2494	14,94	0,0181
B: EL	49,4264	1	49,4264	11,32	0,0282
C: elementos traza	0,004107	1	0,004107	0	0,977
D: Fe	30,4518	1	30,4518	6,97	0,0576
E: Ca	57,9393	1	57,9393	13,26	0,0219
F: Mg	0,345441	1	0,345441	0,08	0,7925
G: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13,8417	1	13,8417	3,17	0,1497
Error total	17,4727	4	4,36817		
Total (corr.)	234,731	11			

La Tabla de análisis de varianza (Tabla de ANOVA - Tabla II.10) muestra que la pectina, el extracto de levadura y el Ca<sup>+2</sup>, influyeron significativamente en la producción de PGasa, siendo el nivel de significación superior al 0,05 % para el 95 % de nivel de confianza. El R<sup>2</sup> estadístico indica que el modelo se ajustó en un 93,4 % de la variabilidad de PGasa, lo que indica un buen ajuste a los datos experimentales.



**Figura II.10:** Diagrama de Pareto para la producción de PGasa por *W. anomalus*.

El diagrama de Pareto (Fig. II.10) indica que la pectina y el extracto de levadura influyeron positivamente sobre la producción de PGasa. El Ca<sup>+2</sup> tuvo una influencia negativa, lo que significa que una reducción en la concentración de ésta sal en el medio de cultivo mejorará la síntesis de enzimas. En presencia de extracto de levadura, la influencia de los elementos traza no fue significativa, dado que también es una fuente mineral (Rehman y col., 2012).

El efecto de las sales en la producción de enzimas ha sido objeto de estudio de diferentes publicaciones. Cheng y col. (2012) evaluaron el efecto de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$  y  $\text{NaCl}$  sobre la producción de quitosanasa por *S. albus* YT2 e informaron que solo  $\text{MgSO}_4$  tuvo un efecto significativo. Mahesh y col. (2014) determinaron que  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{CuSO}_4$  eran responsables de mejorar la producción de una endo-PGasa por *A. niger* MTCC 3323;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mostró menos efecto y los factores restantes como  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  no mostraron un efecto significativo. Según Paudel y col. (2015), la producción de PGasa por *Bacillus sp* HD2 disminuyó al aumentar la concentración de Ca en el medio de cultivo.

En base al diseño PB se han podido identificar los componentes que influyeron tanto positiva como negativamente sobre la producción de PGasa por *W. anomalus*. Para aumentar la producción será necesario establecer las concentraciones óptimas de los nutrientes que presentaron efectos positivos, mediante la MSR y mantener todas las variables no significativas en su nivel más bajo (-1). De esta manera, el medio de fermentación que se utilizó para la etapa siguiente de optimización se resume en la Tabla II.11, en el cuál se omitió la adición de los elementos trazas, vitaminas y aminoácidos del medio FR original y los demás factores se mantuvieron en sus valores basales.

**Tabla II.11:** Medio de fermentación para la etapa de optimización

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	10
Pectina	2,5 - 10
Extracto de levadura	0,1 - 1,5
$\text{Mg}^{+2}$	0,25
$\text{Ca}^{+2}$	0,05
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5
Urea	1,4

- **Metodología de Superficie de respuesta: Diseño de Doehlert**

De los tres factores que influyeron significativa y positivamente en la producción de PGasa, según el diseño PB, la pectina y el extracto de levadura se optimizaron utilizando la MSR, mediante el diseño experimental de Doehlert.

Se utilizó para el presente estudio el medio de fermentación descrito en la Tabla II.11.

La concentración de pectina y extracto de levadura se varió según el diseño experimental planteado (Tabla II.7). La matriz del diseño de Doehlert y los resultados de la actividad enzimática obtenidos en cada experimento se muestran en la Tabla II.12. Los valores de los coeficientes lineales, cuadráticos e interacciones y su nivel de significancia (calculados por ANOVA) se presentan en la Tabla II.13.

**Tabla II.12:** Valores codificados y reales, y actividades PGasa obtenidos del diseño Doehlert.

Exp. N°	Valores Codificados		Valores reales (g/L)		Actividad PGasa <sup>(a)</sup> (UE/mL)
	EL	Pectina	EL	Pectina	
1	1	0	1,5	6,25	9,739
2	0,5	-0,866	1,15	10	13,735
3	-0,5	-0,866	0,45	10	10,129
4	-1	0	0,1	6,25	14,813
5	-0,5	0,866	0,45	2,5	11,352
6	0,5	0,866	1,15	2,5	11,573
7	0	0	0,8	6,25	22,318
8	0	0	0,8	6,25	22,527
9	0	0	0,8	6,25	22,641

<sup>(a)</sup> Media de tres valores, desviación estándar dentro del 10 %. EL: extracto de levadura.

**Tabla II.13:** Coeficientes y p-valores calculados por ANOVA, de acuerdo con el diseño de Doehlert.

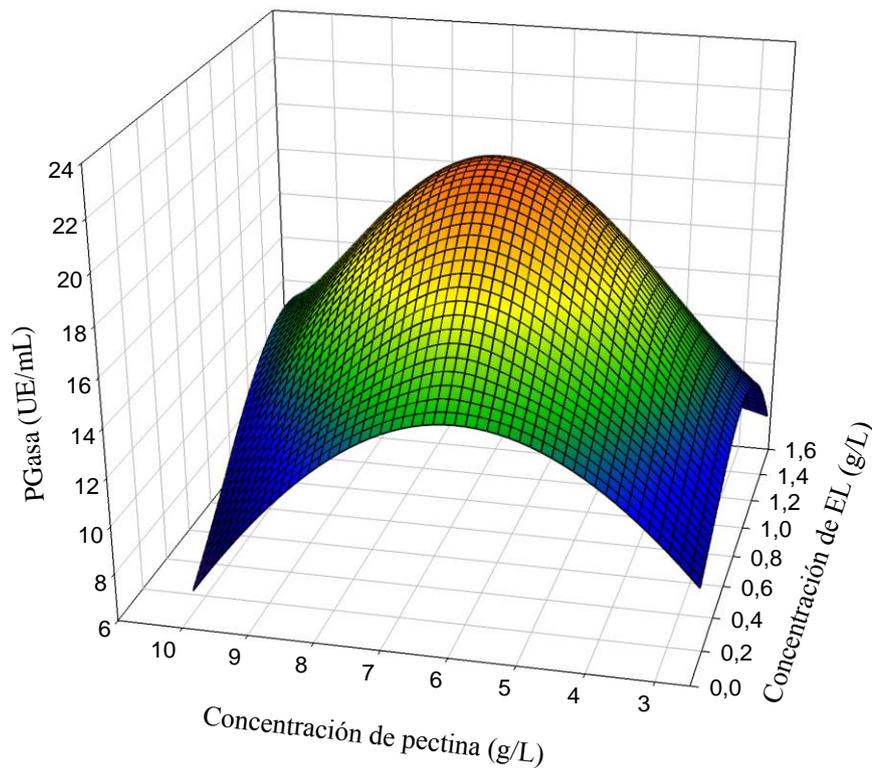
	Coeficiente	p-valor
Constante	-16,20	0,00040
EL	29,97	0,00000
Pectina	9,08	0,00000
EL <sup>2</sup>	-17,86	0,00260
EL . pectina	-0,44	0,00000
Pectina <sup>2</sup>	-0,72	0,00000

R<sup>2</sup>=0.99

Los datos de la Tabla II.12 se convirtieron en una ecuación polinomial de segundo orden (ec.4). La producción de PGasa puede ser predicha por la ecuación de regresión que se presenta a continuación:

$$PGasa \left( \frac{UE}{mL} \right) = -16.2 + 29.97 * EL + 9.08 * Pectina - 17.86 * EL^2 - 0.44 * EL * Pectina - 0.72 * Pectina^2 \text{ (ec. II. 4)}$$

La Figura II.11 muestra la superficie de respuesta para la producción de PGasa después de 16 h de cultivo, en función de las dos variables independientes (EL y pectina).



**Figura II.11:** Superficie de respuesta mostrando el efecto de la concentración de extracto de levadura (EL) y pectina sobre la productividad PGasa por *W. anomalous*.

Se observó un incremento en la producción de PGasa cuando la pectina aumentó hasta 6 g/L y el EL hasta 0.8 g/L; por encima de estos valores, la actividad de la enzima disminuyó (Fig. II.11).

La ecuación polinomial de segundo orden (ec.III.4) determinó un valor máximo de PGasa de  $23,54 \pm 0,43$  UE/mL, en el medio que contiene 6 g/L de pectina cítrica y 0,75 g/L de EL. Una baja concentración inicial de pectina da como resultado una baja producción de enzimas, ya que la PGasa de *W. anomalous* es una enzima inducible (Martos y col., 2013a). La reducción en la producción de PGasa observada a altas concentraciones de pectina podría atribuirse al aumento en la viscosidad del medio de cultivo, lo que podría haber causado problemas para mantener la homogeneidad y en la transferencia de oxígeno (Rehman y col., 2012).

El EL contiene vitaminas esenciales, minerales y aminoácidos, que son necesario para el crecimiento de microorganismos y la producción de enzimas (Rehman y col., 2012; Paudel y col., 2015). Sin embargo, los menores títulos de actividad PGasa observados al utilizar mayores concentraciones de EL, hacen suponer que habría algún componente con efectos deletéreos sobre la producción enzimática. El extracto de levadura contiene una importante cantidad de sustancias complejantes y es posible que su utilización en el medio de cultivo disminuya la disponibilidad de ciertos metales indispensables para la expresión de la enzima (Ferreira y col., 2002).

Efectos no lineales análogos reportaron Paudel y col. (2015) con *Bacillus* HD2 y Uzuner y Cekmecelioglu (2015) con *Bacillus subtilis* sobre la producción de PGasa. Resultados similares se informó para la producción de fitasa por *P. anomala* (Kaur y Satyanarayana, 2005).

La composición final del medio de Fermentación Optimizado (medio FO) se muestra en la Tabla II.14.

**Tabla II.14:** Composición del Medio de Fermentación Optimizado.

Componente	(g/L)
Glucosa	10
Pectina	6
Urea	1,4
EL	0,75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
CaCl <sub>2</sub>	0,05
MgSO <sub>4</sub>	0,25

### II.3.3. Validación del modelo experimental

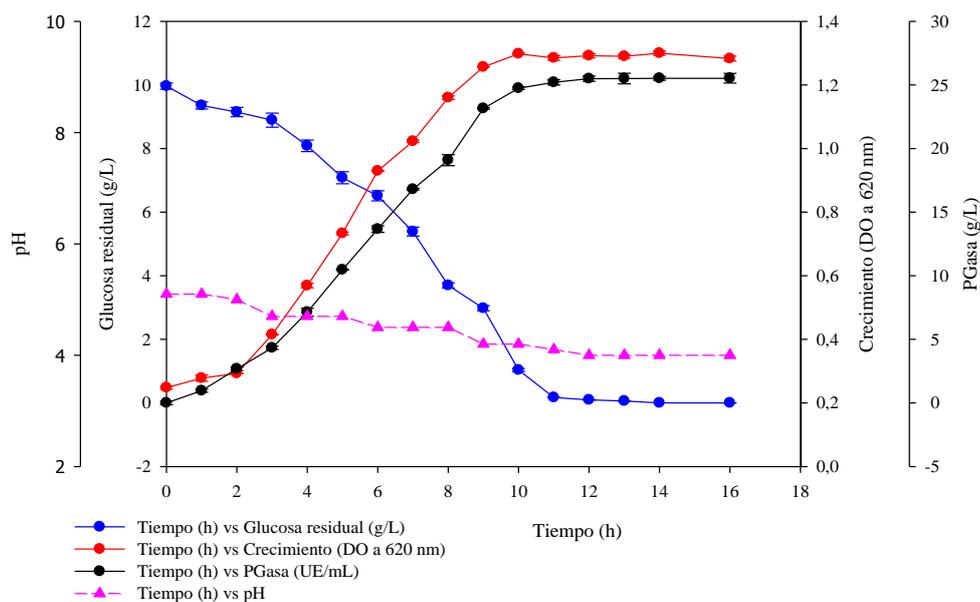
La producción de PGasa por *W. anómalus* alcanzada a escala frascos agitados, en el medio y las condiciones de cultivo optimizadas después de 16 h de cultivo, predicho por la MSR fue de  $23,2 \pm 0,78$  UE/mL. El análisis de varianza no reveló diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la actividad enzimática entre los valores predichos y experimentales, lo que demuestra la validez del modelo utilizado.

### II.3.4. Cultivos a escala biorreactor

- **Cultivo batch**

En la Figura II.12 se presentan los perfiles de crecimiento microbiano, concentración de glucosa residual, los valores de actividad PGasa y pH durante el cultivo de *W. anómalus* en el biorreactor, operado en sistema tipo batch.

El microorganismo creció en fase exponencial hasta las 10 h de cultivo, al mismo tiempo en que se consumió la totalidad de la FCE, alcanzando una concentración final de biomasa máxima de 3,03 g/L, con un rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) de 0,30 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> (g de peso celular seco por gramo de glucosa consumida). De la curva de crecimiento microbiano se determinó un valor de velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_m$ ) de 0,164 h<sup>-1</sup> ( $R^2$ : 0,920). La síntesis de PGasa parece estar asociada con el crecimiento de la levadura, alcanzando  $25,52 \pm 0,38$  UE/mL al final del cultivo. Se inició el cultivo con un pH igual a 5,1 (optimizado anteriormente), en el transcurso del cultivo descendió levemente y se mantuvo en valores cercanos a 4.0 en el curso del proceso.



**Figura II.12:** Evolución de un cultivo típico de *W. anomalus* y su producción de PGasa en el medio optimizado.

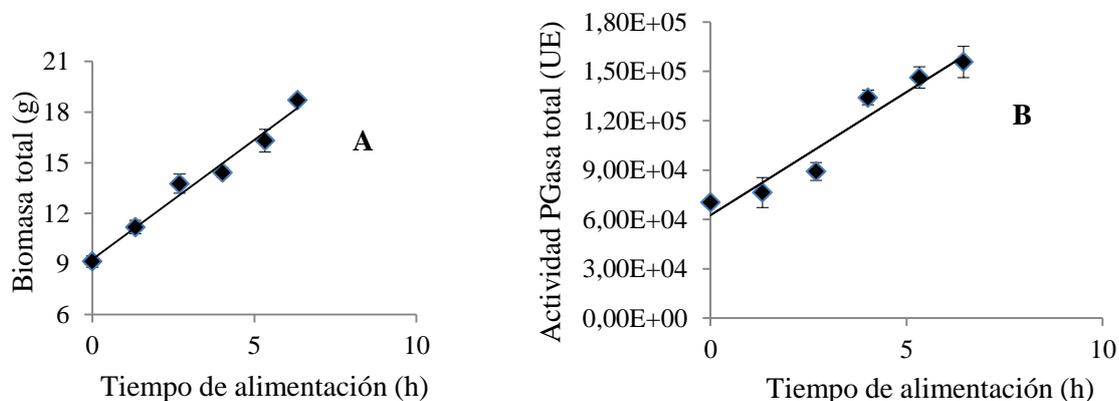
La endo-PGasa producida por esta cepa de levadura salvaje fue superior a la informada por otros autores (utilizando la misma técnica de cuantificación para la actividad de la PGasa). Contreras Esquivel y col. (1999) informaron que *A. kawachii* produjo 65 mU/mL de una PPasa ácida, que se asoció con el crecimiento de hongos. Se informaron valores de 10 a 11 UE/mL para la producción de una endo-PGasa con actividad liberadora de pectina por *Geotrichum klebanii* ATCC 42397 en un medio definido basado en urea, glucosa, sales minerales y vitaminas (Cavalitto y col., 2000). Tari y col. (2007) informa que *A. sojae* ATCC 20235 cultivado en un medio líquido con glucosa, peptona, sales y maltodextrina, produjo una actividad de PGasa máxima de 13,5 UE/mL. Rojas y col. (2011) informaron que una *S. cerevisiae* recombinante que expresaba la PPasa ácida de *A. kawachii*, produjo en un cultivo discontinuo 3 UE/mL de la enzima después de la inducción con galactosa.

- **Cultivo batch alimentado**

Con el propósito de aumentar la producción de PGasa por *W. anomalus*, se estudió un sistema batch alimentado (BA). Este sistema de cultivo tiene la ventaja de permitir el control de  $\mu$  y el aumento en el crecimiento de biomasa, características importantes en la expresión de PGasa, considerando que la misma está directamente asociada al crecimiento.

Para el diseño del sistema BA, se utilizaron los siguientes datos obtenidos del cultivo batch realizado en la etapa anterior:  $\mu_m = 0,164 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ ,  $Y_{x/s} = 0,3 \text{ (g}_x\text{/g}_s\text{)}$ ,  $X_0$  (biomasa inicio del BA) = 3 g/L,  $V_0$  (volumen inicial del BA) = 3 L. Los valores de  $V_f$  (volumen final del BA),  $X_f$  (biomasa final del BA) y  $\mu_0$ , fueron elegidos arbitrariamente para el experimento:  $X_f = 6 \text{ g}_x\text{/L}$ ,  $V_f = 3,5 \text{ L}$  y  $\mu_0 = 0,160 \text{ h}^{-1} (< \mu_m)$ . Con estos datos y

utilizando las ecuaciones de diseño del cultivo BA (ec. 1 y ec. 2), se determinó la concentración de glucosa en el reservorio ( $S_R$ ), que resultó un valor de 80 g/L y el valor del caudal de alimentación (F) de 60 mL/h. En las Figuras II.13A y II.13B se presentan los resultados obtenidos respecto de la cantidad total de biomasa formada y la actividad PGasa total en función del tiempo de alimentación, respectivamente.



**Figura II.13:** biomasa total (A) y producción de PGasa total (B) durante el cultivo de *W. anomalous* en sistema tipo batch alimentado. Medio de FO. Condiciones de operación: 500 rpm y 30 °C.

En la Figura II.13 se observó una velocidad de formación de biomasa constante (X.V), y la concentración de glucosa medida en el medio de cultivo, fue despreciable durante todo el proceso, lo cual es acorde con el comportamiento típico de una sistema de cultivo batch alimentado (Pirt, 1975).

La actividad de PGasa aumentó con el tiempo de alimentación, alcanzando al final del cultivo un valor de  $48,93 \pm 0,38$  UE/mL, lo que corresponde a una productividad de 3,19 UE/mL.h. Esta actividad enzimática fue mayor que la obtenida en el cultivo batch.

El motivo de la mejora de la productividad de la PGasa fue la mayor concentración de biomasa lograda en este sistema de cultivo, considerando que la PGasa está asociada al crecimiento (Martos y col., 2014, Cavalitto y col., 2000). Estos resultados están de acuerdo con los reportados por otros autores (Gummadi y Kumar, 2008; Rojas y col., 2011).

## II.4. CONCLUSIONES

Se optimizaron las condiciones de cultivo (temperatura, pH y velocidad de agitación), en un medio de fermentación de referencia compuesto por glucosa, pectina cítrica comercial,  $(NH_4)_2SO_4$ , vitaminas, aminoácidos,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$  y elementos traza ( $Mo^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Mn^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ ), a escala frascos agitados, durante 16 h, para la producción de PGasa por *W. anomalous*. Luego de aplicar un diseño  $2^3$  y una superficie de respuesta, los mayores títulos para la producción de la enzima PGasa se obtuvieron a 30°C y pH de 5,1, la influencia de la velocidad de agitación fue no significativa.

Se estudió la influencia de la composición del cultivo sobre la producción de PGasa, en busca de un medio económico y de simple preparación. Los elementos traza resultaron indispensables para la producción de PGasa por *W. anomalus*. La ausencia de  $\text{Mo}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  reprimieron severamente la producción de la enzima, mientras que con  $\text{Zn}^{+2}$  el efecto represor fue menor.

La fermentación utilizando urea como FN, a las 12 y 24 h, dio valores de PGasa similares a los obtenidos al utilizar sulfato de amonio como FN (a las 12 h).

La utilización de extracto de levadura en reemplazo de las vitaminas, aminoácidos y elementos traza del medio original, resultó apropiado para el diseño de un medio de cultivo más simple de preparar, apto para su utilización a mayor escala.

Se logró diseñar un medio de cultivo de fácil preparación para la producción de PGasa a partir de *W. anomalus*, mediante la aplicación de un diseño PB y luego, una superficie de respuesta. El medio de fermentación optimizado incluyó glucosa, pectina, urea, extracto de levadura,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}$ . Las soluciones de aminoácidos, vitaminas y elementos trazas se eliminaron del medio original.

En este medio optimizado, la síntesis de PGasa alcanzó valores ~25 UE/mL, después de 10 h de cultivo, mediante cultivo batch y en un biorreactor a escala de laboratorio. En el sistema batch alimentado, la actividad de PGasa aumentó con el tiempo de alimentación, alcanzando al final del cultivo un valor de ~49 UE/mL.

Por lo tanto, el cultivo batch alimentado, utilizando el medio de fermentación optimizado podría ser una alternativa adecuada para la producción industrial de PGasa por *W. anomalus*, enzima de interés en tecnología de los alimentos.

### **CAPITULO III: USO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA POLIGALACTURONASA POR *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS***

#### **RESUMEN**

El objetivo de la presente etapa del trabajo fue evaluar el uso de diferentes residuos agroindustriales, de la provincia de Misiones, en el medio de cultivo, como inductores para la producción de la enzima PGasa por *W. anomalus*, mediante el uso de diseños estadísticos.

Los cultivos se llevaron a cabo en frascos Erlenmeyers conteniendo un medio de cultivo compuesto por glucosa (fuente de carbono y energía), residuos agroindustriales (inductores), urea,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , extracto de levadura, vitaminas y microelementos, pH 5,0. Los mismos se incubaron a 30 °C, con agitación (180 rpm), hasta 16 h. Finalizada la fermentación el cultivo se centrifugó y el sobrenadante, libre de células, denominado extracto enzimático (EE), fue conservado a - 18 °C, hasta su utilización. Se evaluó el uso de 8 (ocho) desechos agroindustriales crudos (residuos de cáscara de naranja, limón, banana, pomelo, maracuyá, ananá y mamón) como inductores de la producción de la enzima (concentración en el medio del 4% p/p), por el método de un factor por vez. Posteriormente se aplicó el diseño experimental de Plackett-Burman, para evaluar la influencia del residuo seleccionado, y de otros factores nutricionales como extracto de levadura,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ , vitaminas y microelementos, sobre la producción de la enzima. Los cultivos realizados con pectina de citrus como inductor fueron considerados como control. Posteriormente se aplicó la metodología de superficie de respuesta, utilizando el diseño experimental propuesto por Doehlert para encontrar las condiciones óptimas de producción de la enzima PGasa por *W. anomalus*. El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo con el programa estadístico Statgraphics Centurión XV.

El residuo de limón resultó ser el mejor inductor para la producción de PGasa, observándose una actividad relativa aún mayor a la obtenida con el control, 105,09% (21,74 UE/mL). El análisis de PB determinó que el  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , el Mg y el residuo de limón, influyeron significativamente en la producción de PGasa ( $p < 0,05$ ). El efecto de las otras variables (yeast extract,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ , amino acid and trace element solution), fue no significativa en medios conteniendo el residuo de limón. La influencia del  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y Mg fue positiva, en el rango de concentración evaluado, mientras que el residuo de limón lo hizo de manera negativa.

Se empleó un método de superficie de respuesta para encontrar el nivel óptimo de las variables residuo de limón y tiempo de fermentación, para la producción de PGasa por *W. anomalus*, mediante el diseño experimental Doehlert. Los datos revelaron que ambas variables exhibieron un efecto significativo sobre la producción de PGasa, en el rango estudiado, así como también la interacción entre ellos fue significativa ( $p < 0,05$ ). El residuo de limón y el tiempo de fermentación mostraron efectos lineales y cuadráticos significativos, sobre la producción de PGasa. La síntesis de la enzima aumentó cuando la concentración del residuo de limón disminuyó del 10% al 2% (p/v) y con el tiempo de fermentación de 3 h a 12 h. La ecuación polinomial de segundo orden determinó un valor máximo de PGasa de  $30,06 \pm 1,27$  UE/mL, en el medio que

contiene 2% (p/v) de residuo de limón a las 12 h de cultivo, este valor fue mayor al obtenido en medio de FR.

El medio de fermentación optimizado (medio FO) quedó compuesto por glucosa, residuo de limón, urea,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , vitaminas. Al estimar los costos del medio de cultivo, se obtuvo que el medio FO costaría US\$ 0,6/L, este valor es más bajo que el del medio FR (US\$ 1,6/L). Se obtuvo una producción enzimática de  $31,28 \pm 0,93$  UE/mL a las 12 h, en el medio FO, durante el cultivo batch, a escala biorreactor,

En la presente etapa del trabajo se logró diseñar un medio de cultivo de bajo costo, usando un residuo agroindustrial de la industria cítrica como es el residuo de limón, en el cual se obtuvo una buena producción de la enzima PGasa por *W. anomalus*, apropiado para su futura producción a mayor escala.

---

**Palabras claves:** poligalacturonasa, residuos agroindustriales, inductor, producción enzimática.

### III.1. INTRODUCCIÓN

Aunque se empleen las más sofisticadas tecnologías, los procesos de industrialización de los productos agroindustriales, generan residuos (Bhushan . 2008; Vendruscolo y col. 2008). En los últimos años, se ha observado que existe un creciente interés en todo el mundo por la utilización eficiente de los desechos agroindustriales, los que podrían ser utilizados para la producción de productos de valor añadido, como puede ser la producción de enzimas microbianas (Botella y col. 2007; Shankar and Mulimani 2007).

La pared celular de las células vegetales está formada por dos capas: la pared secundaria más interna compuesta básicamente de fibras de celulosa y hemicelulosa y la pared primaria, más externa, formada por las mismas fibras embebidas en sustancias pécticas y algo de proteínas. Las paredes primarias de dos células contiguas se hallan unidas por la laminilla media, la cual está constituida casi exclusivamente por sustancias pépticas. El contenido de las sustancias pépticas varía según el origen botánico del vegetal, la industria tradicionalmente utiliza pulpa de manzana y cascaras de cítricos, principalmente de limón y naranja, como fuente de pectina. Sin embargo, actualmente se están estudiando otras alternativas no convencionales como fuente de pectina (maracuyá, melocotón, banano, mango guayaba, etc.).

Las enzimas que hidrolizan sustancias pépticas se conocen como enzimas pépticas o pectinasas. Estas enzimas son producidas por microorganismos, tanto por bacterias, como por hongos filamentosos y levaduras en forma constitutiva o inducible por pectina o sustancias pépticas relacionadas (Da Silva et al. 2005) (Happi Emaga y col. 2008; Yeoh y col. 2008; Kumar and Chauhan 2010).

Teniendo en cuenta que el costo de los medios de fermentación es uno de los factores determinantes en la producción de enzimas microbianas, es importante formular medios de cultivos con el menor costo posible y que al mismo tiempo provean los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento adecuado del microorganismo y la producción enzimática (Nighojkar y col. 2006).

Los residuos agroindustriales de ciertas frutas con alto contenido de pectina pueden ser utilizados como sustratos e inductores para la producción de enzimas pépticas, lo que permitiría minimizar los problemas ambientales y aprovechar las grandes cantidades de biomasa para elaborar productos con mayor valor agregado, disminuyendo los costos del proceso (Ahmed and Mostafa 2013; Mamma and Christakopoulos 2013; G. E. Ortiz y col. 2015).

Entre los residuos producidos en la provincia de Misiones se encuentran los generados por las industrias alimenticias: fábricas de mermeladas, jugos, dulces, etc. donde se emplean grandes cantidades y variedades de frutas. Estos residuos podrían ser utilizados en el medio de cultivo, como inductores para la producción de enzimas pépticas, en el medio de cultivo de interés biotecnológico.

Una levadura, aislada de frutas cítricas en la Provincia de Misiones (Argentina) e identificada como *Wickerhamomyces anomalus*, es capaz de producir una PGasa extracelular, la cual es inducida por pectina o alguno de sus derivados (Martos y col. 2013a; Martos y col. 2013b). Esta enzima, a diferencia de otras PGasas, posee la capacidad de desintegrar tejidos de mandioca, produciendo la lisis celular, con la

consecuente liberación de los gránulos de almidón de su interior. Se trata de una tecnología innovadora, alternativa al método tradicional de extracción, proceso de interés en la Provincia de Misiones, Argentina.

La enzima PGasa es una enzima inducible por pectina o alguno de sus derivados por tal motivo estos compuestos deben estar presentes en el medio de cultivo para su producción por *W. anomalus* (Martos y col., 2014a),

El objetivo del presente trabajo fue utilizar residuos agroindustriales, ricos en pectina, como inductores de la producción de la enzima PGasa por *W. anomalus*, y que al mismo tiempo aporten otros componentes nutricionales necesarios para el crecimiento del microorganismo, a fin de obtener un medio de cultivo económico y simple de preparar para su posterior escalado.

## **III.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***III.2.1. Microorganismo***

*Microorganismo: Wickerhamomyces anomalus*, aislado de cáscaras de frutas cítricas en la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (UNaM) (Martos y col., 2013a).

### ***III.2.2. Medios de cultivos***

*Medio de Conservación (YM) (g/L):* extracto de levadura (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA), 5; triptona (Difco-Becton Dickinson & Co., Sparks, MD, USA), 5; glucosa (Britania, Buenos Aires, Argentina), 10; agar, 18; pH 5.

*Medio de fermentación y de referencia (medio FR) (g/L):* glucosa (Britania), 10; pectina (Parafarm, Buenos Aires, Argentina), 5; urea, 1,4;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1;  $\text{MgSO}_4$ , 0,5;  $\text{CaCl}_2$ , 0,1; solución de vitaminas (1000 ×), 1 mL/L; solución de aminoácidos (100 ×), 10 mL/L; solución de elementos traza (1000 ×), 1 mL/L; pH 5,0 (Cavalitto y col., 2000).

*Solución (1000 ×) de vitaminas (Sigma) (μg/L):* D-biotin, 2; calcium pantothenate, 400; pyridoxine, 400; thiamine, 400 (Tesis Martos, 2012).

*Solución (100 ×) de aminoácidos (Sigma) (mg/L):* histidina, 10; metionina, 20 y triptófano, 20.

*Solución de elementos traza 1000 × (μg/L):*  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 40;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ; 200;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 400;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 200;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 400.

Todos los componentes del medio se esterilizaron por separado, en autoclave 15 min a 121 °C, previo ajuste del pH a 5,0. La urea y las vitaminas se esterilizaron, por filtración, utilizando membranas de nitrato de celulosa de 0,22 μm de tamaño de poro (Sartorius Stedim Biotech, Alemania). Antes de su utilización, se mezclaron las cantidades correspondientes de cada una de las soluciones en forma aséptica.

### **III.2.3. Producción de la enzima PGasa por *W. anomalus* a escala frascos agitados**

Se inocularon frascos Erlenmeyers de 250 mL que contenían 45 mL del medio FR, con 5 mL de una suspensión de un cultivo joven de *W. anomalus* (24 h) en agua destilada estéril ( $DO_{620} = 0,96$ ). Los mismos se incubaron a 30 °C en una incubadora con agitación orbital (MRC, TOU-50N, 25 mm de excentricidad) a 150 rpm, pH 5,1, durante 16 h. Se realizaron 3 (tres) pasajes sucesivos (precultivos) de 5 mL a medios de cultivo fresco y se evaluó el crecimiento y la producción de la enzima en el 4to cultivo. Finalizada la etapa de fermentación, el cultivo se centrifugó, para remover las células de levaduras y el sobrenadante, denominado extracto enzimático (EE), se mantuvo a – 18 °C hasta su utilización como fuente de enzima extracelular (Martos y col., 2013a).

### **III.2.4. Caracterización de residuos agroindustriales**

A los efectos de disminuir el costo del medio de cultivo, y en consecuencia, la producción de la PGasa por *W. anomalus*, se evaluó la producción de la enzima en el medio FR, utilizando residuos agroindustriales como inductores, en reemplazo de pectina de citrus comercial.

Se utilizaron residuos proporcionados por industrias locales de la provincia de Misiones, Argentina (CTM Cooperativa Agroindustrial de Misiones, Cooperativa de Productores de Jardín América Ltda.) y residuos domésticos. Los residuos evaluados fueron las cáscaras de naranja, limón, banana, pomelo, mandarina, maracuyá, ananá y mamón. Estos residuos se secaron a 45 °C en un horno de secado por aire caliente (0,4 m / s), hasta peso constante, se molieron en un molinillo (Arcano, 24000 rpm, 460W), se hicieron pasar a través de un tamiz de 35 mesh para tener partículas de tamaño uniforme del material, y finalmente, se conservaron en recipientes libre de humedad, hasta el momento de ser utilizado (Ahmed and Mostafa 2013; Göğüş y col. 2015; E. Ortiz y col. 2015).

Los mismos se caracterizaron por determinación de su composición centesimal, donde los carbohidratos, proteínas, grasas, fibra dietaria, sales y contenido de cenizas se determinaron mediante técnicas AOAC (AOAC International, 1990). La pectina se determinó midiendo la cantidad de ácido galacturónico (AG) solubilizado, por el método del *m*-hidroxidifenilo y se informó como mg de AG solubilizados por mg de residuo húmedo (Melton y Smith, 2001; Vasco-Correa y Zapata Zapata, 2017).

### **III.2.5. Selección del residuo agroindustrial mediante la metodología de un factor por vez**

Se llevaron a cabo estudios preliminares para seleccionar los mejores residuos agroindustriales como inductores para la producción de la enzima PGasa, utilizando la metodología de un factor por vez. Este método permite evaluar la influencia de ese único nutriente sobre la expresión de la enzima ( Rehman y col., 2012, Hoa and Hung 2013; Embaby y col. 2014). Para ello, se realizaron una serie de cultivos de *W. anomalus* en el medio FR, que contenía 4% (p/v) de cada uno de los diferentes residuos agroindustriales evaluados, en reemplazo de pectina de citrus comercial.

Las fermentaciones se realizaron como se detalló anteriormente, y los valores de producción obtenidos en el medio FR con pectinas de citrus como inductor, se tomaron como control. Las experiencias se realizaron por triplicado y se tomaron para los cálculos los valores promedios.

### III.2.6. Diseños experimentales y análisis estadístico para la optimización del medio de cultivo

- **Diseño experimental de Plackett-Burman**

En la presente etapa, los cultivos se realizaron en el medio FR, pero sin el agregado de pectina cítrica comercial, la cual se reemplazó por el residuo seleccionado en la etapa anterior.

Se aplicó el Diseño experimental de Plackett-Burman (PB), para analizar el efecto de los factores nutricionales sobre la producción de PGasa por *W. anomalus* (Embaby y col. 2014; Ortíz y col. 2015). Los factores estudiados fueron: concentración del residuo seleccionado, extracto de levadura,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , aminoácidos y elementos traza. Estos factores se analizaron a dos niveles: -1 y +1, niveles bajo y alto, respectivamente. Los factores evaluados en el diseño PB y sus valores codificados y reales, se presentan en la Tabla III.1. La variable respuesta estudiada fue la actividad PGasa (UE/mL). Basado en el diseño de PB, se confeccionó una matriz con 12 experimentos.

**Tabla III.1:** Valores reales y codificados de los factores para diseño de Plackett-Burman

Factor	Código	Niveles del factor	
		(+1)	(-1)
Residuo % (p/v)	A	10	2
Extracto de levadura (g/L)	B	1,5	0
$\text{Ca}^{+2}$ (g/L)	C	0,1	0,05
$\text{Mg}^{+2}$ (g/L)	D	0,25	0,125
$\text{PO}_4\text{HK}_2$ (g/L)	E	0,5	0,25
$\text{Fe}^{+3}$ (g/L)	F	0,0001	0
Solución aminoácidos	G	1	0
Solución elementos traza	H	1	0

Las experiencias se realizaron en un orden aleatorio, con tres repeticiones y los resultados se presentan como valores medios (Díaz y col. 2005; Sharma and Satyanarayana 2006; Shabbiri y col. 2012; Brzozowski and Lewandoska 2014).

Los resultados se analizaron utilizando el software estadístico Statgraphics Centurión XV (Stat Graphics Centurión XV, 2009).

- **Superficie de respuesta: diseño de Doehlert**

Teniendo en cuenta las variables que resultaron significativas para la producción de PGasa, mediante el diseño PB, en la presente etapa se aplicó la metodología de superficie de respuesta, utilizando el diseño experimental propuesto por Doehlert para encontrar las condiciones óptimas de producción de la enzima PGasa por *W. anomalus* (Doehlert, 1970; Cavalitto & Mignone 2007; Butiuk y col. 2018).

En el diseño experimental seleccionado, el número de experiencias requeridas está dado por  $N = n \cdot 2 + n + n_0$ , donde  $n$  es el número de variables y  $n_0$  es el número de puntos centrales. Las repeticiones en el nivel central se realizan con objeto de validar el modelo a los datos experimentales y determinar el error experimental. Los valores reales de las variables independientes fueron codificados utilizando la siguiente función lineal:

$$X = Z \times \frac{\Delta X}{\Delta Z} + X_o$$

Siendo

$X$ : valor real del punto central.

$\Delta X$ : diferencia entre el valor más alto y el más bajo de los valores reales.

$\Delta Z$ : diferencia entre el valor más alto y el más bajo de los valores codificados.

Las curvas de superficie de respuesta se obtuvieron a través del programa estadístico Statgraphics Centurión XV, software para determinar los niveles óptimos de las variables para la producción máxima de la enzima PGasa por *W. anomalus*.

### **III.2.7 Validación de los modelos experimentales**

Para validar el modelo, se llevaron a cabo ensayos adicionales para la producción de PGasa por *W. anomalus* a escala frascos agitados, en el medio de fermentación optimizado (FO), previsto por la superficie de respuesta (Shabbiri y col., 2012; Uzuner y Cekmecelioglu, 2015). Los cultivos se realizaron en frascos Erlenmeyers de 500 mL conteniendo 90 mL del medio de producción optimizado, y se prosiguió según se explicó anteriormente.

### **III.2.8. Producción de la enzima PGasa por *W. anomalus* a escala biorreactor**

Se realizaron precultivos en frascos Erlenmeyer de 500 mL que contenían 90 mL del medio de fermentación optimizado (medio FO) y 10 mL de una suspensión en agua destilada del microorganismo ( $DO_{620} = 1,169$ ), proveniente de un cultivo joven (24 h) de *W. anomalus* en medio YM, a 30 °C, pH 5,1, a 150 rpm, durante 16 h. Estos cultivos se utilizaron como inóculo para la etapa de fermentación en el biorreactor.

La fermentación en cultivo batch se realizó en un biorreactor de 5 L (New Brunswick Scientific CO. INC.; Edison, N. J., U. S. A.; Modelo MA 107) que contenía 3 L del medio de FO, a 30 °C, pH 5,1, a 500 rpm, con aireación (2,82 L/min), hasta agotarse la FCE. Las muestras se recogieron en períodos de incubación de 1 h, se centrifugaron y los EE se usaron para determinar la glucosa residual y la actividad de la PGasa.

- **Determinaciones analíticas**

- *Medida de la actividad PGasa:*

Se ensayó midiendo los grupos reductores liberados a partir de una solución de ácido poligalacturónico 2 g/L (Sigma), en una solución tampón de acetato sódico/ácido acético (BAc: 0,2 M, pH 5,0) usando el método Somogy-Nelson. (Herbert y col. 1971; Cavalitto y col. 2000; Ferreyra y col. 2002).

- *Glucosa residual:*

Se utilizó el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (Glicemia, Wiener, Argentina).

### **III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### ***III.3.1. Caracterización de residuos agroindustriales***

La Tabla III.2 presenta los resultados de la caracterización de los residuos agroindustriales expresados en base seca de la muestra examinada.

**Tabla III.2:** Caracterización fisicoquímica de los residuos agroindustriales

Componentes (g % bs*)	Mamón	Ananá	Naranja	Mandarina	Limón	Banana	Maracuyá	Pomelo rosado
Proteína	6,3±0,16	6,9±0,11	8,2±0,15	9,87±0,12	4,56±0,14	7,49±0,03	3,97±0,15	2,93±0,13
Cenizas	12,0±0,04	5,5±0,05	3,9±0,03	4,21±0,09	9,03±0,01	16,95±0,01	6,14±0,01	3,05±0,01
Carbohidratos	45,7±0,03	34,2±0,01	51,2±0,03	91,20±0,02	26,62±0,06	43,49±0,03	21,14±0,03	91,41±0,02
Grasas	6,7±0,01	2,5±0,01	3,2±0,01	2,18±0,01	3,73±0,04	7,49±0,03	4,92±0,01	4,11±0,13
Sodio	288,4±0,01	68,7±0,04	45,4±0,05	66,85±0,04	21,59±0,01	468,57±0,02	291,88±1,27	37,72±1,06
Calcio	0,11±0,21	0,06±0,02	0,02±0,07	0,12±0,01	0,39±0,02	0,02±0,01	0,09±0,01	0,07±0,01
Fibra dietaria	83,9±0,05	152,5±0,11	107,3±0,01	59,11±0,02	168,42±0,18	70,25±0,01	215,12±0,03	73,90±0,05
AGA(mg <sub>AGA</sub> /mg <sub>residuo</sub> )	6,2±0,78	2,5±0,06	36,62±0,73	25,26±0,14	129,57±0,41	17,46±0,27	32,80±0,66	34,35±0,77

\*bs: base seca, AGA: ácido galacturónico, MIE: material insoluble en etanol.

El análisis fisicoquímico realizado a los residuos agroindustriales (Tabla III.2) mostró que el contenido de proteína fue mayor para el residuo de mandarina (~ 9,87%), seguido del de naranja (~8,12%) y el menor valor para el residuo de limón (~ 4,56%). Los residuos de pomelo y mandarina mostraron el mayor contenido de carbohidratos con un valor de ~ 91,41% y ~ 91,20%, respectivamente.

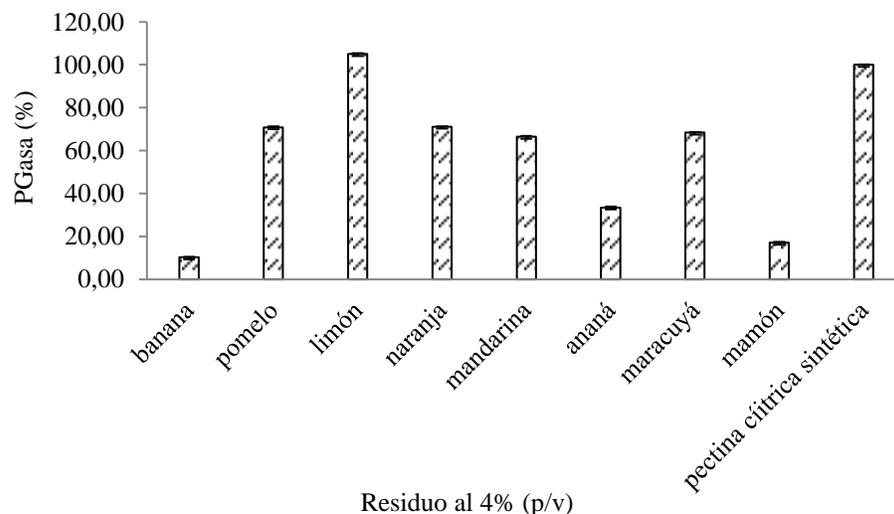
El contenido de ceniza (minerales) estuvo entre 3,05 y 16,95%, en los diferentes residuos evaluados.

El residuo de limón presentó el nivel más alto de calcio ~ 0,39% y pectina (determinada como AGA, ~ 129,57mg<sub>AGA</sub>/mg<sub>residuo</sub>).

Los residuos agroindustriales, como las cáscaras de frutas, son excelentes sustratos para los bioprocesos en términos de su alto contenido en carbohidratos, proteínas, sales minerales, calcio, todos son nutrientes esenciales para la levadura. Estos materiales son una fuente natural de sustancias pécticas y pueden utilizarse como sustrato para la producción de enzimas por microorganismos (Héctor A. Ruiz y col., 2012). El contenido de pectina es de especial interés en estos residuos, para ser utilizados como inductor de la producción de la PGasa por *W. anomalus*.

### ***III.3.2. Selección del residuo agroindustrial mediante la metodología de un factor por vez***

En la Figura III.1 se presentan los valores de producción de PGasa por *W. anomalus* en el medio FR, obtenidos a las 16 h, utilizando los residuos agroindustriales como inductores, en reemplazo de pectina de citrus comercial. Las actividades enzimáticas se presentan como porcentaje del valor alcanzado en el medio FR (30°C, 16 h - 180 rpm), el cual representó el 100% de la actividad PGasa (19,57 ± 0,55 UE/mL).



**Figura III.1:** Producción de PGasa por *W. anomalous* con diferentes residuos al 4% (p/v).

El residuo de limón resultó ser el mejor inductor para la producción de PGasa, observándose una actividad relativa aún mayor a la obtenida con el control, 105,09% (21,74 UE/mL). La producción de PGasa fue menor ( $16,52 \pm 0,14$  UE/mL) al utilizar residuo de naranja, y este valor no presentó diferencia significativa ( $p > 0,005$ ) con los valores obtenidos al utilizar pomelo, mandarina o maracuyá como inductores. El uso de mamón o plátano, resultó en una menor producción de la enzima.

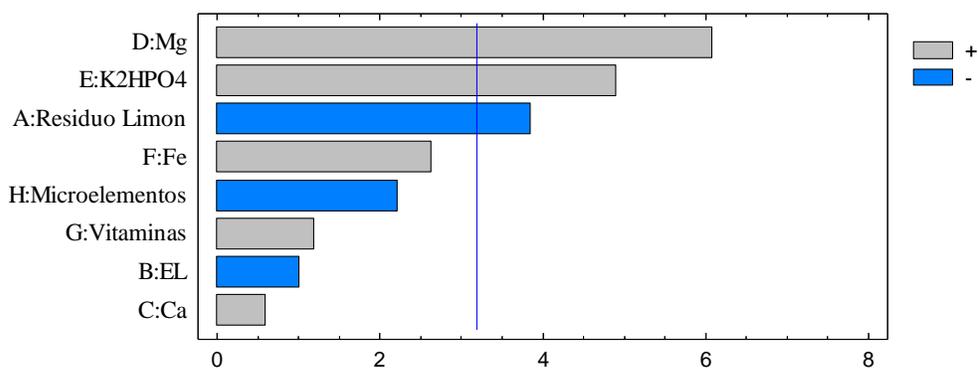
Debido a estos resultados, en las experiencias posteriores se utilizó el residuo de limón en el medio FR; en reemplazo de pectina comercial. Cabe destacar que además de pectina, este residuo contribuye al medio de cultivo con otros nutrientes como proteína y calcio (Tabla III.2).

Larios y col. (1989) mostraron que la producción de endo-PGasa por *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 fue cuatro veces mayor con cáscara de limón en lugar de pectina. Maller y col. (2011) observaron que la cáscara de naranja era el mejor inductor de PGasa para la fermentación sumergida. Según informó Embaby y col. (2014), los residuos de cáscara de naranja demostraron ser el mejor inductor de PGasa por *Bacillus licheniformis* SHG10; similares resultados obtuvieron Anuradha y col. (2014), en la producción de una PGasa por *Aspergillus awamori* MTCC 9166.

### III.3.3. Diseños experimentales y análisis estadístico para la optimización del medio de cultivo

- **Diseño experimental de Plackett-Burman**

En la Figura III.2 se presenta el gráfico de Pareto que indica el efecto de las variables evaluadas sobre la producción de PGasa por *W. anomalous*, en el medio FR, a las 16 h de incubación.



**Figura III.2:** Diagrama de Pareto para la producción de PGasa por *W. anomalus*.

La Figura III.2 indica que el  $K_2HPO_4$ , el Mg y el residuo de limón, influyeron significativamente en la producción de PGasa ( $p < 0,05$ ), mientras que los demás factores no presentaron influencia significativa. El  $R^2$  estadístico (97%) indicó que el modelo presentó un buen ajuste a los datos experimentales. La influencia del  $K_2HPO_4$  y Mg fue positiva, en el rango de concentración evaluado, mientras que el residuo de limón lo hizo de manera negativa, lo que indica que pueden utilizarse los niveles más bajos de este último compuesto en la formulación del medio de cultivo.

Es importante mencionar que cuando se usó residuo de limón en el medio de FR, en lugar de pectina comercial, la influencia del extracto de levadura,  $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ , solución de aminoácidos y elementos traza no fue significativa, esto se debe al hecho de que este residuo agroindustrial es también una fuente de minerales y proteínas (Tabla III.2) (Ruiz y col., 2012).

El efecto de diferentes nutrientes en la producción de enzimas microbianas ha sido objeto de diferentes publicaciones. Según Demır y col. (2012), la producción de PGasa por *Aspergillus sojae* M3 se vió incrementada por la concentración de cascaras de naranja en el medio de cultivo; similares resultados obtuvieron Göğüş y col. (2015), en la producción de una PGasa por *Aspergillus sojae*. Rekha y col. (2013) observaron que la cáscara de naranja y el  $Mg^{+2}$  tuvieron una gran influencia en la producción de PGasa por *T. frigidiphilos profundus*, mientras que el  $Fe^{+3}$  y el  $Ca^{+2}$  mostraron menos efectos. Según Ortiz y col. (2017), un aumento en  $K_2HPO_4$ , soluciones de trazas y factores de  $Ca^{+2}$  ejerce un efecto positivo en la producción de PGase por *Aspergillus giganteus* NRRL10. El extracto de levadura y el  $Fe^{+2}$  tuvieron un efecto insignificante en la productividad de las enzimas. Poondla y col. (2016) estudiaron la influencia de diferentes iones metálicos en la producción de PGasa por *Saccharomyces cerevisiae*, la producción de enzimas aumentó considerablemente con  $MnSO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgSO_4$ ,  $CoCl_2$ . En este trabajo, la

disminución en la producción de PGasa observada cuando aumentaron las concentraciones de residuo de limón, podría deberse al aumento de la viscosidad del medio de cultivo, lo que causó problemas para mantener la homogeneidad y los problemas de transferencia de oxígeno durante el proceso de fermentación (Malvessi & da Silveira, 2004; Rehman y col. 2012).

Los estudios subsiguientes se realizaron utilizando un medio al que se lo denominó “medio de fermentación modificado” (medio FM), de acuerdo con los resultados del diseño de PB. Los factores significativos y positivos ( $Mg^{+2}$  y  $PO_4HK_2$ ) se mantuvieron en su nivel alto. Las otras variables no significativas (extracto de levadura,  $Fe^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ , aminoácidos y solución de elementos traza) se omitieron, y la pectina comercial se reemplazó por residuo de limón. La composición del medio FM se presenta en la Tabla III.3.

**Tabla III.3:** Medio de fermentación modificado

Componentes	
Glucosa	10 (g/L)
Residuo de limón	10 - 2% (w/v)
Urea	1,4 (g/L)
$KH_2PO_4$	0,5 (g/L)
$Mg^{+2}$	0,25 (g/L)
Solución de vitaminas	1000 ×

- ***Superficie de respuesta: diseño de Doehlert***

Se empleó un método de superficie de respuesta para encontrar el nivel óptimo de las variables residuo de limón y tiempo de fermentación, para la producción de PGasa por *W. anomalus*, utilizando el medio FM. Se aplicó el diseño experimental Doehlert. El número de puntos centrales de valor ( $n_0$ ) se fijó en 3 y con dos factores, el total de puntos de la matriz de Doehlert fue 9. La Tabla III.4 muestra la matriz del diseño Doehlert y los resultados de la actividad enzimática obtenidos en cada experimento.

**Tabla III.4:** Valores codificados y reales, y actividades PGasa obtenidos del diseño Doehlert.

Exp.	Valores codificados		Valores reales		Actividad PGasa <sup>(a)</sup> (UE/mL)
	Residuo de limón	Tiempo de Fermentación	Residuo de limón (% p/v)	Tiempo de Fermentación (h)	
1	1	0	10	7,5	0,44± 0,898
2	0,5	-0,866	8	3	5,145± 1,333
3	-0,5	-0,866	4	3	7,523± 0,475
4	-1	0	2	7,5	16,312± 1,471
5	-0,5	0,866	4	12	25,508± 1,454
6	0,5	0,866	8	12	12,778± 1,269
7	0	0	6	7,5	11,208± 1,910
8	0	0	6	7,5	11,122± 1,712
9	0	0	6	7,5	11,058± 1,613

<sup>(a)</sup>Media de tres valores, DS dentro del 10%.

Los valores de los coeficientes lineales, cuadráticos e interacciones y su nivel de significancia (calculados por ANOVA) se muestran en la Tabla III.5.

El coeficiente de regresión encontrado ( $R^2 = 0,99$ ) indicó que el modelo pudo explicar más del 99% de la respuesta observada. Los datos revelaron que ambas variables (residuo de limón y tiempo de fermentación) exhibieron un efecto significativo sobre la producción de PGasa, en el rango estudiado, así como también la interacción entre ellos fue significativa ( $p < 0,05$ ).

**Tabla III.5:** Coeficientes y p-valores calculados por ANOVA, de acuerdo con el diseño de Doehlert.

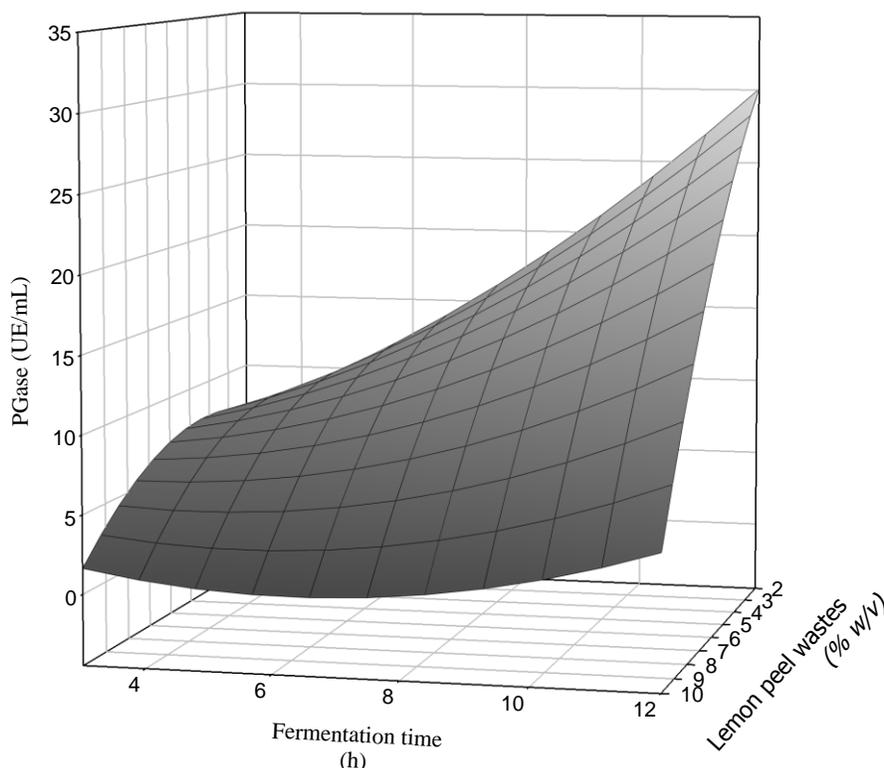
	Coeficientes	p-valores
Constante	11,13	
Residuo de limón	-7,81	0,0000
Tiempo de fermentación	7,40	0,0000
Residuo de limón <sup>2</sup>	-2,75	0,0076
Residuo de limón • Tiempo de fermentación	-5,98	0,0002
Tiempo de fermentación <sup>2</sup>	3,06	0,0006

$R^2=0,99$

Los coeficientes de regresión se calcularon en términos de valores codificados de variables independientes y los datos se ajustaron a una ecuación polinómica de segundo orden (ec. III.1).

$$PGase \left( \frac{EU}{mL} \right) = 11,13 - 7,81[\text{Residuo de limón}] + 7,40[\text{Tiempo de fermentación}] - 2,75[\text{Residuo de limón}]^2 - 5,98[\text{Residuo de limón}][\text{Tiempo de fermentación}] + 3,06 [\text{Tiempo de fermentación}]^2 \text{ (ec. III.1)}$$

La Figura III.3 muestra la curva de la superficie de respuesta para la producción de PGasa por *W. anomalus* como función de las dos variables independientes.



**Figura III.3:** Curva de superficie de respuesta para la producción de PGasa por *W. anomalus*, en función de la concentración del residuo de limón y del tiempo de fermentación.

El residuo de limón y el tiempo de fermentación mostraron un efecto lineal y cuadrático significativo ( $p < 0,05$ ), así como sus interacciones, sobre la producción de PGasa. El factor más importante que afectó la síntesis de PGasa fue el residuo de limón, con el coeficiente más alto (-7,81), seguido del tiempo de fermentación (7,40). El valor negativo del efecto cuadrático para la

variable de residuo de limón indicó la existencia de un máximo en función de esta variable y el valor positivo para el tiempo de fermentación indicó la existencia de un mínimo en función de esta variable. Existió una interacción negativa entre ambas variables según se indica en el valor del coeficiente (-5,98).

Como se observa en la Figura III.3, la síntesis de la enzima aumentó cuando la concentración del residuo de limón disminuyó del 10% al 2% (p/v). A medida que el tiempo de fermentación aumentó de 3 h a 12 h, se observó una mayor producción de PGasa.

La ecuación polinomial de segundo orden (ec. 1) determinó un valor máximo de PGasa de  $30,06 \pm 1,27$  UE/mL, en el medio que contiene 2% (p/v) de residuo de limón a las 12 h de cultivo, este valor fue mayor al obtenido en medio de FR.

La composición final del denominado medio de “Fermentación Optimizado con residuos” (medio FOR) se muestra en la Tabla III.6.

**Tabla III.6:** Composición del medio de Fermentación Optimizado con residuos (FOR).

Componentes	
Glucosa	10 (g/L)
Residuo de limón	2% (p/v)
Urea	1,4 (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 (g/L)
Mg <sup>+2</sup>	0,25 (g/L)
Solución de vitaminas	1000 ×

Al estimar los costos del medio de cultivo, se obtuvo que el medio FOR costaría US\$ 0,2/L, este valor es más bajo que el del medio FR (US\$ 1,22/L).

Según Naidu y Panda (1998), mayores concentraciones de fuente de carbono inhiben la síntesis de enzimas. Pedrolli y Carmona (2008) observaron que *A. giganteus* produjo una actividad significativa de pectina liasa en medio con contenido de residuos de naranja, con un pico de producción con 2% (p/v) del residuo. Según Ahmed y Mostafa (2013), el bagazo de naranja constituye un excelente sustrato inductor para la producción de PGasa por *P. pinophilum* Hedg NRRL 3503, que representó un aumento del 69,20% en la producción de enzimas en comparación con el control. Ahmed y col. (2015) mostraron una actividad enzimática máxima con una concentración óptima de cáscara de naranja del 4% para la producción de pectinasa por *A. niger*. Jahan y col. (2017) incorporaron por separado el 1% de cada desecho agroindustrial (cáscara de manzana, cáscara de naranja, cáscara de limón, cáscara de patata y salvado de trigo) en un medio

seleccionado para la producción de PGasa por *Bacillus licheniformis* KIBE-IB3, un aumento adicional a esta concentración disminuye la producción de la enzima.

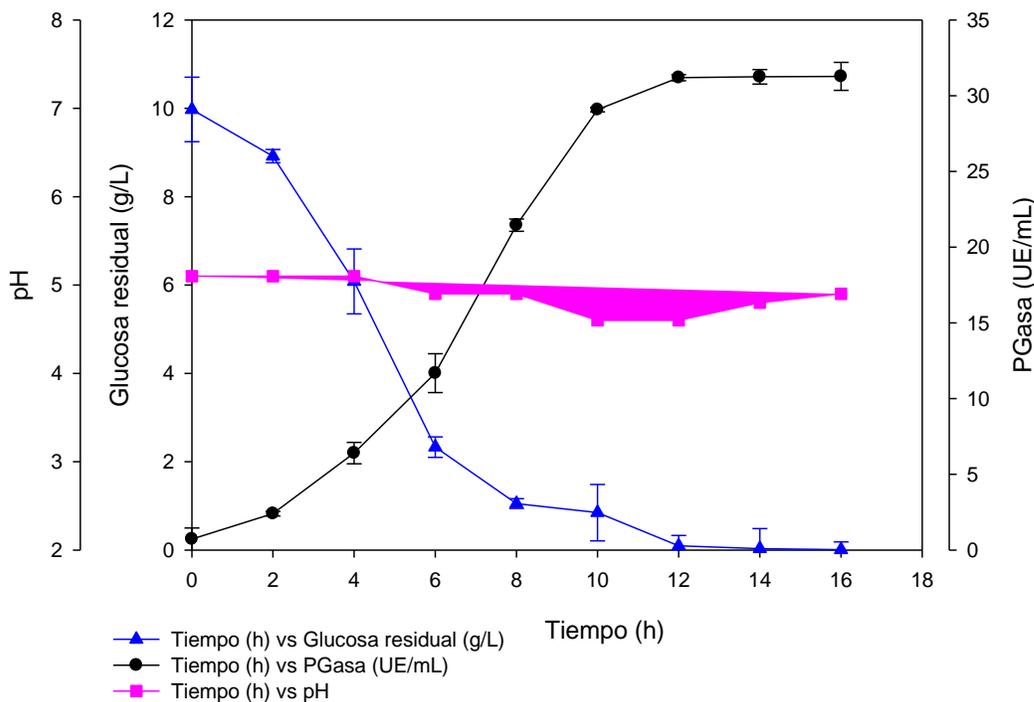
### III.3.4. Validación del modelo experimental

La producción de enzima alcanzada a escala frascos agitados, conteniendo el medio FOR (Tabla III.6), fue de  $31,12 \pm 0,39$  UE/mL, después de 12 h de cultivo. El análisis de varianza no reveló diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la actividad PGasa obtenida con los valores predichos y experimentales, lo que demuestra la validez del modelo utilizado.

### III.3.5. Producción de la enzima PGasa por *W. anomalus* a escala biorreactor

El efecto del aumento de escala en la producción de PGasa por *W. anomalus* se evaluó en un biorreactor de 5 L de capacidad, conteniendo 3 L de medio de anteriormente optimizado.

La Figura III.4 muestra el curso de un cultivo batch de *W. anomalus* en el medio FOR, a escala biorreactor, mediante cultivo batch.



**Figura III.4:** Cultivo batch de *W. anomalus* y su producción de PGasa en el medio optimizado con residuo de limón.

La Figura III.4 muestra que la producción detectable de PGasa comenzó a las 2 h de cultivo, obteniendo una producción máxima a las 12 h, coincidiendo con el agotamiento de la glucosa. A partir de este momento, la actividad enzimática en el sobrenadante del cultivo se mantuvo constante. Se obtuvo una producción enzimática máxima de  $31,28 \pm 0,93$  UE/mL a las 12 h. El pH disminuyó ligeramente durante el cultivo desde un valor inicial de 5,1, hasta aproximadamente 4,9 al final del proceso de fermentación.

En el capítulo anterior, la producción máxima de PGasa obtenida *W. anomalus* fue de  $\sim 25,52$  UE/mL en un medio sintético optimizado compuesto por: glucosa, pectina de cítricos comercial, urea, extracto de levadura,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgSO}_4$ , en un sistema batch, a escala biorreactor de laboratorio.

### III.3.6. Comparación de medios.

En la Tabla III.7 se muestra una comparación en cuanto a la cantidad de componentes y costo del medio FR, el medio FO y el medio FOR. Se observa una gran reducción en costos y una fácil preparación al utilizar residuos de limón en el medio de cultivo. El medio FO no resultó en una reducción en costos, sin embargo, se logró una mejora significativa en cuanto a la simplicidad de su composición y fácil preparación.

**Tabla III.7:** Comparación de cantidades y costo de los componentes de los medios de cultivo evaluados.

Componentes	Cantidades Medio RF (g/L)	U\$s	Cantidades Medio FO (g/L)	U\$s	Cantidades Medio FOR (g/L)	U\$s
glucosa	10,000	0,142	10,000	0,142	10,000	0,142
urea	1,400	0,042	1,400	0,042	1,400	0,042
cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	0,100	0,002	0,050	0,001	0,050	0,001
sulfato de magnesio (SO <sub>4</sub> Mg)	0,500	0,005	0,250	0,003	0,250	0,003
fosfato potasico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,000	0,028	0,500	0,014	0,500	0,014
extracto de levadura	-	-	0,750	0,109	-	-
pectina cítrica	5,000	0,849	6,000	1,019	-	-
<b>Vitaminas</b>						
biotina	2E-06	3E-04	-	-	2E-06	3E-04
pantotenato de Calcio	4E-04	1E-04	-	-	4E-04	1E-04
acido folico	2E-06	4E-05	-	-	-	-
inositol	2E-03	2E-03	-	-	-	-
niacina	4E-04	7E-04	-	-	-	-
acido p-aminobenzoico	2E-04	9E-06	-	-	-	-
piridoxina	4E-04	2E-04	-	-	4E-04	2E-04
riboflabina	2E-04	1E-03	-	-	-	-
tiamina	4E-04	1E-03	-	-	4E-04	1E-03
<b>Aminoácidos</b>						
histidina	0,010	0,025	-	-	-	-

metionina	0,020	0,041	-	-	-	-
triptofano	0,020	0,078	-	-	-	-
<b>Elementos traza</b>						
sulfato de cobre pentahidratado (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	4,E-05	1,E-06	-	-	-	-
cloruro ferrico hexahidratado(FeCl <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O)	2,E-04	5,E-05	-	-	-	-
sulfato de manganeso monohidratado (MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	4,E-04	1,E-05	-	-	-	-
molibdato de sodio bihidratado (NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	2,E-04	3,E-05	-	-	-	-
sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	4,E-04	8,E-06	-	-	-	-
	Precio U\$s total del medio por L	1,2179		1,3297		0,2034
	Precio \$ total del medio por L	69,4222		75,7909		11,5937

### III.4. CONCLUSIONES

El medio de fermentación optimizado quedó compuesto por glucosa, residuo de limón, urea, vitaminas,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{MgSO}_4$ . En este medio, la síntesis de PGasa alcanzó un valor de ~31 UE/mL a las 12 h, en cultivo batch, a escala biorreactor. La actividad de la PGasa mejoró un ~37%, con respecto al valor obtenido con el medio de fermentación de referencia original; y un ~18% respecto del medio sintético optimizado en el capítulo anterior.

En esta etapa del trabajo, se logró aumentar la producción de la enzima y obtener un medio de cultivo de bajo costo para su producción, utilizando un residuo agroindustrial. La provincia de Misiones genera grandes cantidades de residuos de las industrias agrícolas. La producción de PGasa por *W. anomalus*, utilizando dichos desechos agrícolas en el medio de cultivo, representa una alternativa adecuada para la revalorización de este tipo de residuos, reduciendo la contaminación ambiental y generando productos con un alto valor agregado, con ventajas económicas y ecológicas.

## CAPITULO IV: EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE ALMIDÓN DE MANDIOCA CON PGASA DE *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS*

### RESUMEN

El objetivo de la presente etapa fue estudiar el efecto de diferentes factores sobre el proceso de extracción de almidón de mandioca, mediante la enzima poligalaturonasa de *W. anomalus*, a fin de encontrar un protocolo óptimo para la extracción mediante un proceso biotecnológico.

Para el proceso de extracción, la mandioca pelada y cortada, se colocó en frascos Erlenmeyers a los que se les agregó el EE de *W. anomalus* y buffer de reacción. La mezcla se incubó a 40°C, 6 h, con agitación y posteriormente se filtró. El filtrado, denominado material extraído (ME), se centrifugó, lavó y secó a 45°C. El rendimiento se expresó como porcentaje de almidón extraído respecto al peso seco del tejido original (% p/p). Se estudiaron diferentes factores sobre el rendimiento del proceso extractivo: tamaño de tejido, dosis de la enzima (15 a mL) y la relación sólido/líquido (S/L), mediante un factor por vez. Se optimizó la temperatura y el tiempo de extracción, utilizando la metodología de superficie de respuesta. El proceso se comparó con el uso de una enzima comercial.

La mandioca “procesada (MP)” permitió un mayor rendimiento de extracción. Los blancos con el EE inactivo arrojaron valores despreciables. Los mayores rendimientos se obtuvieron con una relación S/L de 30/60 g<sub>MP</sub>/mL<sub>buffer + enzima</sub>. El rendimiento aumentó con el volumen del EE hasta los 30 mL (PGasa en el medio de reacción: ~15,5 UE/mL). La temperatura y el tiempo de reacción, tuvieron un efecto significativo. El óptimo rendimiento de extracción de almidón se presentó a 40°C y 5 h. La ecuación polinomial de segundo orden determinó un valor máximo de extracción de almidón de 32,57 ± 0,41 % (p/p). Al realizar la extracción a escala reactor, en las condiciones optimizadas, se obtuvo un rendimiento: 33,06 ± 0,49 % (p/p). El protocolo final de extracción resultó ser: mandioca cruda, lavada y procesada (MP) + EE (relación S/L 30/60 – PGasa = 15 UE/mL), incubación en reactor a 40 °C, 5 h, 400 rpm, filtración, lavado (2 veces), sedimentación, secado (45 °C – 24 h), molido y tamizado (100 mesh).

Se evaluaron las características físico-químicas y funcionales del almidón extraído. La composición proximal del almidón extraído por vía enzimática (AE) presentó contenidos de humedad, proteína, fibra cruda y grasa levemente mayores a los del almidón comercial (AC). El contenido de cenizas y carbohidratos, resultó ligeramente menor al de AC y estos valores están dentro de los parámetros exigidos según el Código Alimentario Argentino. El mayor índice de solubilidad en agua (% ISA) y poder de hinchamiento (PH) se presentó a los 70 °C en ambos almidones. EL PH del AE presentó

un valor ligeramente menor respecto al del AC, siendo los valores obtenidos de 1,97 g<sub>agua</sub>/g<sub>AE</sub> y 2,08 g<sub>agua</sub>/g<sub>AC</sub>, para AE y AC, respectivamente. Respecto a los valores de ISA, el AC no presentó diferencia significativa en comparación con el AE (3,14% y 3,97% respectivamente). El AE presentó una temperatura de empastamiento (comienzo de la gelatinización) de 63,5 °C, un pico de viscosidad máxima de 355 UB, la viscosidad de la pasta a los 95 °C fue de 352,5 UB, la estabilidad de la pasta durante la cocción (*breakdown*) fue de 132,5 UB y la tendencia a la retrogradación (*setback*) fue de 80 UB. La sinéresis debido a la refrigeración y congelación de las pastas de AE fue más alta respecto a la del AC. Los valores de transmitancia (%T) obtenidos fueron de 52,32%T para AE, semejante al obtenido para AC (55,17%T), dentro del rango de referencias de la FAO (2007). La pasta de AE es considerada clara o transparente. La temperatura de gelificación resultante para AE fue de 63 °C.

El AE podría ser utilizado en alimentos como mermeladas, gelatinas, y en confitería para la elaboración de gomitas, etc. El método de extracción enzimática podría ser un método biotecnológico innovador, obteniéndose un producto de similares características químicas y microscópicas a los almidones comerciales, extraídos por métodos mecánicos.

---

**Palabras claves:** extracción enzimática, almidón de mandioca, caracterización.

#### IV.1. INTRODUCCION

El almidón es una materia prima con un amplio campo de aplicaciones, es utilizado en la industria alimenticia como estabilizante, agente de relleno, ligante, formador de películas, gelificante, humectante, espesante, etc.

La mandioca (*Manihot esculenta*), contiene más almidón por peso seco que cualquier otro cultivo alimentario. Misiones es la principal provincia productora de mandioca de la Argentina y potencial proveedor del mundo. La mandioca es utilizada como materia prima de la industria para la extracción de almidón.

Los gránulos de almidón se encuentran en el interior de las células. El proceso tradicional de extracción del almidón de mandioca consiste en romper las paredes celulares para liberar los gránulos de almidón mediante un proceso de molienda y rallado. La eficiencia de esta operación determina, en gran parte, el rendimiento total de la extracción de almidón. Si durante el rallado no se desintegra bien el tejido para liberar los gránulos de almidón del interior de las células, el rendimiento del proceso de extracción baja y se pierde mucho almidón en el afrecho desechado. Se estima que alrededor del 10-15 % del almidón original no es extraído y se pierde en el residuo sólido de la extracción. Por otra parte, el rallado puede afectar la integridad de los gránulos de almidón obtenidos, produciendo así lo que se denomina almidón dañado. Este almidón impacta negativamente sobre sus propiedades funcionales y reológicas. Finalmente, es importante mencionar que esta etapa demanda un alto gasto energético responsable en gran parte del costo total del proceso (Cobana y Antezana, 2007; Torre y col., 2010).

Las enzimas pécticas o pectinasas, son las responsables de la degradación de las sustancias pécticas presentes en la laminilla media y en la pared celular primaria de las plantas superiores. Algunas pectinasas tienen la capacidad de hidrolizar restringidamente la protopectina presente en los tejidos vegetales, liberando pectina soluble y se las conocen como enzimas solubilizadoras de pectina o protopectinasas (PPasas) (Cavalitto y col., 2000; Tari y col., 2007; Zapata Zapata, 2008).

*Wickerhamomyces anomalus*, es una levadura autóctona aislada a partir de frutas cítricas, en la Universidad Nacional de Misiones, Misiones, Argentina (Martos y col., 2013). Dicha levadura produce, al crecer en un medio líquido, extractos enzimáticos con elevada actividad endopoligalacturonasa (endo-PG, EC 3.2.1.15). Esta enzima fue purificada, caracterizada y finalmente identificada como una endopoligalacturonasa (endo-PG), la cual presenta además actividad PPasa (Martos y col., 2014a). De estudios previos se demostró que los sobrenadantes crudos del cultivo de *W. anomalus* producen la desintegración de tejidos de mandioca con la consecuente liberación de los gránulos de almidón de su interior. Es de destacar que la única actividad enzimática detectada en

los sobrenadantes de cultivo de *W. anomalus* es dicha PGasa, por lo cual la actividad macerante y/o desintegrante se adjudicó a esta enzima.

La extracción de almidón de mandioca por vía enzimática, presentaría ventajas respecto a los métodos mecánicos utilizados tradicionalmente. Las condiciones usadas para la extracción de almidón por vía enzimática son mucho más suaves, se tendría un menor daño en los gránulos de almidón preservando su integridad con una mejora en su calidad y un ahorro energético del proceso de extracción en su conjunto. Es también factible que se alcancen mayores rendimientos en el almidón obtenido respecto al peso de mandioca procesada.

En la presente etapa de este trabajo de tesis, se decidió profundizar en el estudio del proceso de desintegración enzimática de tejidos de mandioca con liberación del almidón como alternativa al conocido proceso de ruptura mecánica y realizar la caracterización del almidón obtenido para compararlo con el almidón de mandioca comercial.

## **IV.2. MATERIALES Y METODOS**

### ***IV.2.1. Obtención del Extracto Enzimático***

El extracto enzimático (EE) se obtuvo a partir de cultivos de la levadura *W. anomalus* en el medio optimizado, con glucosa (10 g/l), residuo de limón (2 % p/v) como FCE e inductor, respectivamente, sales y vitaminas; a escala biorreactor, agitación (550 rpm), durante 12 h a 30 °C, según se detalló en el capítulo III, de la presente tesis. Una vez terminada la fermentación, el cultivo fue centrifugado a  $2350 \times g$  durante 10 min para remover las células de levadura. El sobrenadante obtenido (EE), se concentró  $2 \times$  a presión reducida en un rotavapor a escala banco (Büchi; 30 vueltas por min, a 38 °C) y fue denominado extracto enzimático concentrado (EEC). El EEC se mantuvo a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Cuando fue necesario, las muestras se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 30 °C con agitación a los efectos de acelerar el proceso, a modo de evitar la desnaturalización de las proteínas presentes.

La actividad PGasa del EE y del EEC se determinó por el método de Somogyi Nelson.

### ***IV.2.2. Obtención de la materia prima***

Los tubérculos de mandioca (*Manihot esculenta*) fueron proporcionados por un productor local, de la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina. Las raíces se lavaron con agua del grifo, pelaron y cortaron en diferentes formas y tamaños, según se menciona más adelante. .

#### **IV.2.3. Protocolo de la extracción enzimática de almidón**

*Extracción:* para extraer el almidón de mandioca se empleó la metodología descrita por Sit y col. (2015), con algunas modificaciones. El EEC fue diluido con buffer acetato de sodio/ácido acético (0,2 M, pH 5,0), de manera de obtener una actividad PGasa similar a la del EE original (~31 UE/mL). El proceso de extracción se llevó a cabo en frascos Erlenmeyers de 500 mL conteniendo 30 g de material vegetal, 25 mL de buffer acetato de sodio/ácido acético (0,2 M, pH 5,0) y 25 mL del EE (~31 UE/mL), con una relación sólido/líquido (S/L) de 30/60 (p/v). La mezcla de reacción se incubó a 40°C, durante 6 h, en una incubadora con agitación (MRC, TOU-50N, ancho de vibración de 25 mm) a 150 rpm.

*Tratamiento del material extraído (ME):* después de la extracción, la suspensión resultante se filtró a través de un paño de muselina de doble doblez en un vaso de precipitados y el filtrado se centrifugó a 2,350 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó, se limpió raspando la superficie de sedimento de impurezas visibles. El sedimento final se secó a 45 ° C durante 24 h en un horno de secado con aire caliente (0,4 m/s) (horno Dalvo, Modelo EHRF, Industria Argentina). El producto obtenido fue denominado “material extraído (ME)”. El ME se pesó y se mantuvo en recipientes de plástico herméticos para su posterior análisis.

El rendimiento se expresó como porcentaje de material extraído (ME) respecto al peso seco del tejido original (% p/p) (Nakamura y col., 1995).

$$\boxed{\text{Rendimiento ME (\% p/p)} = \text{ME}^* (\text{g}) \times 100 / \text{mandioca en base seca (g)}}$$

Las experiencias se realizaron por triplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios.

\*ME: material extraído

#### **IV.2.4. Influencia de diferentes factores en el proceso de extracción enzimática de almidón**

En esta etapa del trabajo, se evaluó la influencia del tamaño del tejido vegetal (raíces de mandioca), la relación sólido/líquido (S/L) y la actividad PGasa, sobre el rendimiento del proceso de extracción de almidón utilizando el EE de *W. anomalus*, con el fin de determinar las mejores condiciones para llevar a cabo el proceso extractivo. Se siguió el protocolo descrito en el ítem 2.3.

- ***Influencia de la forma y tamaño del tejido***

Las raíces de mandioca lavadas y peladas se cortaron en diferentes formas y tamaños, a saber:

- a) Bastones largos 1x1x2 cm<sup>3</sup>: las raíces de mandioca se cortaron utilizando un cuchillo a 2 cm de largo, luego se cortaron los bastones mediante un corta papas de cocina.

- b) Cubos de 1 cm<sup>3</sup>: los bastones obtenidos como se describió anteriormente se cortaron utilizando un cuchillo de modo de obtener cubos de 1 cm<sup>3</sup>.
- c) Rodajas de 3 mm de espesor: las raíces de mandioca se cortaron transversalmente utilizando una mandolina de cocina, adaptada al espesor de 3mm.
- d) Rodajas de 1 mm de espesor: las raíces de mandioca se cortaron transversalmente utilizando una mandolina de cocina, adaptada al espesor de 1mm.
- e) Ralladas: las raíces de mandioca se ralaron utilizando un rallador de cocina.
- f) Procesadas: las raíces de mandioca se procesaron utilizando una multiprocesadora de cocina durante 10 segundos.

Para el proceso de extracción se siguieron los pasos descriptos anteriormente (ítem 2.3). En cada experiencia se preparó un blanco con agua destilada en lugar de enzima, sometiéndolo a iguales condiciones de extracción. En todos los casos, las experiencias se realizaron por triplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios. Los resultados se analizaron mediante ANOVA simple, aplicando el programa estadístico Statgraphics Centurión XV.

- ***Influencia de la relación sólido/líquido***

El efecto de la relación sólido/líquido (S/L) ha sido estudiado por otros autores para diferentes materias primas. Se sabe que una disminución de la relación S/L aumenta el rendimiento de la extracción. Es necesario encontrar una relación adecuada entre el solvente y la materia prima a ser extraída. Una proporción alta, da lugar a extractos demasiado diluidos y aumenta los costos del posterior secado y si es muy baja no habrá buena difusión (Cacace y Mazza, 2003; Herodez y col., 2003; Pinelo y col., 2005; Spigno, 2007).

En esta etapa, se evaluó el rendimiento de extracción de almidón empleando diferentes relaciones S/L ( $\text{g}_{\text{material vegetal}}/\text{mL}_{\text{buffer + enzima}}$ ): 30/20, 30/40, 30/60, 30/80 y 30/100, bajo las mismas condiciones de extracción que las mencionadas en el ítem 2.3 y manteniendo la misma relación buffer y enzima.

- ***Influencia de la actividad PGasa***

Se estudió la posibilidad de utilizar un menor volumen del EE, a fin de disminuir los costos del proceso. Para ello se evaluó la extracción de almidón, utilizando diferentes volúmenes de EE (15, 30 y 45 mL), pero manteniendo las mismas condiciones de extracción mencionadas en el ítem 2.3 y utilizando la relación S/L seleccionada en la etapa anterior.

En todos los casos, el proceso de extracción se realizó según se mencionó anteriormente. En cada experiencia, se preparó un blanco con agua destilada en lugar de enzima, sometiéndolo a iguales condiciones de extracción.

Las experiencias se realizaron por triplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios. Los resultados se analizaron mediante ANOVA simple, aplicando el programa estadístico Statgraphics Centurión XV.

Para experiencias posteriores, el protocolo de extracción y tratamiento del ME se fue ajustando a los resultados experimentales que fueron surgiendo, a fin obtener mayores rendimientos y un almidón de mejor calidad.

#### ***IV.2.5. Metodología de superficie de respuesta: optimización de la temperatura y el tiempo de extracción.***

En la presente etapa del trabajo, se optimizó el efecto de la temperatura y el tiempo de incubación, sobre la extracción de almidón de mandioca por el EE de *W. anomalus* mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR). Actualmente, esta técnica ha sido ampliamente usada por diferentes investigadores para optimizar las condiciones de extracción de polisacáridos (Zapata y col., 2009).

Se evaluó el proceso de extracción de almidón a diferentes temperaturas (30 a 50°C), dentro del rango de estabilidad de la enzima, y tiempos de incubación (1 a 6 h), utilizando el diseño experimental de Doehlert (Martos y col., 2014, Doehlert, 1970). El valor de  $n_0$  se fijó a 3; por lo tanto, se realizaron un total de nueve experiencias, las que estudiaron el efecto de dos variables independientes a cinco niveles cada una, con tres repeticiones en el punto central (Butiuk y col., 2015).

En la Tabla IV.1 se presenta la matriz utilizada en el diseño experimental de Doehlert. Se siguió el protocolo de extracción descrito anteriormente (ítem 2.3), pero utilizando la forma y tamaño del tejido vegetal seleccionado previamente, así como también la relación S/L, la temperatura y la actividad PGasa que condujeron a un mayor rendimiento de extracción.

En cada experiencia se realizó un control con agua destilada en lugar de enzima. En todos los casos, las experiencias se realizaron por triplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios. Los resultados se analizaron aplicando el programa estadístico Statgraphics Centurión XV.

**Tabla IV.1:** Valores codificados y reales utilizados en el diseño experimental de Doehlert

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

#### ***IV.2.6. Comparación de rendimientos de extracción con enzimas comerciales***

El proceso de extracción enzimática de almidón de mandioca con PGasa de *W. anomalus* se comparó con la extracción realizada con enzimas comerciales, Pectinex Ultra Clear Batch SON50034, una poligalacturonasa provista por Frutos Patagónicos SRL. Se siguió el protocolo de extracción optimizado en las etapas anteriores.

#### ***IV.2.7. Escalado del proceso de extracción del almidón de mandioca con el EE de *W. anomalus****

El proceso de extracción se llevó a cabo, inicialmente, a escala frascos agitados y utilizando un Erlenmeyer de 3 L. La extracción se realizó en una incubadora con agitación (MRC, TOU-50N, ancho de vibración de 25 mm) a 150 rpm, en las condiciones de temperatura y tiempo optimizadas. Posteriormente, se realizó la extracción de almidón en un reactor de 5 L de capacidad, con agitación mecánica 400 rpm, bajo las condiciones de reacción seleccionadas y optimizadas en las etapas anteriores.

Las experiencias se realizaron por triplicado (frascos Erlenmeyers) y duplicado (reactor), y se tomaron para los cálculos los valores promedios.

#### ***IV.2.8. Caracterización del almidón extraído***

Se realizó la caracterización química y funcional del almidón nativo extraído por vía enzimática (AE) y se comparó con un almidón nativo comercial (AC), obtenido por el método de extracción tradicional.

- ***Análisis proximal***

Las propiedades fisicoquímicas son las que determinan el uso del almidón de mandioca. Entre las propiedades fisicoquímicas más importantes encontramos la composición proximal (contenido de proteína cruda, grasas, fibra cruda, cenizas y humedad). Se determinó el contenido de humedad mediante secado a 105 °C hasta peso constante (Técnica Analítica del CAA; 13.21, 1989), fibra cruda (por tratamiento con ácido y álcali), cenizas (temperatura 550 °C durante 3 h), proteínas (N total por el método Kjeldahl x 6,75, factor proteínas vegetales), grasa (por método de Twisselman por Soxhlet con extracción con éter de petróleo) y carbohidratos (por diferencia), fueron cuantificados según las metodologías descritas por AOAC (1990).

- ***Análisis microscópico del almidón extraído***

- ***Microscopía óptica***

Para la caracterización microscópica de los gránulos de almidón se colocó una pequeña porción de almidón sobre un portaobjetos y se agregó una gota de una solución de yodo/yoduro de potasio al 0,2 %. Las muestras se observaron en un microscopio de luz invertido OLYMPUS®, modelo IX51® (Olympus America, Inc., Melville, NY, USA) y las imágenes se captaron utilizando aumento a 40X y 100X. (Vargas Aguilar et al., 2012).

- ***Microscopía de electrónica de barrido***

Para obtener las micrografías del almidón se usó un microscopio electrónico de barrido (JEOL 5800 LV) del servicio de microscopía de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE, Corrientes, Argentina), trabajando con un haz de energía de 15kV. Las muestras secas se montaron en una lámina metálica de aluminio utilizando cinta bifaz para adherir las mismas. Luego se llevó a cabo el metalizado o *sputtering*, se cubrió el material con oro, durante tres minutos, a fin de evitar los fenómenos de carga eléctrica por iluminación del haz electrónico (Sivoli et al., 2009; 2012).

- ***Caracterización funcional del almidón extraído***

Para poder evaluar el potencial uso industrial en alimentos del almidón de mandioca extraído, es fundamental determinar sus propiedades funcionales.

- ***Determinación del índice de solubilidad en agua y poder de hinchamiento***

Para la determinación del índice de solubilidad en agua (ISA) y el poder de hinchamiento (PH) se utilizó la técnica desarrollada por Leach, McCowen y Schoch (1959), con algunas modificaciones (Colussi y col., 2014). Se pesó 1 g de muestra y se dispersó en 50 mL de agua destilada en un tubo de centrifuga, los tubos se agitaron y se llevaron a un baño termostático (Vicking, Dubnoff, Argentina) manteniendo la temperatura durante 30 minutos en escalones de 10 °C desde 50 a 90 °C.

Luego, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 minutos en una centrífuga (Rolco, Argentina).

Para el cálculo del índice de solubilidad en agua, se colocó el sobrenadante en una cápsula, previamente secada y pesada, y se llevó a estufa a  $103\pm 1^\circ\text{C}$  hasta peso constante.

$$ISA(\%) = \frac{w_{so}-w_c}{w_m} \times 100 \quad A$$

Siendo:

$W_{so}$ : peso de la cápsula con el sobrenadante seco (g)

$W_c$ : peso de la capsula (g)

$W_m$ : peso de la muestra en base seca (g)

La solubilidad se expresó como porcentaje de peso del sólido seco respecto al peso de almidón seco.

Para el cálculo del poder de hinchamiento se consideró el sedimento resultante de la centrifugación (almidón hidratado) y el peso inicial del almidón seco (restando la fracción soluble).

$$PH \left( \frac{g}{g} \right) = \frac{W_{se}-W_t}{W_m-ISA} \quad B$$

Siendo:

$W_{se}$ : peso del sedimento húmedo (g)

$W_t$ : peso del tubo vacío (g)

$W_m$ , peso de la muestra en base seca (g)

ISA: fracción soluble

El resultado se expresó como los gramos del sedimento del gel por gramo de almidón. Las determinaciones se efectuaron por duplicado.

- *Perfiles de viscosidad Brabender*

Para determinar la temperatura de gelatinización de las muestras de almidón y las viscosidades en Unidades Brabender (UB), se consideró la norma ISI 19, 2000. Se preparó 500 mL de una suspensión acuosa de cada muestra de almidón al 5% en base seca, se ajustó el pH 5,5 y se analizó en un viscoamilografo Brabender (Micro-Visco-Amylo-Graph, 803201, Germany). El equipo trabajó con una rampa incremental de temperatura con una pendiente positiva de  $1,5^\circ\text{C}/\text{minuto}$ , elevando la temperatura inicial de  $50^\circ\text{C}$  a  $95^\circ\text{C}$ , la cual se mantuvo durante 30 minutos. Por último,

se disminuyó la temperatura hasta 50°C con una rampa decreciente de temperatura con una pendiente negativa de 1,5 °C/minuto, se mantuvo esta temperatura durante 5 minutos. A partir de los amilogramas resultantes se evaluaron los siguientes puntos significativos de la curva:

- A: Temperatura de empastamiento (comienzo de la gelatinización).
- B: Pico de viscosidad o máxima viscosidad (PV).
- C: Viscosidad al comienzo del primer periodo de mantenimiento a 95 °C.
- D: Viscosidad al comienzo del periodo de enfriamiento a 95 °C.
- E: Viscosidad al final del periodo de enfriamiento a 50 °C.
- F: Viscosidad al final del segundo periodo de mantenimiento a 50 °C.
- B – D: Estabilidad de la pasta durante la cocción (breakdown).
- D – E: Retrogradación (setback).

Las medidas se realizaron por triplicado sobre cada muestra de almidón.

- *Estabilidad de refrigeración y congelación*

Se pesaron 2g (base seca) de muestra, la uqe se dispersó en 40 mL de agua destilada en un tubo de centrifuga (previamente pesados), los tubos se agitaron y se calentaron a 95 ° C durante 30 min con agitación constante. El gel se centrifugó a 2.350 x g durante 10 min, se eliminó el agua libre (sobrenadante). Entonces se determinó el peso de la pasta. Esto se sometió a ciclos alternativos de congelación y descongelación (22 h de congelación a -20 ° C seguido de 2 h de descongelación a 30 ° C); y de refrigeración (22 h de refrigeración a -5 ° C seguido de 2 h a 30 ° C) durante 5 días. Luego de cada ciclo, se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y el porcentaje de agua se separó y pesó. El porcentaje de sinéresis se determinó como el peso de los exudados al peso de la muestra.

$$\%Sineresis = \frac{\text{peso exudados (g)} \times 100}{\text{peso muestra (g)}}$$

- *Claridad de las pastas*

La claridad indica el grado de transparencia de las pastas y está directamente relacionada con el estado de dispersión de los solutos y con la tendencia a la retrogradación de los almidones. La capacidad para transmitir la luz cuando son sometidos al paso de un haz radiante mide su claridad. Se empleó la técnica propuesta por Craig y col. (2002), descrita en la Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca, FAO (2007). Se realizaron suspensiones acuosas con muestras de 200 mg de (AE y AC, respectivamente) y 20 mL de agua destilada. Se gelatinizaron las muestras durante 30 minutos en un baño de agua en ebullición y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Mediante un espectrofotómetro (SHIMADZU, UV: 2550, Japón) se midió el porcentaje de transmitancia (%T) de las suspensiones, a 650 nm, usando agua destilada como referencia. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

- *Temperatura de gelificación*

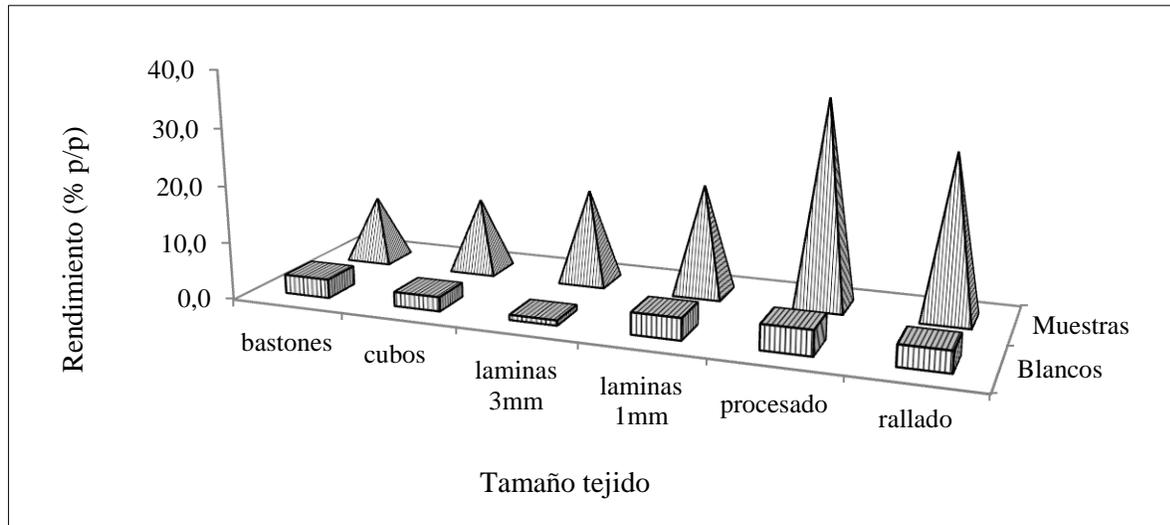
Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría; cuando se calientan en solución a temperaturas altas alcanzan una temperatura específica en la cual se inicia el hinchamiento de los gránulos. Esta temperatura es llamada temperatura de gelatinización. Se empleó la técnica propuesta por Grace y col. (1977), descrita en la Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca, FAO (2007). Se realizaron suspensiones acuosas con muestras de 10 g de almidón de mandioca y 100 mL de agua destilada. Se calentó 100 mL de agua a 85 °C. Se tomaron 50 mL de la suspensión en un vaso de precipitados de 100 mL, el mismo se introdujo en el agua a 85 °C. Con un termómetro se agitó la suspensión, hasta que se formó de una pasta y la temperatura se estabilizó. A continuación, se leyó la temperatura de gelificación en el termómetro. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **IV.3. RESULTADOS Y DISCUSION**

#### ***IV.3.1. Influencia de diferentes factores en el proceso de extracción enzimática de almidón***

- ***Influencia de la forma y tamaño del tejido vegetal***

En la Figura IV.1 se presenta el rendimiento del ME, utilizando diferentes tamaños y formas de la materia prima (raíces de mandioca). La forma “procesada” resultó ser la más conveniente para llevar a cabo la extracción enzimática de almidón, dado que a partir del mismo se obtuvo el mayor rendimiento de extracción, el cual resultó ser de  $35,97 \pm 0,253$  % ( $\text{g}_{\text{ME}}/100 \text{ g}_{\text{material seco}}$ ).



**Figura IV.1:** Rendimiento de extracción del ME con el extracto enzimático de *W. anomalus*, utilizando diferentes tamaños y formas del material vegetal. Condiciones de extracción: relación S/L: 30/50 (p/v), pH: 5, 40 °C, 6 h, a 150 rpm, actividad PGasa en el medio de reacción: ~15 UE/mL.

En base a los resultados obtenidos, los estudios posteriores de extracción enzimática del almidón, se realizaron utilizando mandioca “procesada” (MP) como materia prima.

- ***Influencia de la relación solido/liquido***

En la Tabla IV.2 y en la Figura IV.2 se presentan los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la relación S/L ( $\text{g}_{\text{MP}}/\text{mL}_{\text{buffer+EE}}$ ), sobre la extracción de almidón de mandioca por el EE de *W. anomalus*. En la Tabla IV.3, se presenta el análisis de varianza correspondiente, en la Tabla IV.4 el análisis de rangos múltiples y en la Figura IV.3 el gráfico de comparación de medias. Se mantuvo en todas las experiencias una actividad PGasa en el medio de reacción de ~15 UE/mL en el medio de reacción.

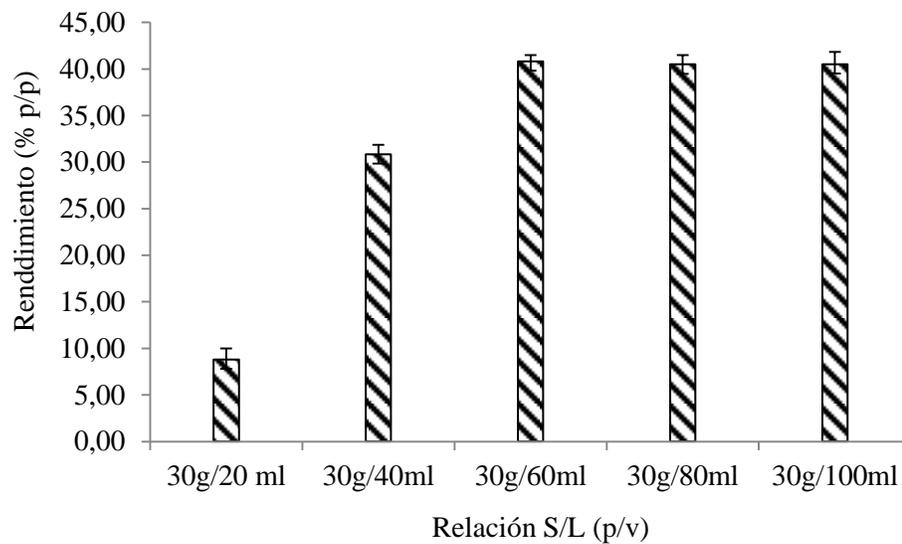
**Tabla IV.2:** Extracción de almidón de mandioca con diferente relación sólido/líquido.

MP (g)	Buffer (ml)	EE (ml)	Relación S/L ( $\text{g}_{\text{MP}}/\text{mL}_{\text{buffer} + \text{EE}}$ )	Rendim.		Prom. **
				ME (g)	% *	
30	10	10	30/20	1,340	8,634	
30	10	10	30/20	1,562	10,065	8,801 ± 1,189
30	10	10	30/20	1,196	7,704	
30	10	10 (H <sub>2</sub> O)	30/20	0,355	2,284	
30	20	20	30/40	4,791	30,867	
30	20	20	30/40	4,942	31,843	30,852 ± 0,999
30	20	20	30/40	4,632	29,846	
30	20	20 (H <sub>2</sub> O)	30/40	0,363	2,340	
30	30	30	30/60	6,230	40,142	
30	30	30	30/60	6,335	40,820	40,822 ± 0,681
30	30	30	30/60	6,442	41,505	
30	30	30 (H <sub>2</sub> O)	30/60	0,540	3,477	
30	40	40	30/80	6,152	39,639	
30	40	40	30/80	6,250	40,267	40,496 ± 0,991
30	40	40	30/80	6,453	41,581	
30	40	40 (H <sub>2</sub> O)	30/80	0,400	2,576	
30	50	50	30/100	6,216	40,053	
30	50	50	30/100	6,521	42,019	40,499 ± 1,353
30	50	50	30/100	6,119	39,426	
30	50	50 (H <sub>2</sub> O)	30/100	0,581	3,746	

\* g ME/100 g mandioca seca, ME: material extraído

\*\*Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones ± DS.

Condiciones de extracción: actividad PGasa en el medio de reacción: ~15 UE/mL, pH: 5, 40 °C, 6 h, a 150 rpm.



**Figura IV.2:** Efecto de la relación sólido/líquido en el rendimiento de extracción enzimática de almidón.

**Tabla IV.3:** Análisis de Varianza para el rendimiento según la relación S/L

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2283,98	4	570,996	501,89	0,0000
Intra grupos	11,377	10	1,1377		
Total (Corr.)	2295,36	14			

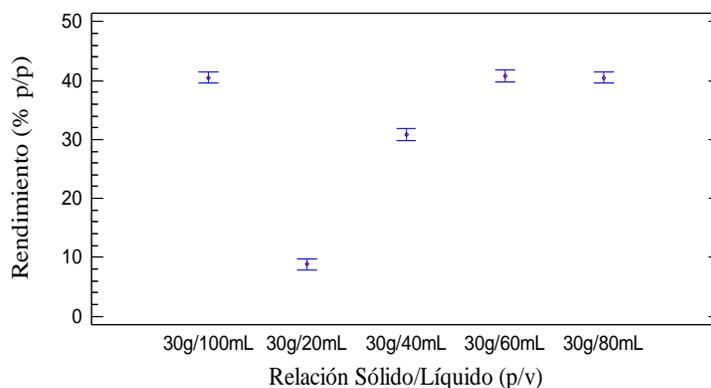
**Tabla IV.4:** Análisis de rangos múltiples

Relación	Cantidad	Media	Grupos Homogéneos
30g/20ml	3	8,801	X
30g/40ml	3	30,852	X
30g/60ml	3	40,8223	X
30g/80ml	3	40,4957	X
30g/100ml	3	40,4993	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
30g/100ml - 30g/20ml	*	31,6983	1,94049
30g/100ml - 30g/40ml	*	9,64733	1,94049
30g/100ml - 30g/60ml		-0,323	1,94049
30g/100ml - 30g/80ml		0,00366667	1,94049
30g/20ml - 30g/40ml	*	-22,051	1,94049
30g/20ml - 30g/60ml	*	-32,0213	1,94049
30g/20ml - 30g/80ml	*	-31,6947	1,94049
30g/40ml - 30g/60ml	*	-9,97033	1,94049
30g/40ml - 30g/80ml	*	-9,64367	1,94049
30g/60ml - 30g/80ml		0,326667	1,94049

\* indica una diferencia significativa.



**Figura IV.3:** Gráfico de comparación de medias para el efecto de la relación S/L ( $\text{g}_{\text{MP}}/\text{mL}_{\text{buffer} + \text{EE}}$ ) sobre el rendimiento de extracción enzimática del ME.

De la Tabla de Análisis de Varianza (Tabla IV.3) se pudo concluir que la relación S/L ( $\text{g}_{\text{MP}}/\text{mL}_{\text{buffer} + \text{enzima}}$ ) influyó significativamente en el proceso de extracción del ME, siendo el nivel de significación (p) menor a 0,05 para el 95 % del nivel de confianza. El Test de Rangos Múltiples (Tabla IV.4), indicó que hubo diferencia entre las relaciones 30/20 y 30/40 con las demás relaciones evaluadas: 30/60, 30/80 y 30/100, pero no hubo diferencia significativa entre estas últimas.

En la Figura IV.3, se observa que los mayores rendimientos de 40,82 %, se obtuvieron con una relación S/L de 30/60 (p/v). Puede observarse que a mayores relaciones S/L, los rendimientos obtenidos no variaron significativamente.

En base a los resultados obtenidos en esta etapa, en las sucesivas experiencias se empleó la relación S/L 30/60 ( $\text{g}_{\text{MP}}/\text{mL}_{\text{buffer} + \text{EE}}$ ).

- **Influencia de la actividad PGasa**

En la Tabla IV.5 y en la Figura IV.4 se presentan los resultados obtenidos al evaluar el volumen de EE (diferentes actividades PGasa en el medio de reacción), sobre la capacidad de extracción del ME.

**Tabla IV.5:** Efecto de la actividad PGasa de *W. anomalus* sobre el proceso del ME.

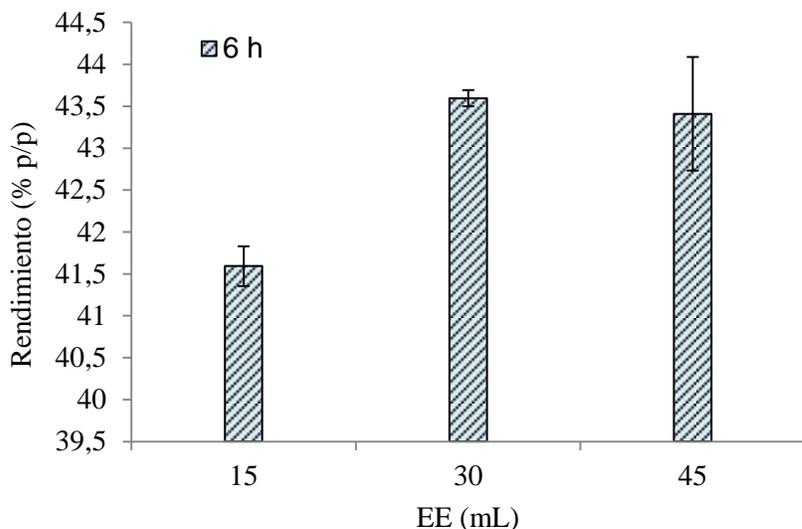
MP (g)	Buffer (mL)	EE (mL)	PGasa en el medio de reacción (UE/mL)	ME (g)	Rendim (%)*	Rendim. Promedio**
30	45	15	8,255	6,496	41,857	
30	45	15	7,855	6,445	41,525	41,592±0,238
30	45	15	7,614	6,424	41,394	
30	45	15 (H <sub>2</sub> O)	7,984	0,688	4,430	
30	30	30	16,252	6,779	43,677	
30	30	30	15,872	6,770	43,620	43,595±0,097
30	30	30	13,158	6,749	43,488	
30	30	30 (H <sub>2</sub> O)	15,194	0,793	5,110	
30	15	45	22,882	6,617	42,635	
30	15	45	23,436	6,811	43,885	43,41±0,677
30	15	45	23,375	6,784	43,711	
30	15	45 (H <sub>2</sub> O)	23,308	0,660	4,249	

MP: mandioca procesada, EE: extracto enzimático, Relación S/L:  $\text{g}_{\text{MP}}/\text{mL}_{\text{buffer} + \text{EE}}$ .

Condiciones de extracción: relación S/L: 30/60, 40°C a 150 rpm, 6 h, pH: 5.

\*g ME/100 g mandioca seca, ME: material extraído

\*\*Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones ± DS.



**Figura IV.4:** Efecto de la actividad PGasa de *W. anomalous* sobre el rendimiento del ME.

El Análisis de Varianza de indicó que la actividad enzimática influyó significativamente en el rendimiento del proceso extractivo, siendo el nivel de significación (p) menor a 0,05 para el 95 % del nivel de confianza (datos no mostrados).

En la Tabla IV.5 y en la Figura IV.4 se observa que hubo un aumento en el rendimiento de ME desde un valor de 41,59 % ± 0,24 (p/p) con 15 mL de EE (PGasa en el medio de reacción: ~8 UE/mL), hasta un valor de 43,59 ± 0,097 % (p/p) con 30 mL de EE (PGasa en el medio de reacción: ~15 UE/mL). No hubo diferencia significativa en los valores de rendimiento al utilizar 30 o 45 mL de EE.

En base a los resultados obtenidos en esta etapa, en las sucesivas experiencias se utilizaron 30 mL del EE enzimático y 30 mL de buffer de reacción (actividad PGasa en el medio ~15 UE/mL).

Los altos rendimientos observados se debió a un elevado porcentaje de fibras que resultó ser de 2,6±0,12 % p/p (Maidana y col., 2015). La fibra cruda (celulosa, lignina y hemicelulosas) es considerada como una impureza y su presencia en el almidón está relacionada con el método de extracción del almidón y con las etapas siguientes de purificación (Torres Rapelo y col., 2013). Por tal motivo, se evaluó incorporar etapas de purificación y eliminación de fibras al ME antes del secado y a fin de obtener un almidón de mejor calidad, según el procedimiento descrito por Sit y col., 2014 con algunas modificaciones.

#### ***IV.3.2. Protocolo del tratamiento del ME modificado***

A fin de disminuir el contenido de fibras y obtener un almidón de mejor calidad, se incorporaron etapas de purificación del ME.

Luego del proceso de extracción, la suspensión resultante se filtró a través de un paño de muselina de doble doblez, en un vaso de precipitados y el filtrado se dejó sedimentar durante 1 h. El sobrenadante se descartó, y el sedimento se lavó dos veces con agua destilada, se secó hasta peso constante, se molió y se tamizó con un tamiz de 100 mesh.

Cobana y Antezana (2007), encontraron que el contenido de fibra en almidón de mandioca, extraído por el método convencional, fue significativamente afectado por el tiempo de molienda, por la velocidad de rotación del tamizado y por una premolienda en húmedo.

#### ***IV.3.3. Metodología de superficie de respuesta: optimización de la temperatura y el tiempo de extracción.***

Los diseños experimentales basados en la estadística ha sido ampliamente usada por diferentes investigadores para optimizar las condiciones de extracción de polisacáridos (Zapata y col., 2009)

En esta etapa, se empleó el método de superficie de respuesta con el fin de obtener el nivel óptimo de las variables temperatura y tiempo de extracción de almidón. Las otras variables se mantuvieron en los valores anteriormente determinados.

Se aplicó el diseño experimental Doehlert. El número de puntos centrales de valor ( $n_0$ ) se fijó en 3 y con dos factores, el total de puntos de la matriz de Doehlert fue 9. La Tabla IV.6 mostró la matriz del diseño Doehlert y los resultados en rendimientos de la extracción enzimática de almidón obtenidos en cada experimento.

**Tabla IV.6:** Matriz y resultados del diseño Doehlert

Exp.	Valores codificados		Valores reales		Rendimiento % (p/p) <sup>(a)</sup>
	Temperatura de extracción	Tiempo de extracción	Temperatura de extracción (°C)	Tiempo de extracción (h)	
1	1	0	50	3,5	3,084±0,993
2	0.5	-0.866	45	1	6,076±0,658
3	-0.5	-0.866	35	1	21,152±0,714
4	-1	0	30	3,5	8,938±0,449
5	-0.5	0.866	35	6	24,953±0,874
6	0.5	0.866	45	6	26,387±0,995
7	0	0	40	3,5	29,996±0,698
8	0	0	40	3,5	30,806±0,730
9	0	0	40	3,5	30,732±0,717

(a) Promedio de tres valores ± DS dentro del 10%.  $R^2 = 0,99$

Los valores de los coeficientes lineales, cuadráticos, las interacciones y su nivel de significancia (calculados por ANOVA) se muestran en la Tabla IV.7.

**Tabla IV.7:** Coeficientes y p-valores calculados por ANOVA, de acuerdo con el diseño de Doehlert.

	Coeficiente	P valor
Constante	30,588	
Temperatura de extracción	-2,921	0,0258
Tiempo de extracción	8,573	0,0019
Temperatura de extracción <sup>2</sup>	-24,534	0,0001
Tiempo de extracción <sup>2</sup>	-9,141	0,0049
Temperatura.Tiempo	6,308	0,0312

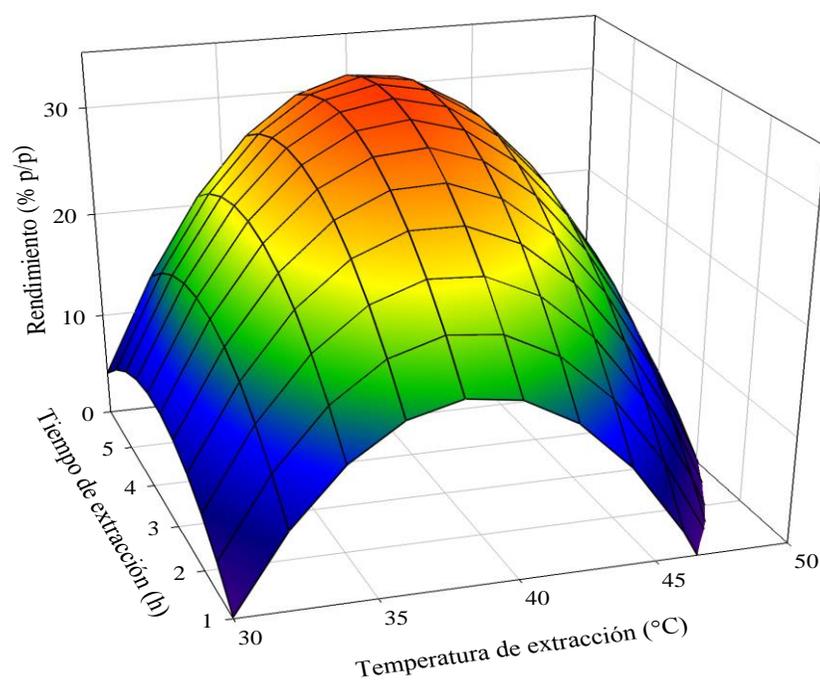
El coeficiente de regresión encontrado ( $R^2 = 0,99$ ) indicó que el modelo presentó un muy buen ajuste a los datos experimentales.

Los datos en la Tabla IV.7 se convirtieron en una ecuación polinómica de segundo orden:

$$\text{Rendimiento \%} = 30,59 - 2,92\text{Temperatura} + 8,57\text{Tiempo} - 24,53\text{Temperatura}^2 + 6,31\text{Temperatura} * \text{Tiempo} - 9,14\text{Tiempo}^2 \quad (\text{ec. IV.4})$$

Las dos variables independientes tuvieron un efecto lineal significativo, positivo (tiempo) y negativo (temperatura). El tiempo fue la variable lineal más importante que afectó la extracción de almidón, ya que posee el mayor coeficiente de regresión.

En la Figura IV.5 se presenta la superficie de respuesta para la extracción de almidón de mandioca con el EE de *W. anomalus*, en función de las dos variables independientes (tiempo y temperatura de extracción).



**Figura IV.5:** Superficie de respuesta mostrando el efecto del tiempo y temperatura de extracción enzimática de almidón de mandioca por PGasa por *W. anómalus*.

Los valores negativos del efecto cuadrático para ambas variables evaluadas (ec. IV.4), indican la existencia de un máximo en función de las mismas. Esto también puede observarse en la superficie de respuesta (Fig. IV.5) donde el óptimo rendimiento de extracción de almidón se presenta a una temperatura de 40°C y a las 5 h de extracción. En estas condiciones de extracción la ecuación polinomial de segundo orden (ec. IV.4) determinó un valor máximo de extracción de almidón de  $32,57 \pm 0,412$  % p/p.

Los menores rendimientos obtenidos respecto a los valores anteriores, se debieron a las etapas de purificación (lavado y tamizado) incorporadas en estas experiencias, como se mencionó en el ítem anterior, a fin de obtener un almidón con menor contenido de impurezas (fibras).

Según la bibliografía consultada, el contenido de almidón en mandioca varía en el rango de 24 – 35 %, dependiendo de la variedad y el tiempo del cultivo.

#### **IV.3.4. Comparación de rendimientos de extracción con enzima comercial**

En la Tabla IV.8 se compara el rendimiento de extracción de almidón de mandioca, en las condiciones óptimas (relación S/L: 30/60, 40°C, 5h, 30 mL EE, pH 5), utilizando PGasa de *W. anomalus*, respecto al rendimiento de extracción obtenido con enzimas comerciales.

**Tabla IV.8:** Comparación de la extracción enzimática de almidón de mandioca.

Enzima	% ME ( $\frac{g_{ME}}{g_{mandioca\ seca}}$ )
EE PGasa de <i>W. anomalus</i>	32,57±0,412
Enzima comercial	21,58±0,514
Control (sin enzima)	6,36±0,615

Condiciones de extracción: relación S/L: 30/60, 40°C a 150 rpm, 5 h, pH: 5.

La extracción de almidón utilizando PGasa de *W. anomalus* resultó ser ~34% superior que la extracción con la enzima comercial.

#### **IV.3.5. Extracción enzimática de almidón a mayor escala**

En esta etapa el proceso de extracción de almidón se realizó utilizando MP, manteniendo la relación S/L y la actividad PGasa optimizada en las etapas anteriores (S/L: 30/60, ~15 UE/mL). La mezcla de reacción se incubó con agitación en las condiciones óptimas de temperatura y tiempo.

Finalizada la extracción, el contenido total obtenido, se trató según se mencionó en el ítem 3.3.

- **Escala frascos agitados:**

En base a los resultados obtenidos en las experiencias anteriores, la extracción de almidón se llevó a cabo en un Erlenmeyer de 3 L, mezclando 300 g de mandioca cruda procesada, 300 mL de buffer Ac/Ac y 300 mL de EE. La extracción se llevó a cabo a 40 °C, a 150 rpm en un agitador rotatorio, durante 5 h. En la Tabla IV.9 se presentan los rendimientos de almidón extraído. La experiencia se realizó por triplicado y se obtuvo un rendimiento promedio de 33,99±0,138 % (p/p). Se preparó un blanco con agua destilada en lugar de enzima, sometiénolo a iguales condiciones de extracción,

cuyo rendimiento fue de 10,672 % (p/p). En la Figura IV.6 se muestra la extracción enzimática de almidón de mandioca a escala frascos agitados.

**Tabla IV.9:** Extracción enzimática de almidón de mandioca, escala frascos agitados.

Muestra	Peso (g)	Rendimiento	
		% (p/p)	promedio DS*
M1	49,338	34,073	
M2	49,347	34,079	33,997 0,138
M3	48,997	33,838	
Blanco	15,453	10,672	

\*DS: desviación estándar



**Figura IV.6:** Extracción enzimática de almidón de mandioca, a escala frascos agitados.

- **Escala reactor:**

La extracción de almidón se llevó a cabo en un reactor de 5 L, mezclando 1000 g de mandioca cruda procesada, 1000 mL de buffer Ac/Ac y 1000 mL de EE. La extracción se llevó a cabo a 40 °C, con agitación mecánica a 400 rpm, durante 5 h. El proceso de extracción se realizó por duplicado y se obtuvo un rendimiento promedio de 33,06±0,49 % (p/p) y un blanco con agua destilada en lugar de enzima de 12,81 % (p/p). En la Tabla IV.9 se presentan los rendimientos de almidón extraído. En la Figura IV.7 se muestra la extracción enzimática de almidón de mandioca a escala reactor.

**Tabla IV.10:** Extracción enzimática de almidón de mandioca, escala reactor.

Muestra	Peso (g)	Rendimiento		DS*
		% (p/p)	promedio	
R1	161,23	33,40	33,06	0,49
R2	157,92	32,72		
Blanco	61,83	12,81		

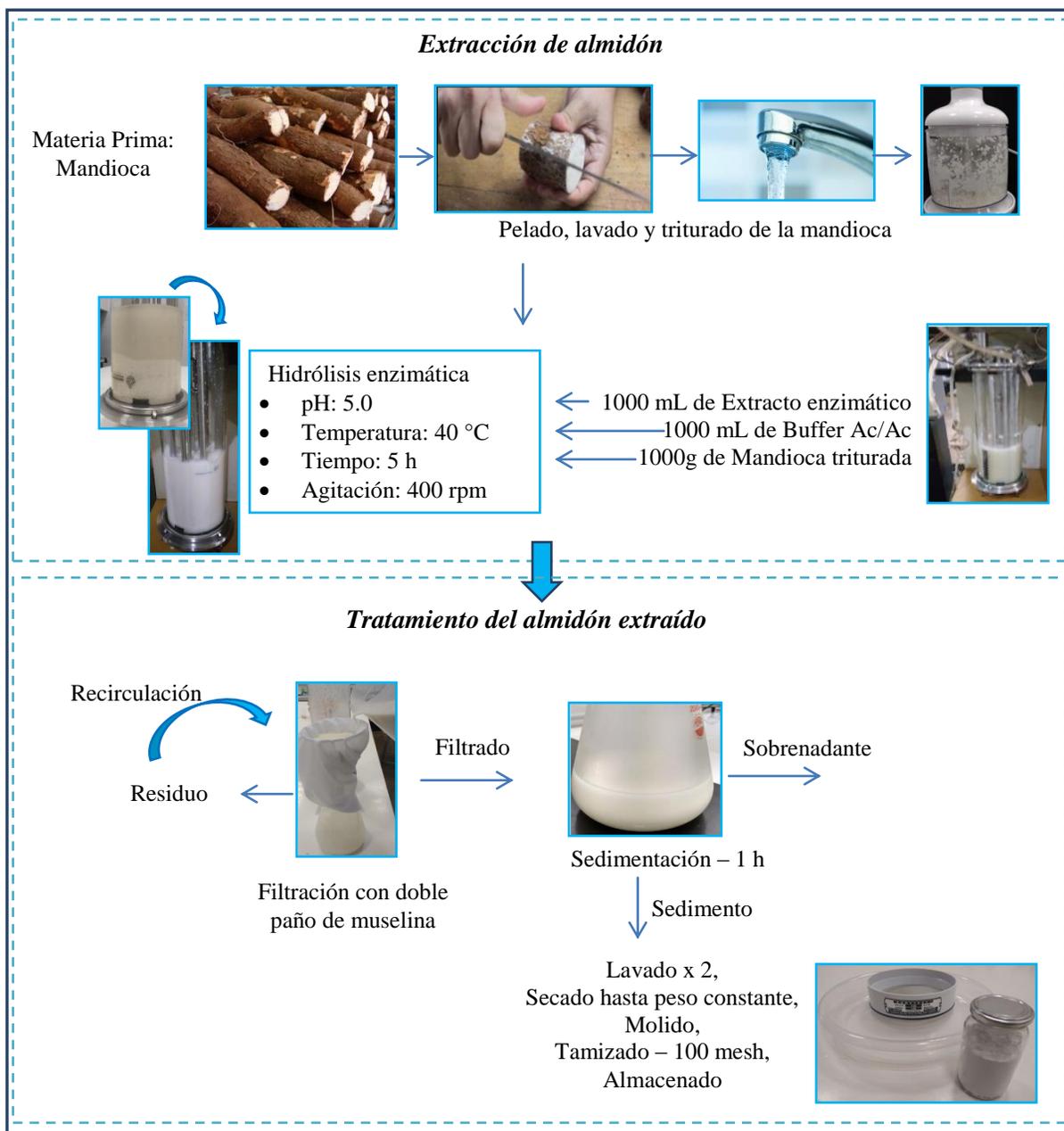
\*DS: desviación estándar



**Figura IV.7:** Extracción enzimática de almidón de mandioca, a escala reactor.

### IV:3.6. Protocolo de extracción definitiva

El esquema general definitivo del proceso de extracción de almidón de mandioca, utilizando el extracto enzimático de *W. anomalus*, se detalla en la Figura IV.8.



**Figura IV.8:** Protocolo definitivo del proceso de extracción de almidón de mandioca, utilizando el extracto enzimático de *W. anomalus*.

#### IV.3.7. Caracterización del almidón extraído

Se realizó la caracterización fisicoquímica y funcional del almidón nativo extraído por vía enzimática (AE) y del almidón comercial, extraído por el método de extracción tradicional (AC).

- *Análisis proximal*

En la Tabla IV.10 se muestra el análisis proximal del almidón de mandioca comercial (AC) y del almidón extraído por vía enzimática (AE) con el EE PGasa de *W. anomalus*.

**Tabla IV.10:** Composición química de los almidones evaluados

Componentes (%)	AE	AC
Humedad	12,09±0,012	11,8±0,17
Proteínas	0,738±0,179	0,633±0,095
Fibra*	0,90±0,042	0,71±0,029
Grasas	0,5±0,01	0,42±0,141
Cenizas	0,2±0,017	0,23±0,01
Carbohidratos	84,76	86,21

\*Se realizó fibra cruda, asemejando el resultado a fibra dietaria.

El contenido de humedad resultó del 11,8 % para AC y 12,09 % para AE, valores superiores a los reportados por Hernández Medina y col. (2008) para almidón de mandioca. Alvis y col. (2008), obtuvieron entre 7,8 a 8,47 % de humedad de almidón, en tres variedades de mandioca. El contenido de humedad está dentro de los parámetros exigidos por el Código Alimentario Argentino. El contenido de fibra cruda (celulosa, lignina y hemicelulosa) del almidón extraído fue de 0,9±0,04 %, levemente mayor al valor obtenido en el almidón comercial (0,71±0,03 %). Este bajo valor de fibra cruda obtenido para AE demuestra que las etapas incorporadas de purificación permitieron obtener un almidón de mejor calidad, con menos contenido de impurezas (celulosa, lignina y hemicelulosa).

El contenido de proteína en el AC (0,63 %) fue ligeramente inferior al valor obtenido para el AE (0,74 %), similares a los valores reportados por Alvis y col. (2008) para tres variedades almidón de mandioca, 0,6 % respectivamente. Melian (2010) afirma que un alto contenido de proteína en el almidón, cambia sus propiedades físico-químicas influyendo en su viscosidad, además le confiere una capacidad a espumar.

Singh y Kaur (2009) mencionan que la pureza del almidón está relacionada con el contenido de carbohidratos, es decir, habrá mayor pureza debido a gran presencia de carbohidratos. En el AC se

obtuvo 86,21 %, valor similar al obtenido en el AE (84,76 %). Hernández Medina y col. (2008) reportan un porcentaje del 98,44 % de carbohidratos para la mandioca, mientras que Alvis y col. (2008) obtuvieron valores de carbohidratos entre 90,43 % y 91,12 % para las tres variedades de mandioca estudiadas.

Melian (2010) sostiene que el contenido de grasa puede influir sobre el comportamiento reológico de los almidones y en consecuencia disminuir la viscosidad de la pasta y la fuerza del gel. En este estudio se encontró un contenido de grasa para el AC de 0,42 %, ligeramente menor al obtenido en el AE (0,5 %), ambos superiores a los reportados por Hernández Medina y col. (2008) (0,2 %) y para las tres variedades de mandioca estudiadas por Alvis y col. (2008) (0,3 %).

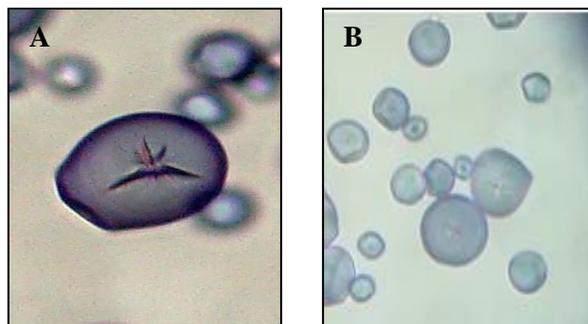
El contenido de cenizas presentes en los almidones representa la cantidad de minerales y sales remanentes que quedaron, producto de la extracción y del contenido de minerales de la materia prima. Se encontró un contenido de cenizas del 0,23 % en el AC y del 0,2 % en el AE; valor ligeramente inferior del valor reportado por Hernández Medina y col. (2008) para almidón de mandioca (0,29 %). Alvis y col. (2008), reportaron un rango de valores menores para las diferentes variedades de mandioca que estudiaron (0,11 – 0,15 %).

La composición proximal del AE presentó contenidos de humedad, proteína, fibra cruda y grasa levemente mayores a los que presentó el AC. Sin embargo, el contenido de cenizas y carbohidratos, resultó ligeramente menor al de AC. Estos valores están dentro de los parámetros exigidos según el Código Alimentario Argentino (Capítulo IX - Art. 674).

El análisis proximal de AE no presentó diferencias significativas con el AC.

- *Análisis microscópico del almidón extraído*
- *Microscopía óptica*

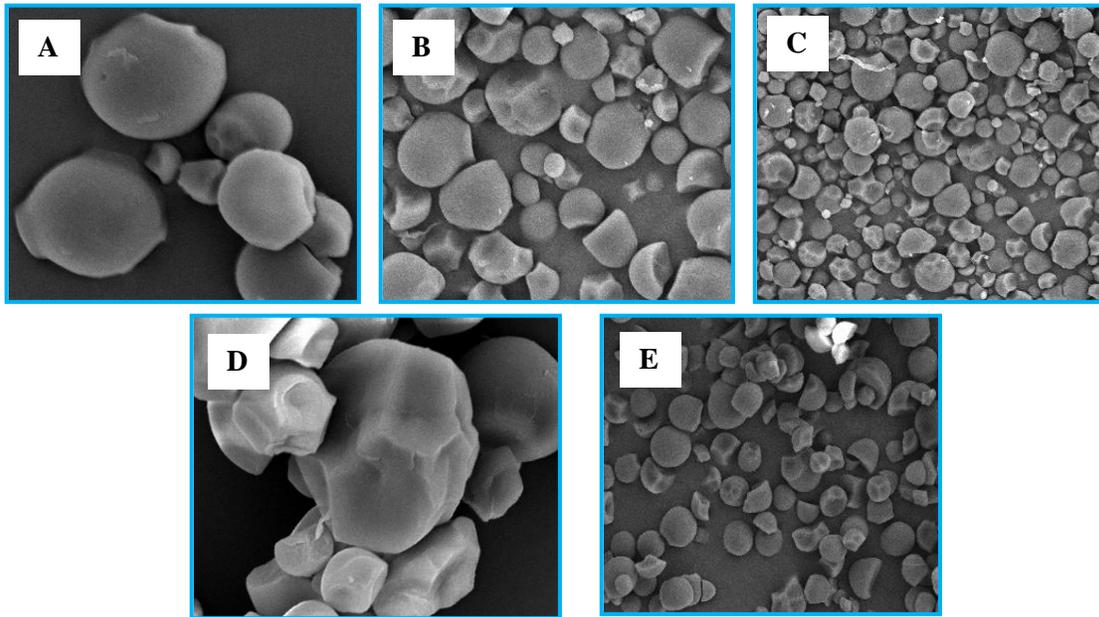
La Figura IV.9 muestra microfotografías del almidón obtenido luego del proceso de secado. Se observa que los gránulos de almidón de mandioca presentaron una forma redonda y/o esférica, con un *hilum* bien definido en el centro, sin evidenciarse daño de los mismos. Estas observaciones concuerdan con lo documentado por varios autores, quienes han identificado las principales características de los gránulos de almidón de varias fuentes botánicas, incluido el almidón de mandioca (Vargas Aguilar y col., 2012).



**Figura IV.9:** Microfotografías de los almidones de mandioca extraído con EE de *W. anomalus*  
A:100×, B: 40×.

- *Microscopía de electrónica de barrido*

Las Figuras IV.10 A, B y C muestran microfotografías del almidón extraído por vía enzimática luego del proceso de secado, observado por un microscopio electrónico de barrido. Las Figuras IV.10 D y E muestran microfotografías del almidón comercial de extracción mecánica tradicional. Los almidones de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) mostraron una forma esférica-truncada, típico de este tipo de almidón, tal como lo reportaron Sosa (2003) en dos variedades cubanas de mandioca y Hernández-Medina (2008) con mandioca cultivada en el estado de Yucatán, México. El tamaño de los gránulos fue homogéneo, se reportaron diámetros promedio de 14,6  $\mu\text{m}$ . No se evidenció daño de los gránulos del almidón extraído por vía enzimática. Sin embargo, como se observa en la Figura IV. D, el almidón comercial de extracción mecánica tradicional presenta daño en algunos de sus gránulos.



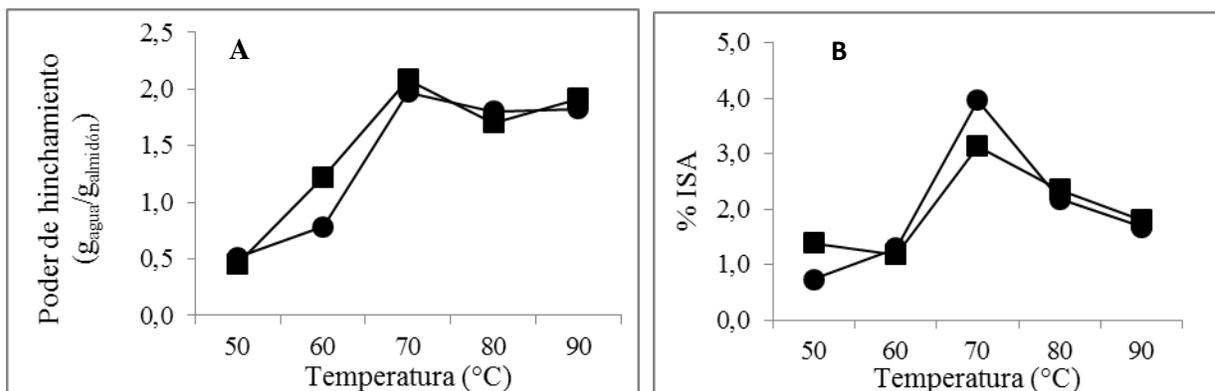
**Figura IV.10:** Microfotografías de los almidones de mandioca extraído con EE de *W. anomalus*: A. 2500×, B.1000×, C. 500×; y almidón comercial: D. 2500×, E. 500×.

- ***Determinación del índice de solubilidad (ISA) en agua y poder de hinchamiento (PH)***

El poder de hinchamiento de los almidones es una propiedad de su contenido de amilopectina, siendo la amilosa un diluyente e inhibidor del hinchamiento. En la Figura IV.11A y IV.11B, se presentan el poder de hinchamiento (PH) y el índice de solubilidad en agua (ISA) para las muestras de AC y AE. El mayor % ISA y PH se presentó a los 70 °C en ambos almidones. El PH de AE presentó un valor ligeramente menor respecto del AC, siendo los valores obtenidos de 1,97  $\text{g}_{\text{agua}}/\text{g}_{\text{AE}}$  y 2,08  $\text{g}_{\text{agua}}/\text{g}_{\text{AC}}$ , respectivamente. Dichos valores se encuentran dentro del rango de referencia (0,79–15,45) según la Food and Agriculture Organization (FAO, 2007). Respecto a los valores de ISA, el AC no presentó diferencia significativa en comparación con el AE (3,14% y 3,97% respectivamente). Los valores de ISA deben variar entre 0,27–12,32% (FAO, 2007). García y col. (2013) reportaron valores levemente inferiores para ISA para almidón de mandioca extraído por un método artesanal convencional (entre 2-3,3%). Alvis y col. (2008) presentaron valores similares de ISA, entre 2,6 % y 3,7 % para tres variedades de mandioca. Estos valores fueron menores a los reportados por Sit y col (2015) para los almidones de taro extraídos de manera convencional (PH 13,3 g/g; ISA 20,2 %) y enzimática, con un pool de celulasas y xilanasas (PH 14,95 g/g; ISA 19,08 %), a los 90 °C.

Según estudios realizados por Hernández Medina y col. 2008, el almidón de mandioca presentó un mayor PH de 58,83  $\text{g}_{\text{agua}}/\text{g}_{\text{almidón}}$  a 90 °C. A menor temperatura, el valor de PH fue menor. En cuanto

al ISA, observaron que la misma aumentó conforme se incrementó la temperatura a la que se sometió el almidón de mandioca.



**Figura IV.11:** A. Poder de hinchamiento (PH -  $\text{g}_{\text{agua}}/\text{g}_{\text{almidón}}$ ) del AC (-■-) y del AE (-●-). B. Índice de solubilidad en agua (ISA - %) del AC (-■-) y del AE (-●-).

- **Perfiles de viscosidad Brabender**

Los perfiles viscoamilográficos de los almidones fueron determinados mediante un viscoamilógrafo C. W. Brabender (Modelo VA-VE 177506, Brabeder GmbH & Co KG, Duisburg, Alemania). Durante la realización del ensayo la suspensión de almidón en agua se sometió a calentamientos y enfriamientos controlados, registrándose en forma continua, mediante un gráfico, la viscosidad aparente en unidades Brabender (UB) de la suspensión.

En la Figura IV.12 se presentan los amilogramas para AE y AC, y la Tabla IV.11 muestra los resultados obtenidos de los amilogramas correspondientes.

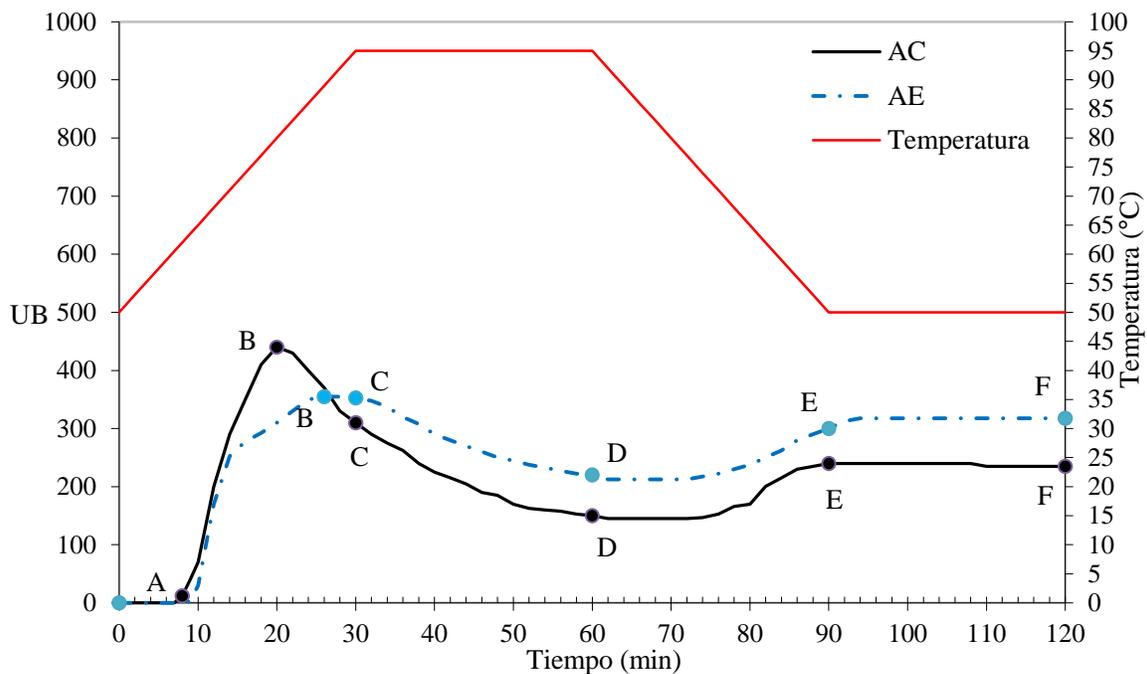
El AE presentó una temperatura de empastamiento (comienzo de la gelatinización) de 63,5 °C, similar al del AC, estos datos están en concordancia con lo reportado en la bibliografía para almidón de mandioca (58 – 65 °C) (Alvis y col., 2008; Hernández Medina y col., 2008).

Para AE, se obtuvo un pico de viscosidad máxima de 355 UB, menor al valor obtenido para AC (440 UB). La viscosidad de la pasta de AE a los 95 °C fue de 352,5 UB, valor este superior al del AC (310 UB). La estabilidad de la pasta para AE, durante la cocción (*breakdown*) fue de 132,5 UB, siendo este valor de 160 UB para AC. La tendencia a la retrogradación (*setback*) para AE fue de 80 UB, mientras que para AC fue de 90 UB.

Estos resultados indican que el AE presentó un menor PH (menor valor de viscosidad máxima), en concordancia con los valores obtenidos anteriormente de PH (1,97  $\text{g}_{\text{agua}}/\text{g}_{\text{AE}}$ , 2,08  $\text{g}_{\text{agua}}/\text{g}_{\text{AC}}$ ). Además, AE presentó una tendencia a la retrogradación levemente menor respecto al AC.

**Tabla IV.11:** Propiedades del empastamiento para el almidón extraído por vía enzimática y el almidón comercial.

<b>Puntos del amilograma</b>	<b>Almidón</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Viscosidad (UB)</b>	<b>Temp. (°C)</b>	
A	Temperatura de gelatinización ( <i>pasting</i> ).	AE	9	2,5	63,5
		AC	8	12	62
B	Viscosidad máxima	AE	26	355	89
		AC	20	440	80
C	Viscosidad al comienzo del primer periodo de mantenimiento a 95°C.	AE	30	352,5	95
		AC	30	310	95
D	Viscosidad al comienzo del periodo de enfriamiento a 95°C.	AE	60	220	95
		AC	60	150	95
E	Viscosidad al final del periodo de enfriamiento a 50°C.	AE	90	300	50
		AC	90	240	50
F	Viscosidad al final del segundo periodo de mantenimiento a 50°C.	AE	120	317,5	50
		AC	120	235	50
BD	Estabilidad de la pasta durante la cocción ( <i>breakdown</i> ).	AE		132,5	
		AC		160	
EF	Retrogradación ( <i>setback</i> ).	AE		80	
		AC		90	



**Figura IV.12:** Amilogramas de comparación del AC y AE.

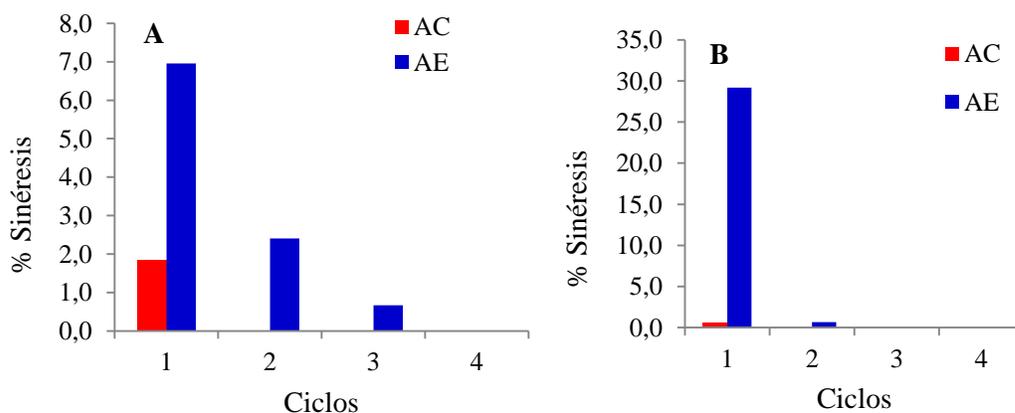
Sriroth y col. (2000) obtuvieron una temperatura de gelatinización de 69 °C y una viscosidad máxima de 359 UB para almidón de mandioca extraído con un pool enzimático de celulasas y pectinasas. La estabilidad de la pasta durante la cocción fue de 236 UB, y la tendencia a la retrogradación de 77 UB.

Sit y col. (2015) reportaron propiedades de empastamiento con diferencias no significativas para almidón de taro extraído por vía enzimática y con el método convencional, aunque la temperatura de gelatinización fue ligeramente mayor y las viscosidades fueron más bajas en las pastas de almidón extraído por el método enzimático. Dzogbefia et al. (2008) tampoco observaron diferencias significativas en las propiedades de empastamiento en el almidón de mandioca extraído por métodos enzimáticos y convencionales.

- ***Estabilidad de refrigeración y congelación***

Para la formación de cristales en la retrogradación, la amilosa y las ramificaciones de amilopectina se tienen que desligar del agua generando exudados, lo cual se conoce como el fenómeno de sinéresis (Bertolini, 2010). La evaluación de la estabilidad a la refrigeración y congelación consiste

en verificar la expulsión del agua (sinéresis) contenida en los geles como consecuencia de la reorganización de las moléculas del almidón por la retrogradación (Betancur-Ancona y col., 2001). La estabilidad de refrigeración y congelación de los geles de almidón de mandioca extraído por vía enzimática, a partir de PGasa de *W. anomalus*, se evaluaron hasta tres ciclos y se muestra en la Figura IV.13. La sinéresis debido a la refrigeración y congelación de las pastas de AE fue más alta respecto de la del AC en el primer ciclo, luego disminuyó hasta una sinéresis nula en el tercer ciclo. Las diferencias de estabilidad de refrigeración y congelación de los geles fueron mayores entre los tres ciclos para AE. Esto implica que la pasta de AE resultó ser menos estable a la ambos procesos de conservación que la pasta de AC. Las diferencias en la estabilidad de refrigeración y congelación entre los diferentes tipos de almidones pueden deberse a una variedad de factores, en particular el contenido de amilosa. La menor estabilidad de refrigeración y congelación del almidón extraído enzimáticamente puede atribuirse a la pérdida de amilosa durante la extracción (Sit y col., 2015). Debido a su alta sinéresis, el AE puede ser utilizado en aquellos alimentos que requieren ser almacenados en refrigeración y necesitan cierta exudación de humedad para proporcionar una apariencia fresca, como los flanes o salsas (Hernández Medina y col., 2008).



**Figura IV.13:** Ciclos de estabilidad de: A. refrigeración y B. congelación de los geles de almidón de mandioca extraído por vía enzimática, a partir de PGasa de *W. anomalus*

- **Claridad de las pastas**

La claridad es un parámetro clave para determinar la aplicación de los almidones en productos alimenticios debido a que pueden dar brillantez u opacidad al producto final (Betancur-Ancona 2007). Es una propiedad a tener en cuenta para la fabricación de algunos productos alimenticios como aderezos de ensaladas y productos de confitería (Ayucitra 2012).

Los valores de transmitancia (%T) obtenidos fueron de 52,32%T para AE, semejante al obtenido para AC (55,17%T). Según las referencias de la FAO (2007), el valor de la claridad en pastas de almidón varía entre 12,5-95 por ciento, por lo que la claridad de la pasta de AC y AE se encuentran dentro del rango. De acuerdo con Sánchez y Aristizábal (2007), las pastas de almidón con una transmitancia menor a 40% son consideradas opacas o turbias, mientras que aquellas con transmitancia superior a 40% son consideradas claras o transparentes. Por lo que la pasta de AE es considerada clara o transparente. Valores similares fueron reportados por Hernández Medina y col. (2008) y Vargas y col. (2016) para almidones de mandioca (51,76%T y 57,4%T, respectivamente)

- ***Temperatura de gelificación***

Según las referencias de la FAO (2007), el valor de la temperatura de gelificación en almidones de mandioca varía entre 57,5-70 °C. La temperatura de gelificación resultante para AE fue de 63 °C, mientras que para AC fue de 60 °C.

#### **IV.4. CONCLUSIONES**

El óptimo rendimiento de extracción de almidón se presentó con mandioca cruda procesada, con una relación S/L de ½, una relación EE/buffer 1:1, a 40°C y 5 h de extracción.

Al realizar la extracción a escala reactor, en las condiciones optimizadas, se obtuvo un rendimiento:  $33,06 \pm 0,49$  % (p/p). El protocolo final de extracción resultó ser: producción del EE, mandioca cruda, lavada y procesada (MP), MP + Solución EE y Buffer (Relación S/L 30/60 – PGasa = 15 UE/mL), incubación en reactor de tanque agitado de 5 L - 40 °C - 5 h – 400 rpm, filtración, lavado (2 veces), sedimentación y descarte sobrenadante, secado (45 °C – 24 h), molido y tamizado (100 mesh).

El análisis proximal del AE no presentó diferencias significativas respecto a los valores obtenidos con el del AC. El análisis funcional reveló que el AE presentó una tendencia a la retrogradación levemente menor a la del AC. La sinéresis debido a la refrigeración y congelación de las pastas de AE fue más alta respecto a la del AC. Esto implica que la pasta de AE resultó ser menos estable a ambos procesos que la de AC. Según los resultados de claridad de la pasta, la de AE es considerada una pasta clara o transparente.

Según el análisis funcional, el AE podría ser utilizado en alimentos como mermeladas, gelatinas, y en confitería para la elaboración de gomitas, etc.

El almidón de mandioca extraído utilizando el extracto enzimático de *W. anomalus* presentó características químicas y funcionales similares a la de los almidones comerciales, sin evidenciarse daño en los mismos.

En base a los resultados obtenidos se concluye que el método de extracción por vía enzimática podría ser una medida alternativa para la extracción de almidón de mandioca.

## CAPITULO V: EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE PECTINA A PARTIR DE RESIDUOS DE LIMÓN, CON PGASA DE *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS*

### RESUMEN

---

El objetivo de la presente etapa fue estudiar el efecto de diferentes factores sobre el proceso de extracción de pectina a partir de residuos de limón, mediante la enzima poligalaturonasa de *W. anomalus*, a fin de encontrar un protocolo óptimo de extracción de pectina.

Se evaluó la aplicación del EE en la extracción enzimática de pectina a partir de residuos de limón. Para ello, se estudió el efecto de diferentes factores tales como el pH, la temperatura y el tiempo de extracción utilizando un diseño factorial  $2^3$ . Luego, se optimizó la temperatura (30 a 50°C) y tiempo de extracción (1 a 8 h) utilizando metodología de superficie de respuesta, según el diseño experimental de Doehlert. Posteriormente, se comparó el rendimiento del proceso extractivo por PGasa de *W. anomalus* con aquel utilizando la enzima comercial Pectinex Ultra Clear Batch SON50034: Poligalacturonasa, provista por Frutos Patagónicos SRL, y por el método químico. Finalmente se caracterizó parcialmente la pectina extraída.

Se ajustó el pH a 5,0, pH óptimo de enzima. El óptimo rendimiento de extracción de pectina (35,69±0,741 % p/p) se muestra con una temperatura de 42°C a las 6,6 horas de extracción.

El rendimiento de extracción por el método enzimático con el EE de *W. anomalus* aumentó un ~32% respecto al método químico (24 ±0,99 % (p/p)), y ~30% respecto a la extracción con la enzima comercial (25,32±0,614 % (p/p)).

Se observó que los rendimientos obtenidos en el presente estudio empleando el EE de *W. anomalus* fueron mayores a los obtenidos por el método químico y con un enzima comercial, lo cual confirma la bondad del proceso enzimático utilizado. El método de extracción enzimática podría ser un método biotecnológico innovador, obteniéndose un producto de calidad y de manera más amigable al medio ambiente.

---

**Palabras claves:** residuo de limón, levadura pectinolítica, poligalacturonasa, extracción

## V.1. INTRODUCCION

Las pectinas tienen gran importancia en la industria alimenticia. Existen diferentes técnicas para la extracción de pectina a partir de tejidos vegetales, las cuales utilizan procedimientos físico-químicos o enzimáticos. Los procedimientos físico-químicos, si bien son los más utilizados a nivel industrial (Sakamoto y col., 1995; Contreras Esquivel y col., 1997), tienen las desventajas que conlleva el manejo, tanto de ácidos fuertes como de altas temperaturas, sin mencionar sus altos requerimientos energéticos y los problemas de contaminación ambiental que generan. En cambio, las condiciones usadas para la extracción enzimática son mucho más suaves que las empleadas mediante el método químico de extracción. Desde hace algunos años se ha informado sobre diversos trabajos relacionados con el uso de las técnicas enzimáticas, sin embargo, son escasos los estudios que relacionan dichos procesos con la optimización de las condiciones de operación (Sakamoto y col., 1994; Contreras Esquivel y col., 1997; Schroder, 2004).

Teniendo en cuenta la alta demanda de pectina requerida para diversos productos alimenticios y demás aplicaciones, surge la necesidad de desarrollar un proceso experimental a escala de laboratorio, para la extracción de este polisacárido, a partir de residuos cítricos. Esto permitiría, generar un producto de alto valor agregado, como es el caso de la pectina, a partir de residuos agroindustriales, disminuyendo así la deposición de los residuos de las industrias cítricas de la zona.

En esta parte de la tesis se estudió la extracción de pectina por vía enzimática, a partir de residuo de limón, utilizando los extractos enzimáticos de *W. anomalus*. Se trata de una tecnología innovadora, alternativa al método tradicional de extracción química con el consiguiente aporte al desarrollo de la industria agroalimentaria de la región. Con este trabajo se podrían cumplir simultáneamente varios objetivos tales como: revalorizar un residuo industrial, brindar nuevas opciones tecnológicas y minimizar un impacto ambiental.

## V.2. MATERIALES Y METODOS

### V.2.1. *Obtención del Extracto Enzimático.*

El EE se obtuvo a partir de cultivos de la levadura *W. anómalus* en el medio de cultivo optimizado en las etapas anteriores, compuesto por glucosa (10 g/L, FCE), residuo de limón (2 % p/v, inductor), sales y vitaminas; a escala biorreactor, agitación (550 rpm), durante 12 h a 30 °C, según se detalló en el capítulo III.

### ***V.2.2. Obtención de la materia prima.***

Los residuos de limón fueron proporcionados por una agroindustria local, Cooperativa Tabacalera de Misiones (CTM). Se utilizaron residuos de limón para esta etapa de extracción de pectina debido a que fue el residuo con mayor contenido de pectina, según se detalló en el capítulo III.

### ***V.2.3. Protocolo de extracción de pectina***

- ***Pretratamiento del material vegetal***

Los residuos de limón se recibieron de la industria en piezas pequeñas, luego, se secaron durante toda la noche a 45 °C en un horno de secado por aire caliente (0,4 m / s), se molieron en un molinillo (Arcano, 24000 rpm, 460W), se pasaron a través de un tamiz de 35 mesh para tener partículas de tamaño uniforme del material, y finalmente, se conservaron en recipientes libre de humedad, hasta el momento de ser utilizado (Ahmed y Mostafa, 2013; Göğüş y col., 2015; Ortiz y col., 2015).

- ***Tratamiento del material vegetal con la enzima***

Se colocaron 30 g del material vegetal (residuo de limón), procesado según se describió anteriormente, en frascos Erlenmeyer de 250 mL, a los que se les agregó 30 mL de buffer acetato de sodio/ácido acético (BAc) (0,2 M, pH 5,0) y 30 mL del EE. Los mismos se incubaron a 40°C en baño termostatzado rotatorio (New Brunswick, modelo 676; 1,27 cm de excentricidad) a 150 rpm, durante 6 h. Se preparó un blanco con agua destilada en lugar de enzima, sometiéndolo a iguales condiciones de incubación (Fig. V.1 ).



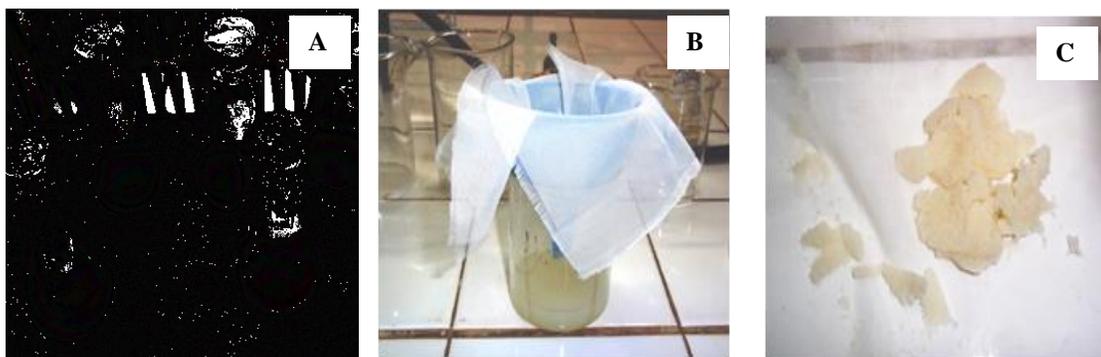
**Figura V.1:** Frascos Erlenmeyer conteniendo la mezcla de reacción (material vegetal +EE+buffer), incubados en shaker rotatorio a 150 rpm.

- ***Recuperación de la pectina del sobrenadante***

Finalizada la etapa de incubación, la fase líquida fue separada de la fase sólida (residuo despectinizado) mediante filtración, empleando tela muselina de nylon y aplicando presión manual.

El residuo despectinizado fue lavado con 50 ml de agua destilada (2 veces) y filtrado con tela de muselina (Fig.V.2).

El sobrenadante se mezcló con 2 volúmenes de etanol frío al 96 % (v/v) y se refrigeró durante 2 h a 5 °C, para precipitar el material polimérico en forma de gel. Este gel de pectina con posibles pequeñas cantidades de materiales insolubles como celulosa, fue recuperado mediante centrifugación durante 30 min a 3500 rpm, para eliminar oligómeros y monómeros no precipitables con etanol, descartándose el sobrenadante.



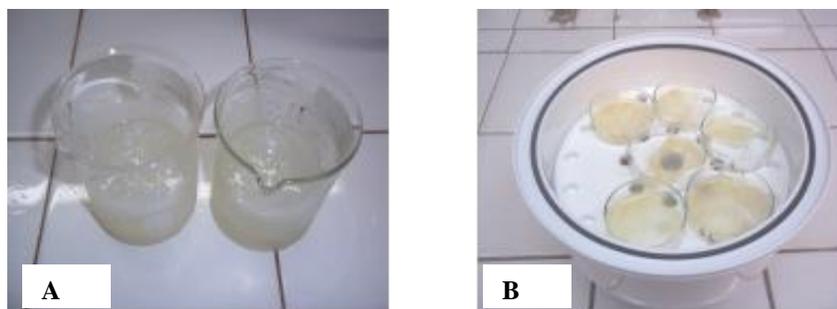
**Figura V.2:** Frascos Erlenmeyer conteniendo la mezcla de reacción luego de la etapa de incubación (A), filtración de la mezcla de reacción con tela de muselina (B), residuo despectinizado (C)

- ***Secado del gel de pectina***

El gel obtenido fue colocado en cajas de Petri previamente taradas y secado en estufa a 45- 50°C hasta peso constante y fue denominado material insoluble en etanol (MIE) (Fig. V.3). La humedad de la pectina es un factor que incide directamente en la estabilidad de la pectina porque por sus características químicas permite el crecimiento de microorganismos, especialmente hongos. Una pectina muy húmeda es difícil de pulverizar, se adhiere a las superficies y tienen menor estabilidad y tiempo de vida útil. Una pectina secada a elevada temperatura puede ser resistente a la molienda y presentar un color más oscuro (Baltazar Flores y col., 2013).

El rendimiento en extracción de pectina se reporta como gramos de MIE por cada 100 g de materia prima utilizada (residuo de limón) (Contreras Esquivel, 1999; Zapata y col., 2009; Munhoz y col., 2010; Dos Santos Siqueira, 2012).

En todos los casos, las experiencias se realizaron por duplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios.



**Figura V.3:** Gel de material polimérico, luego de la precipitación con etanol (A). Material insoluble en etanol secado a 40 °C (B)

#### ***V.2.4. Influencia de diversos factores sobre el proceso de extracción de pectina***

La extracción enzimática de pectina es un proceso clásico de catálisis heterogénea, donde una enzima soluble actúa sobre un sustrato insoluble. Diferentes factores influyen en este tipo de reacciones a saber: estructura de la partícula y la composición del medio de reacción, además de otras variables operacionales como el pH y la temperatura (Cacace y Mazza, 2003; Herodez y col., 2003; Pinelo y col., 2005; Spigno, 2007).

- ***Diseño Factorial 2<sup>3</sup>***

Mediante la aplicación de un diseño factorial 2<sup>3</sup>, se evaluó la capacidad de extracción de pectina con residuo de limón, del EE de PGasa de *W. anomalus* a dos niveles, alto (+1) y bajo (-1), variando las siguientes variables operacionales: pH (3 - 6), temperatura (30 – 50 °C) y tiempo de hidrólisis (1 – 8 h). Los niveles se seleccionaron por estar dentro del rango de estabilidad de la enzima PGasa de *W. anomalus* y teniendo en cuenta los resultados en los capítulos anteriores (Martos y col., 2013b; Martos y col., 2014). Las variables codificadas y las respectivas variables reales, se presentan en la Tabla V.1. Basado en el diseño factorial, se confeccionó una matriz con 8 experimentos (Tabla V.2). Las experiencias se realizaron en un orden aleatorio, con tres repeticiones y los resultados se presentan como valores medios. El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo con el programa estadístico Statgraphics Centurión XV (Stat Graphics Centurión XV, 2009).

**Tabla V.1:** Valores reales y codificados de los factores según el diseño factorial  $2^3$ 

Factor	Código	Niveles del factor	
		Alto (+1)	Bajo (-1)
Temperatura de extracción (°C)	A	50	30
pH	B	6	3
Tiempo de extracción (h)	C	8	1

**Tabla V.2:** Diseño factorial  $2^3$ , a niveles alto y bajo para cada factor.

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

- **Superficie de respuesta: diseño de Doehlert**

En la presente etapa del trabajo, se optimizó el efecto de la temperatura y el tiempo de incubación, sobre la extracción de almidón de mandioca por el EE de *W. anomalus* mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR). Se evaluó el proceso de extracción de almidón a diferentes temperaturas (30 a 50°C), dentro del rango de estabilidad de la enzima, y tiempos de incubación (1 a 8 h), utilizando el diseño experimental de Doehlert (Martos y col., 2014a, Doehlert, 1970). El valor de  $n_0$  se fijó a 3; por lo tanto, se realizaron un total de nueve experiencias, las que estudiaron el efecto de dos variables independientes a cinco niveles cada una, con tres repeticiones en el punto central (Butiuk y col., 2018).

### V.2.5. Caracterización de la pectina extraída

- **Determinación del contenido de ácidos urónicos en el MIE**

El contenido de AG indica la pureza de la pectina extraída y se sugiere que no sea menor al 65% (Food Chemicals Codex, 1996).

Se realizó la determinación del contenido de AG en el MIE siguiendo el método colorimétrico descrito por Melton and Smith, 2001. En este procedimiento se emplea el reactivo *m*-

hidroxidifenilo (mHDP), en presencia de ácido sulfámico ( $\text{H}_3\text{NSO}_3$ ) para evitar la interferencia por azúcares neutros. La absorbancia de los tubos se midió en un espectrofotómetro (Beckman DU 640, a 37 °C) a 525 nm.

#### *Fundamento de la técnica*

El ácido galacturónico es la unidad fundamental de las cadenas de las sustancias pécticas y la cuantificación de este ácido es el método primario para determinar la cantidad de material péctico en la muestra. Se ha encontrado que el ensayo del m-hidroxidifenilo es específico para ácidos urónicos.

#### *Reactivos y soluciones:*

a) Solución stock 20 mg/mL de ácido galacturónico:

Se pesaron 20 mg de AG seco (mantenido en desecador por cinco días) y se disolvieron en 1 mL de agua destilada. Esta solución se mantuvo congelada. A partir de ella y al momento de utilizar, se preparó una solución de 200 µg/mL tomando 100 µL de la solución stock y llevando a volumen de 10 mL final con agua destilada en matraz aforado. Esta última se utilizó para realizar las diluciones correspondientes a la curva de calibración del método. Para el cálculo de la concentración de AG se tuvo en cuenta la hidratación del compuesto con una molécula de agua, los valores se refieren entonces a AG anhidro.

b) Solución de *m*-hidroxidifenilo (mHDP):

Se preparó una solución al 0.15 % de mHDP en solución de hidróxido de sodio 0,5% p/v. Se almacenó en botella de vidrio color caramelo a temperatura de 4°C. En estas condiciones, la solución es estable por aproximadamente 1 mes.

c) Solución de tetraborato de sodio 75 mM:

Se disolvieron 1,501 g de tetraborato de sodio en 90 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se mantuvo en agitación por toda la noche hasta disolución completa y se ajustó el volumen final a 100 mL con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Se debió preparar solamente la cantidad necesaria para el uso inmediato, y se almacenó a temperatura ambiente.

d) Solución de ácido sulfámico/sulfamato de potasio (4.0 M) pH 1,6:

Se pesaron 38,84 g de ácido sulfámico y se agitó vigorosamente en 50 mL de agua. Se agregó solución de hidróxido de potasio saturada hasta disolución del sólido. Se colocó la solución en frío y se ajustó el pH a 1,6 con la solución saturada de hidróxido de potasio. Se llevó a volumen de 100 mL con agua en un matraz. Esta solución se almacenó a temperatura ambiente.

#### *Preparación de la muestra*

El protocolo de preparación de la muestra para el ensayo colorimétrico consistió en pesar 5 mg de MIE (libre de humedad), los cuales fueron colocados en tubos de ensayo y dispersados íntimamente en 1 ml de  $H_2SO_4$ , en baño de hielo. La mezcla se agitó en frío por 5 min. Se agregó 1 mL más de  $H_2SO_4$  en baño de hielo y se agitó nuevamente por 5 min. Luego se agregó 1 mL de agua destilada en baño de hielo y se volvió a agitar en frío por 5 min. Cada etapa de agitación en frío se realizó mediante un mezclador vortex cuidando de no salpicar las paredes del tubo con el sólido. El material hidrolizado se transfirió a una probeta, se llevó a 10 mL de volumen final con agua destilada en baño de hielo, y se homogenizó por agitación. Este material se utilizó para determinar el contenido ácidos urónicos empleando el reactivo mHDF/ácido sulfámico.

#### *Ensayo colorimétrico*

Luego de ensayar varias diluciones de la solución de MIE obtenida según se describió en la etapa anterior, a fin de evaluar cuál de ellas tendría una absorbancia dentro del rango lineal de la curva de calibración del método, se concluyó que la dilución 1/4 era la que mejor se ajustaba. La dilución de las muestras se realizó con una solución de  $H_2SO_4$  al 20%.

Se colocó una alícuota de 400  $\mu$ L de la muestra recientemente preparada y diluida en tubos de vidrio de borosilicato y se agregó 40  $\mu$ L de la solución de ácido sulfámico/sulfamato de potasio pH 1,6 a cada tubo. Los tubos se refrigeraron en baño de agua/hielo y se agitaron con vortex. Se adicionó 2,4 mL de solución de tetraborato de sodio a todos los tubos y se agitaron nuevamente. A continuación, los tubos se colocaron en baño de agua hirviendo por 20 min y posteriormente se enfriaron inmediatamente colocándolos en un baño de hielo durante 10 min. Se agregaron 80  $\mu$ L de la solución de mHDP a dos tubos de cada muestra y al tubo blanco de reactivo. Al tercer tubo de muestra se agregaron 80  $\mu$ L de hidróxido de sodio 0,5% p/v (tubo control de muestra). Todos los tubos se agitaron con vortex. Como blanco se empleó una solución de  $H_2SO_4$  15%. Se midió absorbancia a 525 nm. (Fig. V.4). Simultáneamente a la medida de las muestras se realizó la curva de calibración de AG (Sigma), en el rango 100 a 700 mg/L.



#### **Figura V.4:** Reacción del m-hidroxidifenilo

- ***Determinación del grado de esterificación***

El grado de esterificación de una pectina se define como el porcentaje de grupos carboxilos esterificados con metanol (número de moles de metanol por 100 moles de AG).

La determinación del grado de esterificación de la pectina obtenida se efectuó empleando el método titulométrico (Singthong y col., 2004; Zapata Zapata, 2008).

*Procedimiento:*

Se disolvieron 50 mg de una muestra seca de MIE en 10 mL de agua destilada, luego se agregaron 2 gotas de fenolftaleína como indicador y se tituló con NaOH 0,5 M. El volumen empleado en esta titulación se denominó V1. Posteriormente, se agregó 1 mL de NaOH (0,5 M), se agitó vigorosamente la muestra y se dejó reposar por 15 min con el fin de desesterificar completamente la pectina. A continuación la solución fue neutralizada con 1 mL de HCl (0,5 M) y se agitó hasta que el color rosa desapareció. Se tituló nuevamente con NaOH (0,5 M) hasta que un color rosa pálido persistió luego de una agitación vigorosa (punto final). Este volumen de esta titulación se denominó V2. El grado de esterificación (GE) fue calculado mediante la siguiente ecuación (Kim y col., 2000, Singthong y col., 2004; Zapata Zapata, 2008):

$$GE = \frac{V2 * 100}{(V1 + V2)}$$

- ***Determinación capacidad de gelificación***

La prueba experimental para hallar el poder de gelificación de la pectina no se efectuó ya que no fue posible conseguir el Ridgelímetro, equipo empleado para este fin. Sin embargo, se realizó una evaluación de la pectina extraída como agente gelificante en un producto alimenticio mediante la elaboración de una mermelada. Se emplearon frutillas frescas, las cuales fueron lavadas y cortadas manualmente en trozos pequeños. Para la elaboración de la mermelada fueron mezclados los componentes en las proporciones en las que aparecen en la Tabla III.3. La elección de la

formulación se basó en las condiciones de gelificación que fueron estudiadas con anterioridad por otros autores (Betancourt, 2007), ajustando la cantidad de pectina a usar según el poder gelificante de ésta y el tipo de fruta empleado en la elaboración de la mermelada.

**Tabla V.3:** Proporciones para obtener 100 g de mermelada

Componente	% (p/p)
Frutas	24
Azúcar	50
Pectina	0,75
Agua	25
Ac cítrico	0,05

Para la preparación de la mermelada se siguieron los siguientes pasos:

1. Se dispersó mecánicamente la pectina en el azúcar y la fruta.
2. Se agregaron todos los sólidos al agua y se calentó para disolver la pectina.
3. Se ajustó el pH con ácido cítrico
4. Se dejó enfriar y reposar.
5. Se evaluó en forma visual las características del gel y se lo comparó con otro obtenido sin pectina.

### V.3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### V.3.1. Influencia de diversos factores sobre el proceso de extracción de pectina

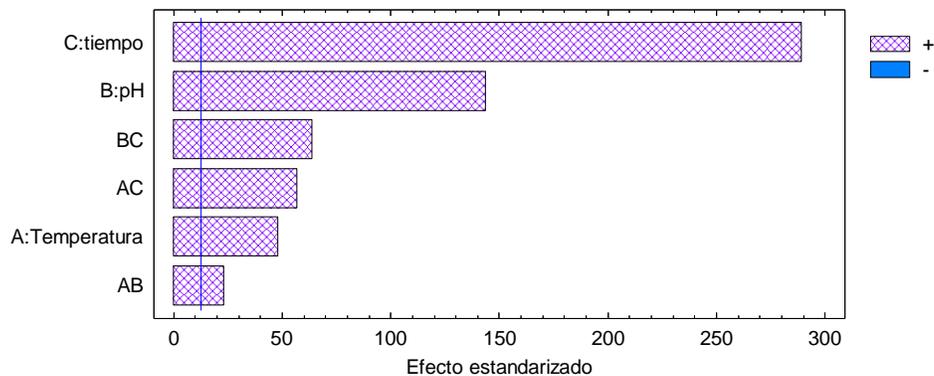
- *Diseño Factorial 2<sup>3</sup>*

En la Tabla V.4 se presenta el Análisis de Varianza para la extracción de pectina con PGasa de *W. anomalus* mediante el diseño factorial 2<sup>3</sup>. En la Figura V.5 se presenta el Diagrama de Pareto.

**Tabla V.4:** Análisis de Varianza para la extracción de pectina con PGasa de *W. anomalus* mediante el diseño factorial 2<sup>3</sup>.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	7,87132	1	7,87132	2296,24	0,0133
B:pH	70,8252	1	70,8252	20661,28	0,0044
C:tiempo	286,5	1	286,5	83578,25	0,0022
AB	1,81623	1	1,81623	529,83	0,0276
AC	11,0318	1	11,0318	3218,23	0,0112
BC	14,0376	1	14,0376	4095,07	0,0099
Error total	0,00342792	1	0,00342792		
Total (corr.)	392,085	7			

R<sup>2</sup>: 99,99%



**Figura V.4:** Diagrama de Pareto para la extracción de pectina con PGasa de *W. anomalus*.

La Tabla de ANOVA (Tabla V.4) muestra que el pH, la temperatura, el tiempo de extracción y sus interacciones entre éstos factores, influyeron significativamente en la extracción enzimática de pectina, siendo el valor de P menor a 0,05, para un nivel de confianza del 95,0%. El R<sup>2</sup> estadístico (0,99) indicó que el modelo presentó un buen ajuste a los datos experimentales.

Como se observa en el Diagrama de Pareto (Fig. V.4), el tiempo de extracción fue la variable operacional más significativa, seguida del pH, las interacciones y la temperatura.

- **Superficie de respuesta: diseño de Doehlert**

Teniendo en cuenta el rango de pH de estabilidad de la enzima PGasa de *W. anomalus* y los resultados en los capítulos anteriores, se fijó un pH 5,1 para realizar la extracción de pectina (Martos y col., 2013b; Martos y col., 2014). Utilizando metodología de superficie de respuesta, mediante el diseño experimental de Doehlert, se optimizaron las dos variables operacionales restantes (temperatura y tiempo de extracción). Se realizó una superficie de respuesta para temperatura versus pH y otra para temperatura vs tiempo. La Tabla V.5 muestra la matriz del diseño Doehlert y los resultados del rendimiento de extracción de pectina con PGasa de *W. anomalus* obtenidos en cada experimento.

**Tabla V.5:** Valores codificados y reales, y rendimientos de extracción de pectina obtenidos del diseño Doehlert.

Exp.	Valores reales		Valores codificados		Rendimiento <sup>(a)</sup>	
	Temperatura	tiempo	Temperatura	tiempo	MIE	(% p/p)
1	50	4,5	1	0	0,589	25,78
2	45	1	0,5	-0,866	0,141	6,17
3	35	1	-0,5	-0,866	0,086	3,76
4	30	4,5	-1	0	0,487	21,31
5	35	8	-0,5	0,866	0,681	29,81
6	45	8	0,5	0,866	0,739	32,34
7	40	4,5	0	0	0,735	32,17
8	40	4,5	0	0	0,731	31,99
9	40	4,5	0	0	0,741	32,43

<sup>(a)</sup>Media de tres valores, DS dentro del 10%.

Las interacciones entre variables resultaron no significativas siendo el valor de P mayor a 0,05, para un nivel de confianza del 95,0%. Los coeficientes lineales y cuadráticos significativos, se muestran en la Tabla V.6. En la tabla V.7 se presenta el análisis de varianza para la extracción de pectina por PGasa por *W. anomalus* mediante el diseño de Doehlert.

**Tabla V.6:** Coeficientes y p-valores calculados por ANOVA,

(diseño de Doehlert).

	Coeficiente
constante	32,06
Temperatura	2,31
Tiempo	15,03
Temperatura <sup>2</sup>	-8,51
Tiempo <sup>2</sup>	-15,94

R<sup>2</sup>=99,98%

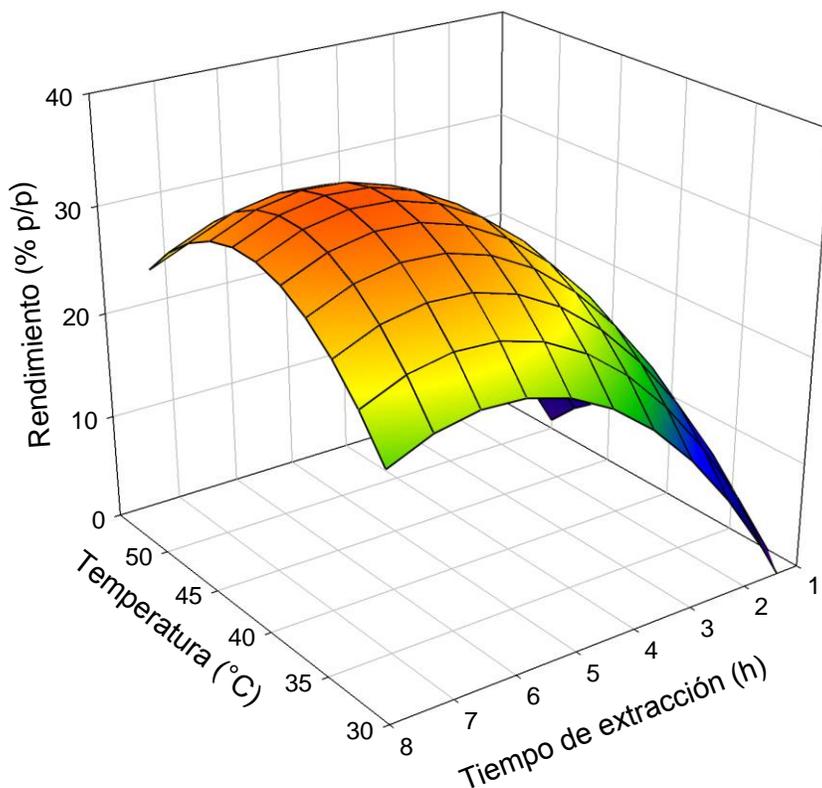
**Tabla V.7:** Análisis de Varianza para la extracción de pectina por PGasa por *W. anomalus* mediante el diseño de Doehlert.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	16,0754	1	16,0754	302,27	0,0033
B:Tiempo	678,108	1	678,108	12750,56	0,0001
AA	72,3861	1	72,3861	1361,09	0,0007
AB	0,0257603	1	0,0257603	0,48	0,5584
BB	254,03	1	254,03	4776,57	0,0002
Error total	0,106365	2	0,0531826		
Total (corr.)	959,831	7			

R<sup>2</sup>: 99,98%

La extracción de pectina por PGasa por *W. anomalus* puede ser predicha por la ecuación de regresión que se presenta a continuación (ecuación V.1):

$$\text{Rendimiento \%} = 32,06 + 2,31\text{Temperatura} + 15,03\text{Tiempo} - 8,51\text{Temperatura}^2 - 15,94\text{Tiempo}^2 \quad (\text{ec. V.1})$$



**Figura V.5:** Superficie de respuesta temperatura vs tiempo para la extracción de pectina.

Los valores negativos de los efectos cuadráticos para las variables evaluadas, indican la existencia de un máximo en función de las mismas. Esto también puede observarse en la superficie de respuesta (Fig. V.5) donde el óptimo rendimiento de extracción de pectina ( $35,69 \pm 0,741$  % p/p) se muestra con una temperatura de  $42^\circ\text{C}$  a las 6,6 h de extracción.

De estudios previos se demostró que la enzima PGasa por *W. anomalous* permanece estable hasta los  $50^\circ\text{C}$ , durante 10 h de incubación (Martos y col., 2014).

Los blancos de reacción resultaron entre 2,96 hasta 18,013 % p/p. A temperaturas de 50 y  $45^\circ\text{C}$ , resultó una solubilización significativa, aunque mucho menor que con la acción de la enzima. La solubilización de los blancos se tomó como parámetro de la degradabilidad química del sustrato bajo condiciones de incubación de la reacción enzimática (Contreras Esquivel, 2003).

Se han reportado rendimientos de extracción de pectina de albedo de limón por método enzimático de 27 g de pectina/100 g de material seco empleando PGasa de *A. kawachii* y de 17,6 g de pectina/100 g de material seco con PGasa de *A. niger* (Contreras Esquivel, 2003). Zapata, Zapata y

col. (2009) reportaron rendimientos del 27 % (g MIE/g albedo) utilizando protopectinasa-SE producida por el hongo levaduriforme *Geotrichum klebanii* y del 10 % (p/p) para los blancos. Vasco-Correra y Zapata Zapata (2017), al evaluar la extracción de pectina de maracuyá utilizando una PPasa de *G. klebahnii* ATCC 42397, informaron sus mayores rendimientos de extracción de pectina entre 17% y 25% (p/p) a 37°C, mientras que los menores a 44 °C, atribuyéndolo a la inestabilidad de la enzima a esta última temperatura.

### V.3.2. Comparación de rendimientos de extracción con una enzima comercial y el método químico

En la Tabla V.8 se presentan los rendimientos de extracción de pectina de cáscara (albedo) de limón con la enzima comercial y por el método químico, y su comparación con el EE de *W. anomalus*.

**Tabla V.8:** Rendimientos de MIE con diferentes métodos de extracción.

Método de extracción	Especificaciones	Rendimiento %
Enzimático*	PGasa <i>W. anomalus</i>	35,69±0,74
Enzimático*	PGasa comercial Pectinex Ultra Clear Batch SON50034	25,32 ± 0,61
Químico	-	24,17±0,99
Control	Sin enzima	8,42±0,59

\* Condiciones de extracción: 40 °C, 6 h, pH: 5,0, 180 rpm.

El rendimiento de extracción por el método químico fue de 24 ±0,99 % (p/p), utilizando la enzima comercial de 25,32±0,614 y con el EE de *W. anomalus* de 35,69±0,74 (Tabla V.8). Lo anterior indica un aumento del ~32% en la extracción de pectina con el EE de *W. anomalus* respecto al método químico, y ~30% respecto a la extracción con la enzima comercial.

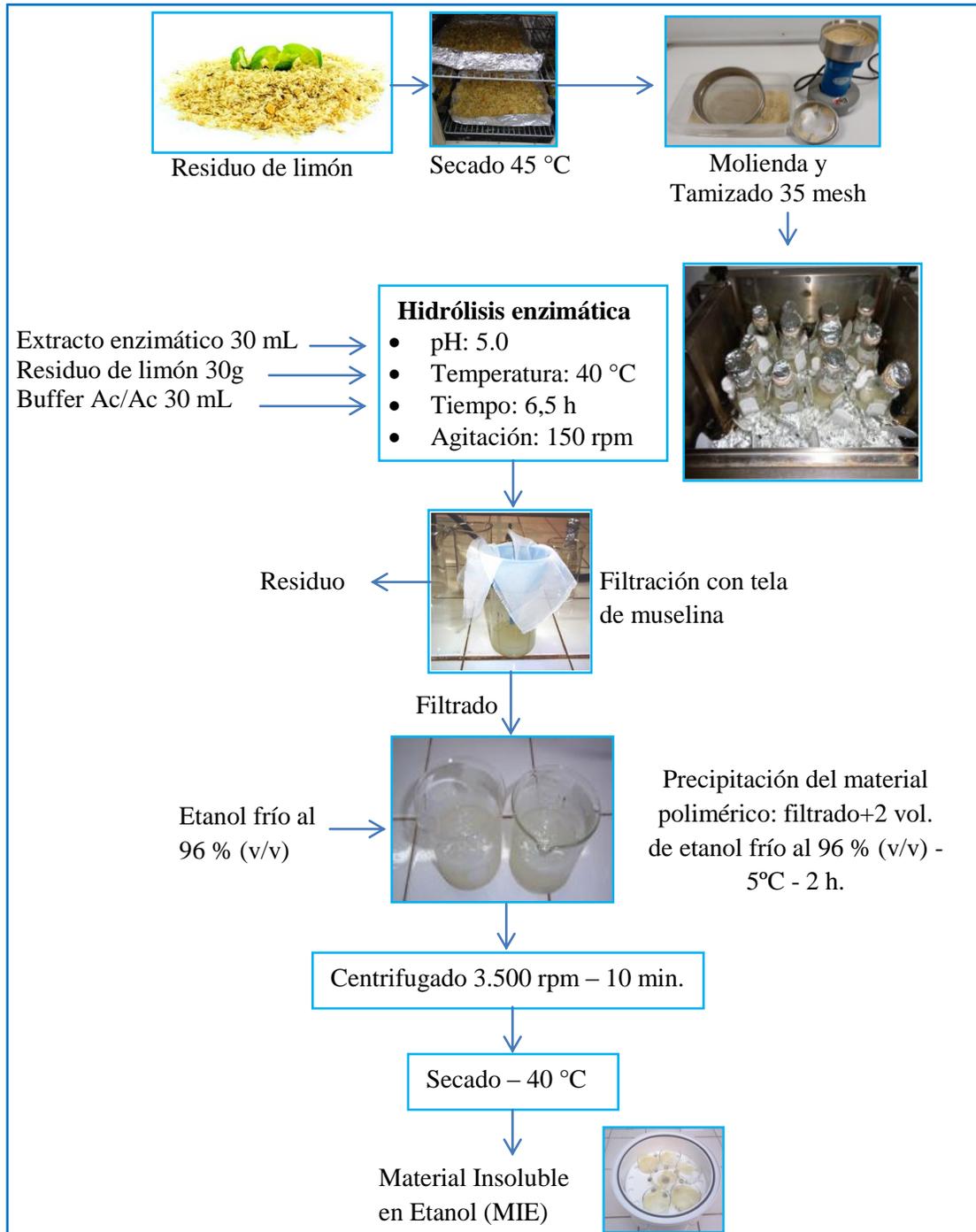
Sakamoto y col. (1994) informaron rendimientos del 10 al 30 % más altos al realizar la extracción por vía enzimática, respecto a la extracción química. Otros autores informaron valores de rendimientos para extracciones de pectina mediante hidrólisis química a partir de cítricos de 22 g/100 g protopectina de limón (Sakamoto y col. 1995), 20,2 g pectina/100 g albedo seco a partir de

albedo de limón (Contreras Esquivel, 2003). Vasco-Correra y Zapata Zapata (2017), al evaluar la extracción de pectina de maracuyá utilizando una PPasa de *G. klebahnii* ATCC 42397, informaron rendimientos de extracción de pectina entre 17% y 25% (p/p).

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, 2008), por ello, la medida de peso seco realizada en el ensayo enzimático podría incluir a ambos componentes, a diferencia de la medida de peso seco realizada en el ensayo químico, en el cual existe una hidrólisis total o parcial del material celulósico además de la pectina. Esta hidrólisis genera azúcares simples, solubles en etanol, razón por la cual esta fracción no es detectada en los resultados de peso seco (Zapata, 2003). Se observa que los rendimientos obtenidos en el presente estudio empleando el extracto enzimático de *W. anomalus* son mayores a los descriptos por otros autores, lo cual confirma la bondad del proceso enzimático utilizado.

### V.3.3. Protocolo de extracción definitiva

El esquema general definitivo del proceso de extracción de pectina a partir de residuo de limón y utilizando el extracto enzimático de *W. anomalus* se detalla en la Figura V.6.



**Figura V. 6:** Esquema del proceso completo de extracción enzimática de pectina.

### V.3.4. Caracterización de la pectina

- **Determinación del contenido de ácidos urónicos en el MIE**

Los valores de concentración de AGA (mg/L) en el MIE obtenido por los métodos enzimático y químico, se muestran en la Tabla V.9.

En la Tabla V.9 puede observarse que los valores de concentración de AGA del MIE obtenidos por el método enzimático fueron superiores a los valores correspondientes a la extracción por el método químico. Un valor promedio de 413 mg/L de AGA en el MIE fue obtenido por vía enzimática, a 40°C, pH 5,0 y 6,5 h, mientras que por el método químico la concentración fue de 336 mg/L de AGA.

**Tabla V.9:** Concentración de AG en el MIE, obtenido por los métodos enzimático y químico.

Método	AG (mg/L)	AG (mg/L)*	Porcentaje % (g <sub>AG</sub> /100 g <sub>MIE</sub> )
Enzimático	436,00	412,889 ± 20,713	82,57
	406,66		
	396,00		
	253,33		
Químico	306,67	336,00 ± 25,957	67,2
	345,33		
	356,00		

Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones. Condiciones de extracción: Método en enzimático: 40 °C, pH 5,0, 6,5 h, agitación: 150 rpm. Método químico: 90 °C, pH=2, 60 min, con agitación.

La extracción de un compuesto a partir de un tejido vegetal tiene como objetivo la obtención de un elevado rendimiento de extracción, con un mínimo de impacto en las propiedades del compuesto extraído y además minimizar la extracción de compuestos indeseables. Dentro de ese contexto, teniendo en cuenta que la pectina es un polisacárido que contiene elevado contenido de AG (Guidi y col., 2010), mediante la extracción enzimática realizada en este estudio el contenido de AG en el MIE resultó ser del 82,57% (g<sub>AGA</sub>/100 g<sub>MIE</sub>), indicando que la pectina extraída es lo suficientemente pura y que no contiene cantidades considerables de impurezas por presencia de proteínas, almidón y azúcares, entre otros.

- **Determinación del grado de esterificación**

Los valores de grado de esterificación del MIE extraído del albedo por método enzimático, se muestran en la Tabla V.10.

El grado de esterificación de la pectina obtenida empleando los extractos de *W. anomalus* fue de 79,10 %  $\pm$  0,0082, el valor indica que se trata de pectina de alto metoxilo (HM).

**Tabla V.10:** Grado de esterificación del MIE obtenido por métodos enzimático

Ensayo	V <sub>1</sub> (mL)	V <sub>2</sub> (mL)	GE	GE promedio
Ensayo 1	0,08	0,29	78,37 %	79,10 % $\pm$ 0,00827
Ensayo 2	0,07	0,28	80 %	
Ensayo 3	0,08	0,30	78,94 %	

Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones. Cond. de extracción: 40 °C, pH 5,0, 6,5 h, 150 rpm.

El grado de esterificación constituye una propiedad química muy importante relacionada con la velocidad de gelificación y solidificación de la pectina, como se describió anteriormente. Como se trata de una pectina HM esto implica que puede ser usada en la formulación de productos como jaleas y mermeladas pero no en productos dietéticos (con bajo agregado de azúcar). Específicamente Ultra Rapid Set es la clasificación de la pectina HM cuyo grado de esterificación es mayor al 74%; porque su tiempo de gelificación es rápido, lo que conlleva a dispersiones uniformes de la fruta y previene su flotación cuando se utiliza en la elaboración de mermeladas.

- **Determinación del poder de gelificación**

Se pudo comprobar a partir de la formulación de un gel, que la pectina extraída es adecuada para elaborar mermeladas. Estos resultados se establecieron por comparación entre la formulación con una composición del 50% de azúcar y del 24 y 0,75% de fruta y pectina respectivamente y otra formulación sin pectina, como se observa en la Fig. V.6.



**FiguraV.6:** Gelificación de pectina obtenida con el EE de *W. anomalus*

#### V.4. CONCLUSIONES

- El extracto enzimático, con actividad PGasa, fue capaz de extraer pectina a partir de residuos de limón, verificando la capacidad PPasa de la enzima.
- El pH, la temperatura y el tiempo de extracción, influyeron significativamente en los niveles de solubilización de pectina.
- El óptimo rendimiento de extracción de pectina ( $35,69 \pm 0,741$  % p/p) se muestra con una temperatura de 42°C a las 6,6 horas de extracción.
- Se observó que los rendimientos obtenidos en el presente estudio empleando el EE de *W. anomalus* fueron mayores a los obtenidos por el método químico y con la enzima comercial.
- El grado de esterificación de la pectina extraída fue del 79,10 %, siendo una pectina HM.
- La riqueza en ácido galacturónico (AGA) de la pectina extraída fue del 82,57 %, indicando que la misma es lo suficientemente pura.
- La pectina extraída presentó buena capacidad gelificante, para su uso en mermeladas.
- El extracto enzimático de *W. anomlus*, resultó de potencial importancia para su utilización en la extracción de pectina a partir de residuo de limón, un residuo de las industrias cítricas.

## REFERENCIAS

- Ahmed, SA. & Mostafa, FA. (2013). Utilization of orange bagasse and molokhia stalk for production of pectinase enzyme. *Braz. J. Chem. Ing.* 30 (3), 449–456.
- Ahmed, I.; Zia, M. A.; Hussain, M. A.; Akram, Z.; Naveed, M. T.; Nowrouzi, A. (2015). Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *J. Radiation Research App. Sci.* 9 (2), 148–154.
- Alvis, A., Velez, C.A.; Villada, H. S.; Mendoza, M. R. (2008). Análisis físico-químico y morfológico de almidones de ñame, yuca y papa y determinación de la viscosidad de las pastas. *Información Tecnológica*, 19 (1), 19-28.
- Alarcón, F.; Dufour, D. (1998), “Almidón agrio de yuca en Colombia” Cali Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. p. 1-25.
- Alaña, A.; Gabilondo, A.; Hernando, F.; Moragues, M.D.; Dominguez, J.B.; Llama, M.J. & Serra, J.L. (1989). Pectinlyase production by *Penicillium italicum* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:1612-1616.
- Albersheim, P.; Neukom, H. & Deuel, H. (1960). Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 90:46-51.
- Alkorta, I.; Garbiso, C.; Llama, M.J. & Serra, J.L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes- a review. *Process Biochemistry*, 33:21-28.
- Anuradha, K.; Naga Padma, P.; Venkateshwar, S.; Reddy, G. (2014). Selection of Nutrients for Polygalacturonase Production by *AspergillusAwamori* MTCC 9166 Using Plackett-Burman Design. *Indian J. Biotechnol.*, 13: 502–7.
- A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemist International; EUA.
- Ayucitra, A. 2012. Preparation and Characterisation of Acetylated Corn Starches. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 3 (3): 156-159.
- Baltazar Flores, R.; Mariños Carbajal, D.; Rodríguez Baca, N.; Rodríguez, D.S. (2013). Optimización de las condiciones de extracción de pectina a partir de cáscara de limón francés (*Citrus médica*) utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Agroindustrial Science* 2: 77-89.
- Berlanga-Malacara; Ramos-Ponce, L.M; Montañez J.C.; Charles-Rodríguez A.V.; Aguilar, C.N; Herrera R.; Contreras-Esquivel J.C. (2005). Extracción enzimática de almidón de jícama (*pachyrius erosus l.*) XI Congreso Nacional De Biotecnología Y Bioingeniería. Yucatán. México.
- Bertolini, A. 2010. Starches: Characterization, properties and Applications. First Edition. Editorial CRC Press: Taylor & Francis group. USA. 276 pp.

Betancur-Ancona, D. et al. 2001. Physicochemical and functional characterization of baby lima bean (*Phaseolus lunatus*) starch. *Starch/Stärke*, 53(5): 219-226.

Bhushan, S.; Kalpana K.; Madhu S.; Bikram S.; Ahuja P. S. 2008. Processing of Apple Pomace for Bioactive Molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*, 285–96.

Biekman, E.S.A. (1992). Enzymatic maceration of potatoes for the production of instant dried mashed potato: modelling of the desintegration process. *Food Biotechnology*, 6:19-33.

Blanco, P.; Sieiro, C. & Villa, T.G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts- mini review. *FEMS Microbiology Letters*, 175:1-9.

Blanco, P.; Sieiro, C; Diaz, 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*, 13:711-712.

Bonnin, E.; Brunel, M.; Gouy, Y.; Lesage-Meessen, L.; Asther, M. & Thibault, J.F. (2001). *Aspergillus niger* I-1472 and *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533, selected for the biotransformation of ferulic acid to vanillin, are also able to produce cell wall polysaccharide-degrading enzymes and feruloyl esterases. *Enzyme and Microbial Technology*, 28:70-80.

Botella, C.; Diaz, A.; de Ory, I.; Webb, C.; Blandino, A. (2007). Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochem.*, 42 (1): 98–101.

Brousse, M. M.; Nieto, A. B.; Linares, A. R.; Vergara, M. L. (2012). Cinética de absorción de agua en purés deshidratados de mandioca (*Manihot esculenta crantz*). *RVCTA*, 3 (1): 080-096 (in Spanish).

Brzozowski, B. & Lewandoska. (2014). Prolyl Endopeptidase - optimization of medium and culture conditions for enhanced production by *Lactobacillus acidophilus*. *Electron. J. Biotechnol.* 17, 204–210.

Butiuk, A.P., Adachi, O., Hours, R.A. (2015). Yerba mate as a novel inducer for fungal chlorogenate hydrolase production. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 4 (3), 327–334.

Butiuk, A. P.; Maidana, S. A.; Martos, M.A.; Akakabe, Y.; Adachi, O.; Hours, R. A. (2018). Characterization and application of fungal chlorogenate hydrolase to enzymatic breaking down of chlorogenate from yerba mate. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 14: 395–401.

Cacace, J.E.; Mazza G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science* 68(1): 240-248.

Call, H.P.; Walter, J. & Emeis, C.C. (1985). Maceration activity of an endopolygalacturonase from *Candida macedoniensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 9:325-348.

- Cavalitto, S.F.; Arcas, J.A. & Hours, R.A. (1996). Pectinase production profile of *Aspergillus foetidus* in solid state cultures at different acidities. *Biotechnology Letters*, 18:251-256.
- Cavalitto, S.F.; Hours, R.A. & Mignone, C.F. (1997). Quantification of pectin-releasing activity of protopectinase-SE from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnology Techniques*, 11 (5):331-334.
- 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. (2003). Tesis Doctoral: Crecimiento de *Geotrichum klebanii* y expresión de Protopectinasa-SE. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Cavalitto, S.F. & Mignone, C.F., 2007. Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Process Biochem.* 42 (2), 175–179.
- Contreras Esquivel, J.C. (2003). Tesis Doctoral: Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Channe, P.S. & Shewal, J.G. (1995). Pectinase production by *Sclerotium rolfsii*: Effect of culture conditions. *Folia Microbiologica*, 40:111-117.
- Chen, J.; Yang, R.; Chen, M.; Wang, S.; Li, P.; Xia, Y.; Zhou, L.; Xie, J.; Wei, D. (2014). Production optimization and expression of pectin releasing enzyme from *Aspergillus oryzae* PO. *Carbohydr. Polym.* 101, 89–95.
- Cheng, S.W.; Wang, Y.F.; Wang, M.L. (2012). Statistical optimization of médium compositions for alkaline protease production by newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 26 (3), 225–231.
- Cobana, M. & Antezana, R. (2007). Proceso de extracción de almidón de yuca por vía seca. *Revista Boliviana de Química.* 24 (1), 77 – 83.
- Contreras Esquivel, J.C. (2003). Tesis Doctoral: Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- 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*, 8 (1):48-52.

Contreras-Esquivel, J.C.; Voget, C.E.; Vita, C.C.E.; Espinoza Perez, J.D; Renard, C.M.G.C. (2006). Enzymatic Extraction of lemon pectin by endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger*. Food Science and Biotechnology, 15 (2):163-167.

Correa, C.; Garza, Y.; Rodríguez, J.; Aguilar, C. N.; Contreras Esquivel, J. C. (1999). Geles de pectina de bajo metoxilo modificadas enzimáticamente. Revista de la Sociedad Química de México, 43 (1):15-17.

Costa, J.A.V.; Colla, E.; Magagnin, G.; Oliveria dos Santos, L.; Vendruscolo, M. & Bertolin T. E. (2007). Simultaneous amyloglucosidase and exo-polygalacturonase production by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. Brazilian Archives of Biology and Technology, 50 (5):759-766.

Couri, S.; Da Costa Terzi, S.; Pinto, G.A.; Saavedra, F.; Suely-Pereira & Da Costa, A.C.A. (2000.). Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. Process Biochemistry, 36:255-261.

Da Silva, E.G.; Borges, M.F.; Medina, C.; Piccoli, R.H. & Schwan, R.F. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeast from tropical fruits. FEMS Microbiology Letter, 5:859-865.

Delgado, L.; Trejo, B.A.; Huitrón, C. & Aguilar, G. (1992). Pectin lyase from *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. Applied Microbiology and Biotechnology, 39:515-519.

Demır, H.; Göğüş, N.; Tari, C.; Heerd, D.; Fernandez Lahore, M. 2012. Optimization of the Process Parameters for the Utilization of Orange Peel to Produce Polygalacturonase by Solid-State Fermentation from an *Aspergillus Sojae Mutant* Strain. Turk Journal of Biology; 36: 394–404.

De Vos, L. & Pilnik, W. (1973). Pectolytic enzymes in apple juice extraction. Process Biochemistry, 8 (8):18-19.

De Vries, J.A.; Rombouts, F.M.; Voragen, A.G. & Pilnik, W. (1982). Enzymic degradation of apple pectins. Carbohydrate Polymers, 2:25-33.

Dos Santos Siqueira, B; Dias Alves, L; Novato Vasconcelos; Damiani P; Soares Junior, M. (2012). Pectina extraída de casca de pequi e aplicação em geléia light de manga. Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal - SP, 34 (2): 560-567.

Dzoghbeia, V. P.; Ofosu, G. A.; Oldham, J. H. (2008) Evaluation of locally produced *Saccharomyces cerevisiae* pectinase enzyme for industrial extraction of starch from cassava in Ghana. Sci. Res. Essays, 3 (8): 365-369.

Donaghy, J.A.; McKay, A.M. (1994). Pectin extraction from citrus peel by polygalacturonase produced on whey. Bioresource Technology, 47: 25-28.

Díaz, A.; Flórez J. & Cotes, A.M. (2005). Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv027). Revista Colombiana de Biotecnología. 7:51-58.

Doehlert DH. Uniform shell designs. Appl. Stat. (1970); 19 (3): 231–39.

- Ertola, R.J.; Hours, R.A. (1998). Role of yeast extract components in microbial cultures not associated with amino acids, vitamins or minerals: a review. *Applied Biological Science*, 4:1-15.
- Ertola, R.J.; Yantorno, O. & Mignone, C. (1994). *Microbiología Industrial*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C.
- Embaby, A. M.; Masoud, A. A.; Marey, H. S.; Shaban, N. Z.; Ghonaim, T. M. (2014). Raw agro-industrial orange peel waste as a low cost effective inducer for alkaline polygalacturonase production from *Bacillus licheniformis* SHG10. *SpringerPlus*. 3 (1), 1–13.
- Favela-Torres, E.; Volke-Sepulveda, T. & Viniegra-González, G. (2006). Production of Hydrolytic Depolymerising Pectinases – a review. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2):221-227.
- Ferreira, O. A.; Cavalitto, S. F.; Hours, R. A.; Ertola R.J. (2002). Influence of trace elements on enzyme production: protopectinase expression by a strain. *Enzyme Microb. Technol.*, 31 (4): 498–504.
- García, A. O. R.; Pinzón F. M.; Sánchez A. L. T.2013. Extracción y propiedades funcionales del almidón de yuca, *Manihot esculenta*, variedad ICA, como materia prima para la elaboración de películas comestibles. @LIMENTECH CIENCIA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA. ISSN 1692-7125.; 11(1): 13-21.
- Göğüş, N.; Evcan, E.; Tari, C.; Cavalitto, S. F. (2015). Evaluation of agro-industrial wastes, their state, and mixing ratio for maximum polygalacturonase and biomass production in submerged fermentation. *Environm. Technol.*, 36 (20), 2657–2667.
- Göğüş, N.; Hakgüder Taze, B.; Demir, H.; Tari, C.; Ünlütürk, S.; Lahore, M. F. (2014). Evaluation of orange peel, an industrial waste, for the production of *Aspergillus sojae* polygalacturonase considering both morphology and rheology effects. *Turkish J. Biol.*, 38 (4): 537–548.
- Happi Emaga, T.; S. Ronkart, C. Robert, B. Wathélet; M. Paquot M. 2008. Characterization of pectin extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design. *Food Chemistry*; 108:463-471.
- Herbert, D.; Phipps, P. J.; Strange, R. E. (1971). Chapter III Chemical Analysis of Microbial Cells. *Methods Microbiol.*, 5: 209–344.
- Hernández-Medina, M.; Torruco-Uco, J. G.; Chel-Guerrero, L; Betancur-Ancona, D. 2008. Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 28(3): 718-726.
- Herodez, S. S., Hadolin, M., Skerget, M., Knez, Z. (2003). Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*, 80 (2), 275-282.

Hoang, B. T.; Hung, P. V. (2013). Optimization of nutritional composition and fermentation conditions for cellulase and pectinase production by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology. *Inter. Food Res. J.*, 20(6): 3269–3274.

Gummadi, S.N. & Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. *Process Biochemistry*, 38 (7):987-996.

Gummadi, S.N. & Kumar, D.S. (2008). Batch and fed batch production of pectin lyase and pectate lyase by novel strain *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor. *Bioresource Technology*, 99:874-881.

Hara, T.; Fujio, Y. and Ueda, S. (1982). Production of polygalacturonase by *Aspergillus niger* cultured in media containing mandarin orange peels. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 29:538-42.

Hasunuma, T.; Fukusaki, E. & Kobayashi, A. (2003). Methanol production is enhanced by expression of *Aspergillus niger* pectin methyl-esterase in tobacco cells. *Journal of Biotechnology*, 106:45-42.

Hellín, P.; Ros, J.M. & Laencina, J. (2001). Changes in high and low molecular weight carbohydrates during *Rhizopus nigricans* cultivation on lemon peel. *Carbohydrate Polymers*, 45:169-174.

Herber, D.; Phipps, P. & Strange, P. (1971). Chemical analysis of microbial cells. In: *Methods in Microbiology*. J. Norris & D. Ribbons (Eds.). Vol. 5B. London: Academic Press, 210-344.

Hours, R.A.; Voget, C.E. & Ertola, R.J. (1988). Apple pomace as raw material for pectinases production in solid state culture. *Biological Wastes*, 23:221-228.

Iglesias, M.T. & Lozano, J.E. (2004). Extraction and characterization of sunflower pectin. *Journal of Food Engineering*, 62:215-223.

Hoang, B. T. & Hung, P. V. (2013). Optimization of nutritional composition and fermentation conditions for cellulase and pectinase production by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology. *Inter. Food Research J.* 20(6), 3269–3274.

Hoondal, G.S.; Tiwari, R.P.; Tiwari, R.; Dahiya, N. & Beg, Q.K. (2002). Microbial alkaline pectinases and their applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:409–18.

Ishii, S. & Yokotsuka T. (1971). Maceration of plant tissues by pectin trans-eliminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20:787–791.

Ishii, S. (1976). Enzymatic maceration of plant tissues by endo-pectin lyase and endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. *Phytopathology*, 66:281-289.

Jahan, N.; AfsheenAman, F. S.; Mujahid, T. Y.; Qader, S. A. U. 2017. Utilization of agrowaste pectin for the production of industrially important polygalacturonase. *Heliyon*.

- Jayani, R.S.; Saxena, S. & Gupta R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes - a review. *Process Biochemistry*, 40:2931-2944.
- Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S. & Tewari, R. (2000). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77:215-227.
- Kilara, A. (1982). Enzymes and their uses in the processed apple industry: a review. *Process Biochemistry*, 23:35-41.
- Kaur, P. & Satyanarayana, T. (2005). Production of cell-bound phytase by *Pichia anomala* in an economical cane molasses medium: optimization using statistical tools. *Process Biochem.* 40 (9), 3095–3102.
- Kumar, A.; G.S. Chauhan. 2010. Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (*steapsin*) inhibitor. *Carbohydrate Polymers*; 82(2): 454-459.
- Kurtzman, C.P.; Robnett, C.J.; Basehoar-Powers, E. (2008). Relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene phylogenetic analysis and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Research*, 8: 939–954.
- Laxman, R.S.; Sonawane, A.P.; More, S.V.; Rao, B.S.; Rele, M.V. & Jogland, V.V. (2005). Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobollus coronatus*. *Process Biochemistry*, 40 (9):3152-3158.
- Lee, W.C.; Yusof, S.; Hamid, N.S.A. & Baharin, B.S. (2006). Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Engineering*, 73:55-63.
- Larios, G.; Garcia, J. M., Huitrón, C. (1989). Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. *Biotechnol. Letters*. 11 (10), 729–734.
- Liguori, R.; Amore, A.; Faraco, V. (2013). Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6129–6147.
- Maidana, S.; Zubreski, E. R.; Martos, M. A.; Brumovsky, L. A. (2015). Caracterización parcial de almidón de mandioca extraído por vía enzimática. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología. ISBN: 978-987-45738-5-8.
- Mahesh, N.; Vivek, R.; Arunkumar, M.; Balakumar, S. (2014). Statistical designing of enriched pectin extract medium for the enhanced production of pectinase by *Aspergillus niger*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 6 (2), 666–672.
- Maldonado, M.C. & Navarro, A.R. (1995). Pectinases production by *A. niger* using industrial by products. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 13:369-373.

Maldonado, M.C.; Strasser de Saad, A.M. & Callieri, D.A.S. (1996). Effects of aeration and agitation on the production of pectinesterase, polygalacturonase and pectinlyase by a strain of *Aspergillus niger*. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 14:373-379.

Maldonado, M.C. & Strasser de Saad, A.M. (1998). Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20:34-38.

Malvessi, E. & da Silveira, M.M. (2004). Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonase by *Aspergillus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47:693-702.

Maller, A.; Damásio, A. R. L.; Silva, T. M. D.; Jorge, J. A.; Terenzi, H. F.; De Moraes Polizeli, M. D. L. T. (2011). Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niveus*. *Enzyme Research*, 2011,1-6.

Mamma, D. & Christakopoulos, P. (2014). *Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products. Waste and Biomass Valorization*. Kluwer Academic Publishers.

Martos, M. A. (2012). Tesis Doctoral: Estudio de enzimas pécticas producidas por microorganismos autóctonos. Universidad Nacional del Chaco Austral. Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

Martos, M. A.; Zubreski, E. R.; Combina, M.; Garro, O. A.; Hours, R. A. (2013a). Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots. *Food Sci. Technol.*, 33 (2): 332–338.

Martos, M. A.; Zubreski, E. R.; Garro, O. A.; Hours, R. A. (2013b). Production of pectinolytic enzymes by the yeast *Wickerhamomyces anomalus* isolated from citrus fruits peels. *Biotechnol. Res. Int.*, 1–7.

Martos, M. A.; Butiuk, A. P.; Rojas, N. L.; Hours, R. A. (2014). Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Wickerhamomyces anomalus*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 57 (4): 587–594.

Matora, A.V.; Korshunova, V.E.; Shkodina, O.G.; Zhemerichkin, D.A.; Ptitchkina, N.M.; Morris, E.R. (1995). The application of bacterial enzymes for extraction of pectin from pumpkin and sugar beet. *Food Hydrocolloids*, 9:43-46.

Melian, D. 2010. Ensayo comparativo de dos metodologías de extracción de almidón de papa usando muestras de diez variedades nativas de Chile y dos variedades comerciales. Tesis para optar el grado de licenciado en Ciencia de Alimentos. Escuela de Ingeniería de los Alimentos. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Melton, L. D. & Smith, B. G. (2001). Determination of the uronic acid content of plant cell walls using a colorimetric assay. *Food Analytic. Chem.* E3.3.1-E3.3.4.

Moyo, S.; Gashe, B.A.; Collison. E.K. & Mpuchane, S. (2003). Optimizing growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 85:87-100.

Mukherjee, S.K. & Majumdar, S.K. (1971). Fermentative production of pectinases by fungi: screening of organisms and production of the enzymes by *Aspergillus niger*. *Journal Fermentation Technology*, 49:759-770.

Munhoz, C.L.; Sanjinez-Argandona, E.J.; Soares-Junior, M. S. (2010). Extração de pectina de goiaba desidratada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Campinas)*, 30: 119-125.

Naidu, G.S.N. & Panda, T. (2003). Studies on pH and thermal inactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*. 16:57-67.

Nagai, M.; Katsuragi, T.; Terashita, T.; Yoshikawa, K. & Sakai, T. (2000). Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 64:1729–32.

Nair, S.R. & Panda, T. (1997). Statistical optimization of medium components for improved synthesis of pectinase by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 16:169-173.

Nakamura, T.; Hours, R.A. & Sakai, T. (1995). Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science*, 60:468-472.

Nighojkar, S.; Phanse, Y.; Sinha, D.; Nighojkar, A. & Kumar, A. (2006). Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. *Process Biochemistry*, 41:1136-1140.

Obergoso, A.G. (2002). Producción de enzimas pectinasas por Actinomycetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja. Tesis de Magíster en Biotecnología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Ortega, N.; de Diego, S.; Perez-Mateos, M. & Busto, M.D. (2004). Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 88:209-217.

Ortiz, GE, Guitart, ME, Cavalitto, SF, Albertó, EO, Fernández-Lahore, M, Blasco, M, 2015. Characterization, optimization, and scale-up of cellulases production by *Trichoderma reesei* cbs 836.91 in solid-state fermentation using agro-industrial products. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38 (11), 2117–2128.

Ortiz, G. E.; Ponce-Mora, M. C.; Nosedá, D.G.; Cazabat, G.; Saravalli, C.; López, M. C. (2017). Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up,

biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 44 (2): 197–211.

Paudel, Y. P.; Lin, C.; Shen, Z. y Qin, W. 2015. Characterization of pectin depolymerising exopolygalacturonase by *Bacillus sp.* HD2 isolated from the gut of *Apis mellifera L.* *Microbiology Discovery*, 3 (2): 1–8.

Pedrolli, D.B.; Monteiro, AC; Gomes, E. & Carmona, E.C. (2009). Pectin and pectinases production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, 3:9-18.

Pilnik, W. & Voragen, A.G.J. (1991). The significance of endogenous and exogenous pectic enzymes in fruit and vegetable processing. *Food Enzymology*. 1:303-336.

Pinelo, M., Del Fabbro, P., Marzocco, L., Nuñez, M. J., Vicoli, M. C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92, 109-117.

Pirt, S.J. (1975). *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, Engalnd.

Poondla, V.; Yannam, S. K.; Gummadi, S. N.; Subramanyam, R.; Reddy Obulam, V. S. (2016). Enhanced production of pectinase by *Saccharomyces cerevisiae* isolate using fruit and agro-industrial wastes: Its application in fruit and fiber processing. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 6, 40–50.

Ranveer, S.J.; Shivalika, S. & Reena, G. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40:2931–2944.

Rehman, H. U.; Qader, S. A. U.; Aman, A. (2012). Polygalacturonase: production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. *Carbohydr. Polym.*, 90 (1): 387–391.

Rekha, V. P. B., Ghosh, M.; Adapa, V.; Oh, S-J.; Pulicherla, K. K.; Sambasiva Rao, K. R. S. (2013). Optimization of Polygalacturonase Production from a Newly Isolated *Thalassospira frigidophilosprofundus* to Use in Pectin Hydrolysis: Statistical Approach. *BioMed. Research Inter.* 1–12.

Rogerson, F.S.S.; Vale, E., Grande, H. J., & Silva, M.C.M. (2000). Alternative processing of port-wine using pectolytic enzymes. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2 (5):222-227.

Rombouts, F. M. & Pilnik, W. (1980). *Microbial Enzymes and Bioconversions*. Ed. A.H. Rose. Academic Press. London.

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. *Electron. J. Biotechnol.*, 11 (1), 1–8.

Rojas, N.L.; Ortiz, G.E.; Baruque, D.J.; Cavalitto, S.F.; Ghiringhelli, P.D. (2010). Production of heterologous polygalacturonase I from *Aspergillus kawachii* in *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1437–1447.

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 Technol. Biotechnol.*, 49 (3), 316–321.

Ruiz, H. A.; Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez, R.; Contreras-Esquivel, J. C.; Aguilar, C. N. (2012). Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 65, 90–95.

Sakai, T. & Okashima, M. (1978). Protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42:2427-2429.

Sakamoto, M.; Shirane, Y.; Naribayashi, I.; Kimura, K.; Morishita, N.; Sakamoto, T; Sakai, T. (1994). Purification and characterization of rhamnogalacturonase with protopectinase activity from *Trametes sanguinea*. *European Journal of Biochemistry*, 226: 285-291.

Schwan, R.F. & Rose, A.H. (1994). Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *Journal of Applied Bacteriology*, 76:62-67.

Schroder, R.; Christopher JC.; Sharrock, K.; Hallet, IC. and MacRae, EA. (2004). Pectins from the albedo of immature lemon fruitless have high water binding capacity. *Journal of Plant Physiology*, 161: 371-379

Shabbiri, K.; Adnan, A.; Jamil, S.; Ahmad, W.; Noor, B.; Rafique, H.M. (2012). Medium optimization of protease production by *Brevibacterium linens* DSM 20158, using statistical approach. *Braz. J. Microbiol.* 1051–1061.

Shankar, S. K.; Mulimani, V. H. 2007.  $\alpha$ -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Bioresour Technol.*; 98: 958–961.

Siddiqui, M. A.; Pande, V.; Arif, M. 2013. Polygalacturonase production from *Rhizomucor pusillus* isolated from fruit markets of Uttar Pradesh. *African Journal of Microbiology Research*, 7(3), 252–259.

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*, 73:313-319.

Singh, S.A. & Appu Rao, A.G. (2002). A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35:115–123.

Singthong, J.; Cui, S. W.; Ningsanond, S.; Goff, H. D. (2004). Structural Characterization, degree of esterification y some gelling properties of Krueo Ma Noy (Cissampelos pareira) pectin. *Carbohydrate Polymers*, 58 (4): 391-400.

Sit, N.; Deka, S. C.; Misra, S. (2015). Optimization of starch isolation from taro using combination of enzymes and comparison of properties of starches isolated by enzymatic and conventional methods. *J. Food Sci. Technol.*, 52 (7): 4324–4332.

Sharma, D.C. & Satyanarayana, T. (2006). A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresour. Technol.*, 97: 727–733.

Stat Graphics. Centurión XV, Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA, 2009.

Soares, M.C.N; Da Silva, R. & Gomes, E. (1999). Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus sp.* *Revista de Microbiología*, 30 (4): 1-10.

Sakamoto, M.; Shirane, Y.; Naribayashi, I.; Kimura, K.; Morishita, N.; Sakamoto, T; Sakai, T. (1994). Purification and characterization of rhamnogalacturonase with protopectinase activity from *Trametes sanguinea*. *European Journal of Biochemistry*, 226: 285-291.

Sakamoto, T.; Hours, R. A.; Sakai, T. (1995). Enzymic pectin extraction from protopectins using microbial protopectinases. *Process Biochemistry*, 30: 403-409.

Singh, J.; Kaur, L. 2009. *Advances in potato chemistry and technology*. First Edition. Editorial Academic Press, Burlington, MA. USA. 508 pp.

Sriroth, K.; Chollakup, R.; Chotineeranat, S.; Piyachomkwan, K.; Ostes, C.G. 2000. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. *Bio-Resource Technology*; 71(1), 63-69.

Sívoli, L.; Pérez, E.; Rodríguez, P.; Raymúndez, M. B.; Ayesta, C. 2009. Técnicas microscópicas y de dispersión de luz empleadas en la evaluación de la estructura del almidón nativo de yuca (*Manihot esculenta C*). *Acta Microscópica*; 18(3): 195-203.

Sívoli, L.; Pérez, E.; Rodríguez, P. 2012. Structural analysis of the cassava native starch (*Manihot esculenta C.*) using morphometric, chemical, thermal and rheological techniques. *Rev. Fac. Agron.*; 29: 293-313.

Solís Pereira, S; Favela Torres, E; Viniegra Gonzales, G. & Gutierrez Rojas, M. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology Biotechnology*, 39:36-41.

Souza, J.V.B.; Silva, E.S.; Maia, M.L.S. & Teixeira, M.F. (2003). Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavissporus* 2A.UMIDA.1. *Process Biochemistry*, 39:455-458.

- Spigno, G.; Tramelli, L.; De Faveri, D. M.. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*; 81: 200–208.
- Taragano, V.M. & Pilosof, A.M.R. (1999). Application of Doehlert designs for water, pH and fermentation time optimization for *A. niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 25:411-419.
- Tari, C.; Göğus, N. & Tokatli, F. (2007). Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (5):1108-1116.
- Torres Rapelo, A.; Montero Castillo, P.; Duran Lengua, M. (2013). Propiedades fisicoquímicas, morfológicas y funcionales del almidón de malanga (*Colocasia esculenta*). *Revista Lasallista de Investigación*, 10 (2):52-61.
- Torre, P.; Pérez, A.; Marmolejo, L.F.; Ordóñez, J.A.; García, R.E. (2010). Una mirada a la agroindustria de extracción de almidón de yuca, desde la estandarización de procesos. *Revista EIA* 14, 23–38.
- Ustok, F. I.; Tari, C.; Gogus, N. (2008). Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *J. Biotechnol.* 2007; 127 (2): 322–334.
- Uzuner, S.; Cekmecelioglu, D. (2015). Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* growing on hazelnut shell hydrolyzate. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 113, 62–67.
- Van Rensburg, P. & Pretorius, I.S. (2000). Enzymes in winemaking: harnessing natural catalyst for efficient biotransformations-a review. *South African Journal Enology & Viticulture*, 21:52-73.
- Vasco-Correa, J. & Zapata Zapata, A. D. (2017). Enzymatic extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) at laboratory and bench scale. *LWT - Food Science and Technology*, 80, 280–285.
- Vargas Aguilar, P.; Araya Quesada Y.; López Marín, R.; Bonilla Leiva, A.R. (2012). Características de calidad y digestibilidad in vitro del almidón agrio de yuca (*Manihot esculenta*) producido en Costa Rica. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 1-13.
- Vargas, G.; Martínez, P.; Velezmoro, C. 2016. Functional properties of potato (*Solanum tuberosum*) starch and its chemical modification by acetylation. *Scientia Agropecuaria* 7 (3): 223 – 230.
- Vendruscolo, F.; M Albuquerque, F. S.; Esposito, E.; Ninow J. L. 2008. Apple Pomace : A Versatile Substrate for Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 1–12.
- Yeoh, S.; J Shi; T A G Langrish. 2008. Comparisons between Different Techniques for Water-Based Extraction of Pectin from Orange Peels. *Desalination* 218 (September 2006): 229–37.

Zapata Zapata A. D. (2008). Tesis Doctoral: Protopectinasa-SE de *Geotrichum klebanii*: producción, purificación y aplicación en procesos de maceración de tejidos vegetales y extracción enzimática de pectina. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Zapata Zapata, A. D.; Escobar, C. A; Cavalitto, S. F.; Hours, R. (2009). Evaluación de la capacidad de solubilización de pectina de cáscara de limón usando protopectinasa-se. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 1: 67-74.

Zheng, Z. & Shetty, K. (2000). Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. Process Biochemistry, 35:825-830.

Zubreski, E.R. (2013). Aislamiento de *Wickerhamomyces anomalus* una levadura productora de poligalacturonasa con capacidad macernate de tejidos vegetales. Ms.Sc. Thesis. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Misiones, Argentina.

## **Proyectos Científico-Tecnológicos**

Proyecto: “Extracción de almidón de Mandioca por vía enzimática”. Otorgado por la Secretaría de Políticas Universitarias, Ministerio de Educación en el Marco de la convocatoria Proyectos de Vinculación tecnológica “Amilcar Oscar Herrera” 2014. Monto del subsidio: \$ 80.000. Periodo: 02/2015 – 02/2016. Investigador responsable: Dra. Ma. Alicia Martos. Resol SPU 4508. N° Proyecto: 33-63-076.

Proyecto: “Extracción de almidón de Mandioca por vía enzimática”. Otorgado por Consejo Interuniversitario Nacional (CIN). Monto del subsidio: \$ 200.000. Periodo: 2015 – 2016. Investigador responsable: Dra. Ma. Alicia Martos. P.D.T.S. Resol. N° 1055/15.