



**Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado. Maestría
en Tecnología de los Alimentos.**

Maestranda
Ing. Claudia Liliana Danovich

Extracción de pectina de albedo de limón mediante enzimas pécticas producidas por una levadura autóctona

**Tesis de Maestría presentada para obtener el título de “Magíster
en Tecnología de los Alimentos”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto
queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Directora
Dra. María Alicia Martos
Co-Directora
Mgter. Emilce R. Zubreski

Posadas, Misiones 2019



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

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
QUÍMICAS Y NATURALES
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**EXTRACCIÓN DE PECTINA DE ALBEDO DE LIMÓN
MEDIANTE ENZIMAS PÉCTICAS PRODUCIDAS POR
UNA LEVADURA AUTÓCTONA**

Tesista: Ing. Claudia Liliana Danovich

Directora: Dra. María Alicia Martos

Co-directora: Mgter. Emilce R. Zubreski

Diciembre de 2019

DEDICATORIA

A mis seres más queridos, mi familia.

Nosotros aprobamos la tesis de Maestría de Claudia Liliana Danovich

Dra Liliana H. Lound
Evaluadora Externa- Facultad de Bromatología.
Universidad Nacional de Entre Ríos

Fecha

Mgter. Myriam García
Evaluadora Interna- Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones

Fecha

Mgter. Amada Pucciarelli Román
Evaluadora Interna- Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones

Fecha

Dra. María Alicia Martos
Directora de Tesis – Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones

Fecha

Mgter. Bqca. Emilce R. Zubreski
Co- Directora de Tesis – Facultad de Ciencias Exactas
Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones

Fecha

CALIFICACIÓN: Elaboración de tesis.....

CALIFICACIÓN: Defensa de tesis.....

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que me han apoyado directa e indirectamente en la realización de esta tesis, por incentivarme, por brindarme su ayuda y confianza en todo momento:

A mi directora de tesis, Dra. Alicia Martos, por aceptar dirigirme, por contribuir a mi crecimiento profesional y personal, por el acompañamiento y por el estímulo constante durante el tiempo de ejecución de esta tesis.

A mi co-directora de tesis, Mgter Emilce Zubreski por su orientación, supervisión y disposición para ayudarme en todo lo que necesitaba.

A la Mgter Nancy Cruz por transmitirme sus conocimientos sobre las técnicas analíticas y la Ing. Silvana Maidana por su importantísima contribución a lo largo del desarrollo de las experiencias.

A las integrantes de las distintas cátedras que se desempeñaron en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos y Biotecnología Dr. Fernando Benassi durante la realización de esta tesis, por compartir su espacio de trabajo contribuyendo así al desarrollo de la misma.

Al CeDIT por la ayuda financiera a través del programa de Becas de Tesis de Maestría.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de tesis fue poner a punto la extracción de pectina a partir de albedo de limón, por vía enzimática, mediante una poligalacturonasa producida, en medio líquido, por *Wickerhamomyces anomalus*, una levadura aislada en la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.

En la primer etapa se obtuvo el extracto enzimático, para ello se realizaron cultivos de *W. anomalus*, en un medio de cultivo sintético (MS) compuesto por glucosa, pectina de citrus, sulfato de amonio, otras sales, aminoácidos y vitaminas, con agitación y aireación. Los cultivos se realizaron a escala frascos agitados, los que fueron incubados a 30 °C, a 180 rpm, hasta 24 h. Se evaluó la influencia de las vitaminas y los aminoácidos sobre el crecimiento y la producción de la enzima. Finalizada la etapa de fermentación, el cultivo fue centrifugado y el sobrenadante, denominado extracto enzimático (EE), se utilizó como fuente de enzima extracelular.

En la segunda etapa se evaluó la aplicación del EE en la extracción enzimática de pectina a partir de albedo de limón. Para ello, inicialmente, se puso a punto el protocolo de extracción enzimática, posteriormente se estudió el efecto de diferentes factores tales como el pH, la relación sólido-líquido, la temperatura, el tiempo de extracción y la concentración de enzima. Se comparó el rendimiento del proceso extractivo por vía enzimática con el método de extracción química. Finalmente se caracterizó parcialmente la pectina extraída.

El crecimiento de *W. anomalus* fue despreciable en ausencia de biotina, pantotenato de calcio, piridoxina o tiamina, estas 4 vitaminas resultaron esenciales para lograr un buen desarrollo de la levadura y por lo tanto una buena producción de la enzima de interés. La omisión de los aminoácidos (triptófano, histidina y metionina) en el medio MS produjo una disminución en la producción de PG. Se obtuvieron valores de producción de PG de $49,896 \pm 1,35$ UE/mL, en el medio MS, conteniendo únicamente las 4 (cuatro) vitaminas, a las 8 h de cultivo.

El pH, la relación sólido/líquido, y la concentración del extracto enzimático, influyeron significativamente en la extracción de pectina a partir de albedo de limón, utilizando el EE de *W. anomalus*. Los mayores rendimientos se obtuvieron a pH 4,5, con una relación sólido/líquido de 1/50 y utilizando 12,5 mL del extracto enzimático. El

rendimiento de extracción de pectina aumentó con el tiempo de reacción, a todas las temperaturas estudiadas. Los rendimientos obtenidos a 35 y 40 °C fueron superiores respecto a los obtenidos a 30 y 50 °C. Para 35 °C, el rendimiento de extracción de pectina alcanzó un valor máximo de $36,86 \pm 0,575$ % p/p (g MIE/100 g albedo seco) a las 6 h de reacción. Para 40 °C, se obtuvo un rendimiento de $36,540 \pm 0,960$ % p/p (g MIE/100 g albedo seco) a las 4 h de reacción.

Se concluyó que los rendimientos obtenidos en el presente estudio empleando el EE de *W. anomalus* fueron mayores a los obtenidos por el método químico, lo cual confirma la bondad del proceso enzimático utilizado.

Palabras claves: levadura pectinolítica, poligalacturonasa, pectina de citrus, extracción

ABSTRACT

The aim of this thesis was the development of enzymatic pectin extraction from lemon albedo by a polygalacturonase produced in liquid medium by *Wickerhamomyces anomalus*, a yeast isolated in the Chemical and Natural Sciences Faculty of National University of Misiones.

In the first step the enzyme extract was obtained, for this *W. anomalus* cultures were performed in a synthetic culture medium (MS) consisting of glucose, citrus pectin, ammonium sulfate, other salts, aminoacids and vitamins with stirring and aeration. Cultures were performed to scale shake flasks, which were incubated at 30 °C, 180 rpm, up to 24 h. The influence of vitamins and aminoacids on growth and enzyme production were evaluated. After the fermentation stage, the culture was centrifuged and the supernatant, denominated enzyme extract (EE), was used as source of extracellular enzyme.

In the second stage, the EE application in the enzymatic pectin extraction from lemon albedo was evaluated. For this purpose, the enzyme extraction protocol was first developed and then, the effect of different factors such as pH, solid-liquid ratio, temperature, extraction time and enzyme concentration were studied. Enzymatic extraction process was compared with the chemical extraction method. Finally the extracted pectin was characterized.

W. anomalus growth was negligible in the absence of biotin, calcium pantothenate, pyridoxine or thiamine, these four vitamins were essential for a good development of the yeast and therefore a good production of the enzyme of interest. The omission of the amino acids (tryptophan, histidine and methionine) in the MS medium resulted in a decrease of PG production. PG production values of $49,896 \pm 1,35$ EU/mL were obtained in MS medium containing only the 4 (four) essential vitamins, at 8 h of culture.

The PH, solid/ liquid ratio, and the concentration of enzyme extract, significantly influenced the extraction of pectin from lemon albedo with the EE of *W. anomalus*. The highest yields were obtained at pH 4,5, with a solid / liquid ratio of 1/50 and using 12,5 mL of the enzyme extract. The pectin extraction yield increased with reaction time, at all temperatures studied. The yields obtained at 35 and 40 °C were higher than those obtained at 30 and 50 °C. For 35 °C, the extraction yield of pectin reached a maximum value of $36,86 \pm 0,575$ % w/w (g MIE/100 g dry albedo) at 6 h of reaction. For 40 °C, a yield of $36,54 \pm 0,960$ % w/w (g MIE/100 g dry albedo) was obtained at 4 h reaction.

It was concluded that the yields obtained in the present study using the EE *W. anomalus* were higher than those obtained by the chemical method, which confirms the goodness of the enzymatic process used.

Key words: pectinolytic yeast, polygalacturonase, citrus pectin, extraction.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
I.1. ALCANCES Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
I.2. JUSTIFICACIÓN	3
I.3. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LA LITERATURA	5
II.1. LAS SUSTANCIAS PECTICAS	5
II.1.1. Definición, localización y función principal	5
II.1.2. Clasificación de las sustancias pécticas	6
II.1.3. Estructura química de las sustancias pécticas.....	7
II.2. PECTINA	8
II.2.1. La pectina y sus orígenes.....	9
II.2.2. Estructura de la pectina	8
II.2.3. Fuentes de pectina.....	11
II.2.4. Propiedades de las pectinas	12
II.2.5. Clasificación de las pectinas comerciales	14
II.2.6. Métodos de extracción de pectina.....	17
II.2.7. Composición y Pureza de la Pectina Comercial según el CAA	22
II.2.8. Aplicaciones de la Pectina en la industria alimenticia	23
II.3. LOS CÍTRICOS COMO FUENTE DE PECTINAS	27
II.3.1. Generalidades sobre el sector cítrico en la Argentina	27
II.3.2. Estructura del fruto de los cítricos: El limón.....	29
II.4. LAS ENZIMAS PECTICAS	30
II.4. 1. Clasificación	31

II.4. 2. Principales aplicaciones de las enzimas pécticas.....	37
CAPÍTULO III.....	39
III.1. PROPUESTA METODOLÓGICA	39
III.2. MATERIALES Y MÉTODOS	40
III.2.1.PRODUCCIÓN DE POLIGALACTURONASA POR <i>W. anomalus</i>	40
III.2.1.1. Microorganismo y medios de cultivos.....	40
III.2.1.2. Fermentación.....	41
III.2.1.3. Influencia de las vitaminas sobre el crecimiento de <i>W. anomalus</i> y la producción de PG.....	42
III.2.1.4. .Influencia de los aminoácidos sobre el crecimiento de <i>W. anomalus</i> y la producción de PG.....	43
III.2.1.5. Determinaciones analíticas.....	43
III.2.2. EXTRACCIÓN ENZIMATICA DE PECTINA DE ALBEDO DE LIMÓN	45
III. 2.2.1. Protocolo de extracción N° 1 con albedo húmedo.....	45
III. 2.2.2. Protocolo de extracción N° 2 con protopectina	48
III. 2.2.3. Protocolo de extracción N° 3 con protopectina	49
III. 2.3. INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES SOBRE EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PECTINA	50
III.2.3.1. Efecto del pH.....	50
III.2.3.2. Efecto de la relación sólido/líquido	50
III.2.3.3. Efecto de la temperatura y el tiempo	51
III.2.3.4. Influencia de la concentración del extracto enzimático.....	51
III.2.4. COMPARACION DE RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN CON LA ENZIMA COMERCIAL Y EL MÉTODO QUÍMICO	51
III.2.5. CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINA EXTRAÍDA	52
III. 2.5.1. Determinación del contenido de ácidos urónicos en el MIE.....	52
III. 2.5.2. Determinación del grado de esterificación.....	54
III. 2.5.3. Determinación capacidad de gelificación	55
III.3. RESULTADOS Y DISCUSION	57

III.3.1. PRODUCCIÓN DE POLIGALACTURONASA POR <i>W. anomalus</i>	57
III.3.1.1. Cinética de crecimiento y producción de PG en el medio MS.....	57
III.3.1.2. Influencia de las vitaminas sobre el crecimiento de <i>W. anomalus</i>	58
III.3.1.3. Influencia de los aminoácidos sobre el crecimiento de <i>W. anomalus</i> y la producción de PG.....	59
III.3.2. PUESTA A PUNTO DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE PECTINA A PARTIR DE ALBEDO DE LIMÓN	61
III.3.2.1. Protocolo de extracción N° 1 con albedo húmedo.....	61
III.3.2.2. Protocolo de extracción N° 2 con protopectina	62
III.3.2.3. Protocolo de extracción N° 3 con protopectina	62
III.3.3. INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES SOBRE EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PECTINA	63
III.3.3.1. Efecto del pH.....	63
III.3.3.2. Efecto de la relación sólido/líquido	65
III.3.3.3. Efecto de la temperatura y el tiempo	68
III.3.3.4. Efecto de la concentración de enzima.....	71
III.3.4. COMPARACIÓN DE RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN CON UNA ENZIMA COMERCIAL Y EL MÉTODO QUÍMICO	72
III.3.5. CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINA	73
III. 3.5.1. Determinación del contenido de ácidos urónicos en el MIE.....	73
III. 3.5.2. Determinación del grado de esterificación.....	74
III. 3.5.3. Determinación del poder de gelificación	75
III.3.6. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEFINITIVO	75
III.4. CONCLUSIONES	77
IV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	79

LISTA DE TABLAS

Tabla II.1: Peso molecular de algunas sustancias pécticas.....	6
Tabla II.2: Contenido de pectina de algunos frutos	12
Tabla II.3: Características de las pectinas comerciales	16
Tabla II.4: Algunos microorganismos productores de enzimas pécticas.	36
Tabla III.1: Soluciones de vitaminas para los medios MS ₂ a MS ₁₀	42
Tabla III.2: Soluciones de aminoácidos para los medios MS ₁₁ a MS ₁₃	43
Tabla III.3: Proporciones para obtener 100 g de mermelada.....	56
Tabla III.4: Efecto de la omisión de una vitamina en el medio MS sobre el crecimiento de <i>W. anomalus</i>	58
Tabla III.5: Rendimiento de la extracción de enzimática de pectina a partir de albedo y albedo + flavedo (húmedos)	61
Tabla III.6: Rendimiento de extracción de pectina utilizando albedo seco y tamizado (Protocolo N°2).	62
Tabla III.7: Rendimiento de extracción de pectina utilizando albedo seco y tamizado (Protocolo N°3).	63
Tabla III.8: Influencia del pH en el rendimiento de extracción de pectina	64
Tabla III.9: Análisis de varianza para MIE % (p/p) con el pH.....	64
Tabla III.10: Extracción de pectina con diferente relación sólido/líquido	66
Tabla III.11: Análisis de varianza: Rendimiento según Relación AT/ (Buffer+EE).	66
Tabla III.12: Análisis de rangos múltiples Rendimiento: Relación AT/ (Buffer+EE). ..	67
Tabla III.13: Rendimiento de extracción de pectina a 30 °C.	68
Tabla III.14: Rendimiento de extracción de pectina a 35 °C.	68
Tabla III.15: Rendimiento de extracción de pectina a 40 °C.	69
Tabla III.16: Rendimiento de extracción de pectina a 50 °C.	69
Tabla III.17: Rendimientos de MIE con diferentes métodos de extracción.	72
Tabla III.18: Concentración de AG en el MIE obtenido por los métodos enzimático y químico	74
Tabla III.19: Grado de esterificación del MIE obtenido por métodos enzimático	74

LISTA DE FIGURAS

Figura II.1: Detalle de los componentes de la pared celular de vegetales superiores.....	5
Figura II.2: Estructura esquemática de la protopectina	7
Figura II.3: Estructura del ácido poligalacturónico.....	7
Figura II.4: Estructura esquemática de la pectina.	10
Figura II. 5: Mecanismo de gelificación en pectinas de alto metoxilo.....	13
Figura II.6: Mecanismo de gelificación en pectinas de bajo metoxilo.....	14
Figura II.7: Representación esquemática de la cavidad de caja de huevo.....	14
Figura II.8: Clasificación de Pectinas Comerciales	15
Figura II.9: Ridgélímetro	17
Figura II.10: Geles de pectina elaborados con pectina comercial de cítricos.....	24
Figura II.11: Pectina y estabilización de la leche.....	25
Figura II. 12: Estructura del fruto de limón	29
Figura II.13: Mecanismo de acción de las enzimas desesterificantes (pectinesterasa) ..	31
Figura II.14: Mecanismo de acción de las enzimas depolimerizantes (poligalacturonasa) ..	32
Figura II.15: Mecanismo de acción endo de las poligalacturonasas.	33
Figura II.16: Mecanismo de acción exo de las poligalacturonasas.	33
Figura II.17: Mecanismo de acción de las enzimas depolimerizantes (liasas).....	34
Figura II. 18: Acción de las PPasas Tipo A y Tipo B	35
Figura III.1: Albedo húmedo obtenido a partir de limones de la variedad Eureka.....	46
Figura III.2: Frascos Erlenmeyer conteniendo la mezcla de reacción (material vegetal +EE+buffer).....	46
Figura III.3: 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 (tejido macerado) despectinizado (C).....	47
Figura III.4: Gel de material polimérico precipitado con etanol (A). Material insoluble en etanol secado a 40 °C (B).....	48
Figura III.5: Albedo húmedo en estufa a 45 °C (A), albedo seco molido (B)	49
Figura III.6: Reacción del mHDP	54
Figura III.7: Evolución del cultivo de <i>W. anomalous</i> en el medio MS.....	57
Figura III.8: Efecto de las vitaminas sobre el crecimiento de <i>W. anomalous</i>	59

Figura III.9: Efecto de la eliminación de un aminoácido en el medio MS sobre la actividad PG y la producción de biomasa.....	60
Figura III.10: Valores de actividad PG obtenidos en los medios MS, YNB y MSO por <i>W. anomalus</i>	60
Figura III.11: Efecto del pH en el rendimiento de extracción de pectina	65
Figura III.12: Efecto de la relación sólido/líquido en el rendimiento de extracción de pectina.....	67
Figura III.13: Cinética de extracción de pectina a 30, 35, 40 y 50 °C con el extracto enzimático de <i>W. anomalus</i>	70
Figura III.14: Rendimiento MIE a 35 y 40°C durante 4 y 6 h de reacción.	70
Figura III.15: Efecto de la concentración de la enzima en el rendimiento de extracción de pectina	72
Figura III.16: Gelificación de pectina obtenida con el EE de <i>W. anomalus</i>	75
Figura III.17: Esquema del proceso completo de extracción enzimática de pectina.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AG: ácido galacturónico
APG: ácido poligalacturónico
AT: albedo tamizado
BAc: buffer acético-acetato de sodio
EE: extracto enzimático
FCE: fuente de carbono y energía.
GE: grado de esterificación
GRAS: generally regarded as safe (Generalmente reconocido como seguro)
HG: homogalacturonano
HM: high methoxyl (pectins). (Pectinas de alto metoxilo)
LM: low methoxyl (pectins). (Pectinas de bajo metoxilo)
LMA: low methoxyl amidated (pectins). (Pectinas de bajo metoxilo amidadas)
mHDF: m-hidroxidifenilo (metahidroxidifenilo)
MIE: material insoluble en etanol
MS: medio de cultivo sintético
MSO: medio de cultivo sintético optimizado
PE: pectinesterasa
PG: poligalacturonasa
PL: pectinliasa
PPasa: protopectinasa
RG: ramnogalacturonano

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

I.1. ALCANCES Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

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. Según su modo de acción se clasifican en: poligalacturonasas (PG), pectinesterasas (PE) y pectinliasas (PL). Las PE hidrolizan los esteres metílicos de moléculas de pectina, liberando metanol. Las PL y PG son enzimas depolimerizantes, degradan enlaces glicosídicos ya sea por un mecanismo de hidrólisis (PG) o por un mecanismo de β -eliminación (PL). Estas enzimas juegan un importante rol en la industria de alimentos, principalmente en el procesamiento de jugos de frutas y en la maceración de tejidos vegetales (Jayani y col. 2005, Tari y col., 2007).

Algunas pectinasas tienen la capacidad de hidrolizar restringidamente la protopectina presente en los tejidos vegetales, liberando pectina soluble y se las conoce como enzimas solubilizadoras de pectina o protopectinasas (PPasas) (Sakai y Okashima, 1978, Nakamura y col. 1995, Zapata Zapata, 2008). La primer PPasa reportada se encontró en el sobrenadante de un cultivo de *Trichosporum penicillautm*, 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).

Las enzimas pécticas son producidas por una gran variedad de microorganismos como hongos filamentosos, levaduras y bacterias (Souza y col., 2003, Da Silva y col., 2005). Hasta el presente, la principal fuente de enzimas pécticas para uso industrial proviene de cepas de *Aspergillus niger*. Las preparaciones comerciales de este hongo contienen una mezcla compleja de diferentes enzimas con actividad pectinolítica, incluyendo PG, PL y PE. La producción de pectinasas de levaduras tiene algunas ventajas en comparación a la producción a partir de hongos filamentosos. Algunas cepas de levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Geotrichum lactis*) son capaces de producir un único tipo de enzimas pectolíticas y representan 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).

Las pectinas constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos ácidos de origen vegetal con propiedades de gelificación, estabilización de emulsiones y aporte de fibra nutricional, razón por la cual tienen gran aplicabilidad en las industrias alimenticia y farmacéutica, entre otras. Para su producción se utilizan algunos subproductos propios de industrias de jugos de fruta, principalmente cáscaras de cítricos y orujo de manzana. Su precursor es la protopectina, definida como la sustancia péctica insoluble en agua que origina pectina soluble por despolimerización parcial (Baciu y Jördening, 2005). Existen diferentes técnicas para la extracción de pectina a partir de tejidos vegetales, las cuales utilizan procedimientos físico-químicos o enzimáticos. Los procedimientos enzimáticos para la extracción de pectina utilizan aquellas enzimas, de origen microbiano, que tienen la capacidad de solubilizar pectina a partir de protopectina (PPasas) (Sakai y Okushima, 1978).

Wickerhamomyces anomalus, es una levadura autóctona aislada a partir de frutas cítricas, en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Esta levadura es capaz de producir una enzima péctica extracelular, en forma asociada al crecimiento (Martos y col., 2013a, Martos y col., 2013b). La enzima fue purificada, caracterizada y finalmente identificada como una endo-poligalacturonasa (endo-PGasa) (Martos y col., 2014). Esta enzima es de gran importancia industrial ya que posee, a diferencia de otras PGasas, actividad PPasa y es capaz de liberar pectina de tejidos vegetales.

En el presente trabajo de tesis se propone profundizar en el conocimiento de un proceso biotecnológico para la extracción de pectina por vía enzimática, a partir de residuos de las industrias cítricas de la zona. El trabajo se plantea en dos etapas claramente diferenciadas pero concatenadas, una dedicada a la producción de la PGasa de *W. anomalus* y otra donde se estudiará el proceso de extracción enzimática de pectina a partir de albedo de limón.

I.2. JUSTIFICACIÓN

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.

Durante los últimos años, nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a la búsqueda de microorganismos autóctonos de la provincia de Misiones con potencial aplicación industrial, particularmente en tecnología de alimentos. Así fue que, a partir de frutos cítricos se aisló una levadura (identificada como *Wickerhamomyces anomalus*) productora de una enzima péctica extracelular, identificada como una endopoligalacturonasa (endo-PGasa). Por otra parte, se demostró que los sobrenadantes crudos del cultivo de *W. anomalus* son capaces de degradar las sustancias pécticas presentes en la laminilla media y en la pared celular primaria de vegetales superiores, liberando pectina soluble (actividad PPasa). 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 PPasa se adjudicó a esta enzima.

En este trabajo de tesis se pretende estudiar la extracción de pectina por vía enzimática, a partir de residuos cítricos, utilizando los sobrenadantes de la levadura aislada por nuestro grupo de trabajo. 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 opciones tecnológicas al pequeño y mediano productor y minimizar un impacto ambiental.

I.3. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo de tesis fue extraer pectina a partir de albedo de limón, mediante una poligalacturonasa producida, en medio líquido, por una levadura autóctona de la provincia de Misiones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el crecimiento de la levadura *W. anomalus* a escala frascos agitados en un medio sintético y de bajo costo.
- Evaluar la aplicación del extracto enzimático de *W. anomalus* en la extracción de pectina a partir de albedo de limón.
- Establecer la influencia que ejercen las variables operacionales temperatura, pH, tiempo de incubación enzimática y concentración de la enzima sobre la eficiencia del proceso de extracción.
- Comparar la capacidad de extracción de pectina del proceso enzimático con el método químico tradicional.
- Caracterizar parcialmente la pectina extraída mediante la determinación de contenido de ácido galacturónico y grado de esterificación.
- Formular geles a partir de la pectina extraída para evaluar sus propiedades como agente gelificante.

CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LA LITERATURA

II.1. LAS SUSTANCIAS PECTICAS

II.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. II.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 y Pilnik, 1980).

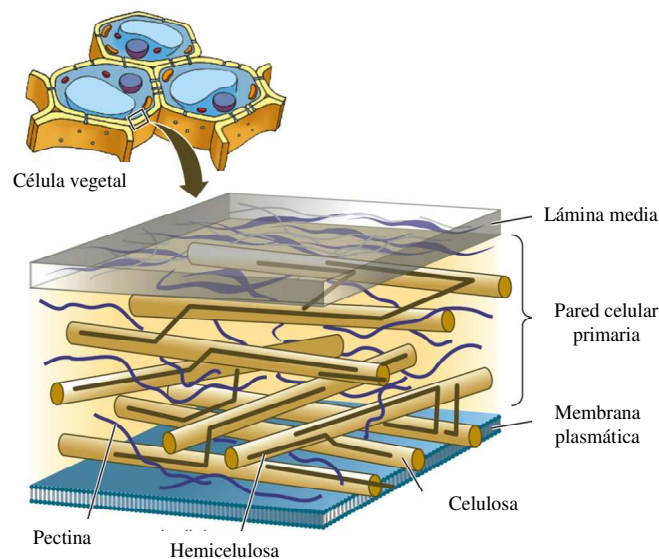


Figura II.1: Detalle de los componentes de la pared celular de vegetales superiores (Life- The Science of Biology 9ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2011)

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 II.1) (Jayani y col., 2005).

Tabla II.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)

II.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) Ácidos pécticos o ácido poligalacturónico: se denomina así a las sustancias pécticas compuestas por ácido poligalacturónico, libre de grupos éster metílicos.
- b) Ácidos 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 (Fig.II.2) (Naidu y Panda, 1998; Obergoso, 2002; Jayani y col., 2005).

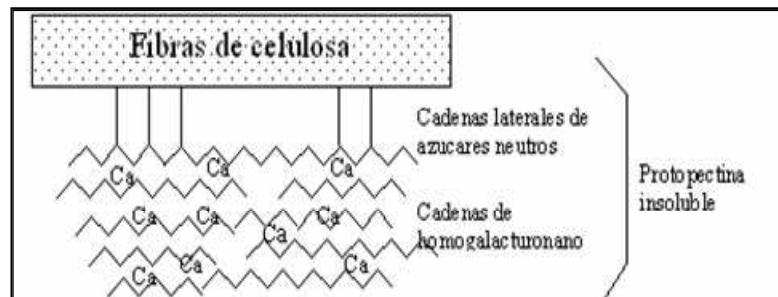


Figura II.2: Estructura esquemática de la protopectina (Nakamura y col., 1995)

II.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 α -1,4. Esta cadena constituye el ácido poligalacturónico (APG) (Fig. II.3).

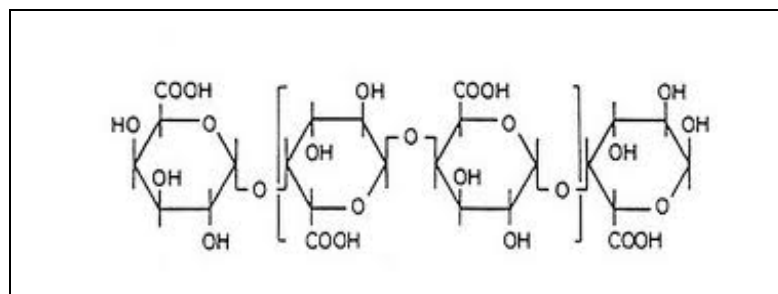


Figura II.3: Estructura del ácido poligalacturónico

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 pectínicos y si superan este porcentaje se denominan “pectinas”.

II.2. PECTINA

II.2.1. La pectina y sus orígenes

Las primeras citas sobre pectina datan de un artículo inglés de 1750 sobre la preparación de jalea de manzana (Kertesz, 1951). La pectina fue descubierta como compuesto químico en 1790 por Vauquelin, cuando detectó primeramente una sustancia soluble de los zumos de fruta. El científico francés Braconnot continuó el trabajo de Vauquelin y en el año 1824 encontró que "una sustancia ampliamente disponible de plantas vivas y ya observada en el pasado, tenía propiedades gelificantes cuando se le añadía ácido a su solución". La llamó "pectina ácida" del griego "pectos" que significa sólido, coagulado. (Aza y Méndez, 2011). En el año 1848, Fremy reportó la existencia de un precursor péctico insoluble en agua, que existía asociado a la celulosa en la pared celular de los frutos verdes así como en otras partes de las plantas, denominado posteriormente protopectina por Tschirch (Joslyn y Deuel, 1963; Canteri y col., 2010) cumpliendo un importante rol en la regulación de la firmeza de los frutos a medida que estos maduran.

Durante una investigación sobre turbidez de jugos, Kelhofer (1908), llegó a la conclusión de que el sedimento observado en un fermentado de pera comprendía un complejo de proteínas, pectinas y compuestos fenólicos oxidados (Canteri y col., 2010). Smolenski (1923), fue el primero en sugerir que la pectina era un polímero complejo de estructura comparable al almidón. El análisis de rayos X concordaba con esa hipótesis, pero indicaba que era más lógica una comparación con la celulosa (Canteri y col., 2010). De acuerdo con Meyer y Mark (1930) los ácidos pectínicos presentaban grupos

metilester y estaban ligados por enlaces α -1,4 y la fórmula básica fue establecida por Schneider y Bock en 1937 (Canteri y col., 2010).

En ese momento, ya se discutía la dificultad de establecer estudios comparativos con respecto a la composición, el tipo y la distribución de los compuestos pécticos en vegetales debido a los diferentes métodos de extracción y análisis empleados.

La pectina fue definida por Kertesz en 1951 como los ácidos pectínicos solubles en agua de grado de metilación variado que son capaces de formar geles con azúcar y ácido bajo condiciones determinadas.

Las formas de pectina son generalmente reconocidas como seguras por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las especificaciones legales para pectinas están enunciadas internacionalmente.

La producción de pectina se desarrolló gradualmente a principios del siglo XX en Europa y los Estados Unidos, utilizando principalmente pulpa de manzana, subproducto hasta entonces descartado de la producción de jugo de este fruto (Herbstreith y Fox, 2009). La primera planta de la pectina cítrica fue construida en 1926, en California. En 1940, alrededor del 60% de pectina producida en todo el mundo era a partir de la cáscara de cítricos, debido a la abundancia de la materia prima generada por la industrialización de los jugos (Kertesz, 1951; Canteri y col., 2012).

II.2.2. Estructura de la pectina

Las pectinas 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 depende de la fuente de la cual se obtuvo la pectina. (Iglesias y Lozano, 2004).

Las pectinas poseen una estructura compleja y están formadas por 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 porción de la región del esqueleto del HG es la más abundante representando cerca del 60-65% del total de la 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 α -1,2. A estos residuos de ramnosa se unen cadenas de D-galactosa unidas por enlaces β -1,4, o en otros casos cadenas de L-arabinosa, unidas por enlaces α -1,5. A partir de estos azúcares pueden originarse otras ramificaciones del mismo tipo, o en ocasiones formadas por otros azúcares como D-xilosa, D-glucosa, D-manosa, L-fucosa y ácido D-glucurónico, dependiendo del vegetal de origen de la pectina. Estas ramificaciones representan un 20-40 % de la cadena total.

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

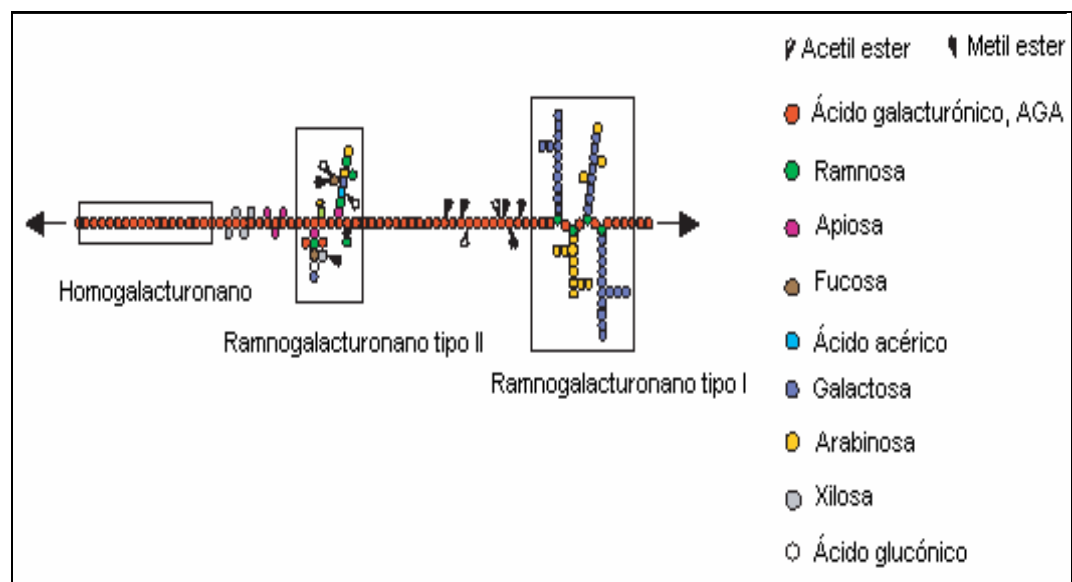


Figura II.4: Estructura esquemática de la pectina (Willats, 2006; Pedrolli y col., 2009).

II.2.3. Fuentes de pectina

La pectina es un heteropolisacárido que se presenta en la naturaleza como elemento estructural del sistema celular de las plantas. Como es uno de los constituyentes principales de la pared celular, esta se encuentra en el albedo o cáscara de las frutas. El contenido de sustancias pécticas varía según el origen botánico del vegetal, siendo cuatro subproductos de industrias agrícolas y de alimentos ricos en sustancias pécticas (por encima de 15 % de contenido en base seca): bagazo de manzana, albedo de cítricos, bagazo de remolacha y capítulos de girasol (Levigne y col, 2002; Canteri y col., 2005; Masmoudi y col., 2008). La mayor parte de la pectina utilizada por la industria alimenticia se originó a partir de esas materias primas, siendo extraídas en condiciones ligeramente ácidas y a alta temperatura (Voragen y col, 2009).

Debido a que la capacidad de gelificación dependerá del peso molecular y grado de esterificación, pectinas de diferentes fuentes no presentan la misma capacidad de formación de gel en función de las variaciones de estos parámetros. En consecuencia, la detección de una gran cantidad de pectina en una fruta no es suficiente para calificarla como una fuente potencial de pectina. Muchas fuentes permanecen sin uso debido a ciertas propiedades estructurales indeseables de las pectinas extraídas (Willats y col, 2006). Entre las materias primas alternativas estudiadas para la extracción de pectina pueden ser citados: los frutos de *Chaenomeles japonica* un membrillo japonés (Thomas y col, 2003), las hojas de Krueo Ma Noy, una vid nativa de Tailandia (Singthong y col, 2004), el pericarpio de ambarela, una fruta nativa de la Polinesia (Koubala y col, 2008), la cáscara de mango (Berardini y col, 2005; Koubala y col, 2008), la calabaza (Ptichkina y col, 2008), las cáscaras de banana (Happi Emaga y col, 2008), el residuo de cacao (Mollea y col, 2008; Yapo y Koffi, 2013), la pulpa y cáscara de guayaba (Munhoz y col, 2010; Paredes y col, 2015) y la cáscara de maracuyá (D'Addosio y col, 2005; Canteri y col, 2010).

En la maduración de las frutas ocurre la hidrólisis de la pectina en azúcares y ácidos, en consecuencia la cantidad y calidad de esta depende entre otras cosas de la edad y de la maduración de la fruta (Francis y Bel, 1975).

La Tabla II.2 muestra los niveles aproximados de pectina que se pueden encontrar a partir de diferentes fuentes vegetales (Canteri y col, 2012).

Tabla II.2: Contenido de pectina de algunos frutos

Fruta	% (p/p) en MF	% (p/p) en MS
Manzana (<i>Malus sp.</i>)	0,5-1,6	10-15
Bagazo de manzana	1,5-2,5	15-20
Albedo cítricos (<i>Citrus sp.</i>)	-	30-35
Cáscara de naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	3,5 - 5,5	-
Maracuyá (<i>Passiflora edulis S.</i>)	0,5	15-20
Cáscara de maracuyá	2,1 -3,0	-
Batata	-	2,5
Banana (<i>Musa acuminata</i>)	0,7-1,2	-
Remolacha (<i>Beta vulgaris</i>)	1,0	10-20
Bagazo de remolacha	-	15-20
Girasol (<i>Helianthus annuus</i>)		15-25
Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	0,2-0,5	10
Guayaba (<i>Psidium guajava L.</i>)	0,8-1,0	5-8
Mango (<i>Mangifera indica L.</i>)	0,2 - 0,4	-
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	0,7-1,0	-
Durazno (<i>Prunus persica</i>)	0,1-0,9	-
Piña (<i>Ananas comosus L.</i>)	0,04-0,1	-
Frutilla (<i>Fragaria ananassa</i>)	0,6 a 0,7	-
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	0,2-0,6	3

MF: material fresco; MS: material seco (Thakur y col., 1997; Rojas y col., 2008; Canteri y col, 2012).

II.2.4. Propiedades de las pectinas

Solubilidad:

Las pectinas son solubles en disoluciones acuosas, propiedad que se utiliza para elaborar geles y sustancias viscosas. Los enlaces metálicos provocan una separación entre las cadenas pécticas 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 por formación de puentes de hidrógeno. (Fig. II.5).

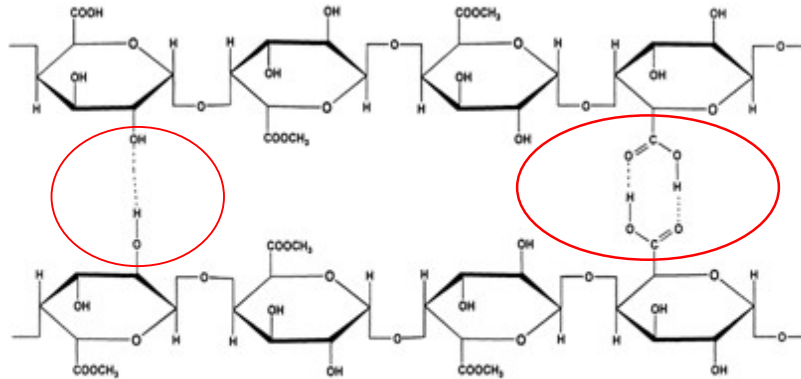


Figura II. 5: Mecanismo de gelificación en pectinas de alto metoxilo (En rojo uniones por puente de hidrógeno) (Jane, 2007).

En estas zonas que se crean se atrapan moléculas de azúcar y agua en la red cristalina. Para la gelificación de las pectinas de HM es necesario un pH inferior a 3,5, de esta manera, el pH bajo reduce las cargas negativas a lo largo de la cadena de pectina debido a que 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. El azúcar desarrolla una acción deshidratante sobre la pectina y la lleva al límite de la solubilidad.

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, mayores 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 (Ca^{2+}).

Según Harvey (1960), la presencia de calcio promueve la formación de geles formando fuertes asociaciones con grupos carboxilo de cadenas de pectina vecinas (Sakai y col., 1993) (Fig. II.6).

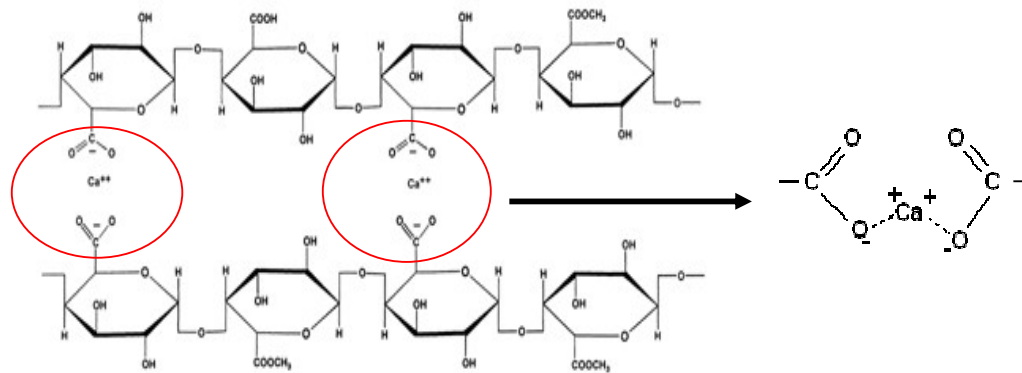


Figura II.6: Mecanismo de gelificación en pectinas de bajo metoxilo (En rojo asociaciones entre grupos carboxilo y calcio) (Jane, 2007).

Morris y col. (1980) han demostrado que el mecanismo primario de esta gelificación implica secuencias de cadena extendida que adoptan una doble conformación regular, dimerizan, con una quelatación específica de Ca^{2+} entre cadenas. Estas zonas de asociación entre cadenas adyacentes se conocen como “caja de huevo” (“eggs-box” por su traducción al inglés) (Sakai y col., 1993) (Fig. II.7).

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.

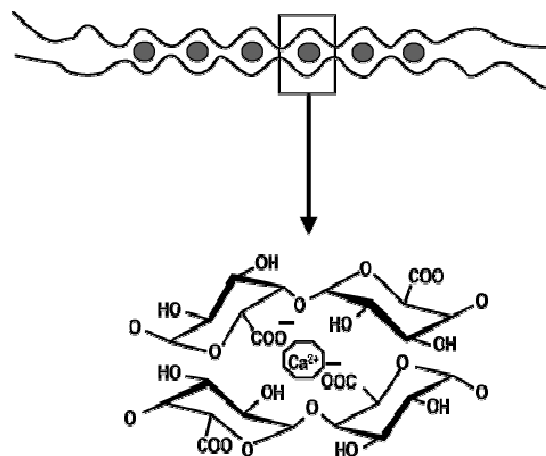


Figura II.7: Representación esquemática de la unión de calcio a las cadenas de pectina LM: dímero de “caja de huevo” (egg box) y cavidad de caja de huevo (Axelos y Thibault, 1991).

II.2.5. Clasificación de las pectinas comerciales

Las pectinas se clasifican según su grado de esterificación, GE, expresado en porcentaje, ya que sus propiedades gelificantes están principalmente determinadas por el mismo.

El proceso de extracción convencional por hidrólisis ácida de la pectina de residuos de cítricos (naranja), da como resultado, una pectina con aproximadamente 70 % de esterificación, aunque pueden alcanzarse grados de esterificación mayores (Gilabert, 1998). Para la producción de otros tipos de pectina, con menores grados de esterificación, deben hidrolizarse algunos ésteres metílicos adicionales, generalmente, mediante una extracción prolongada, tratamientos ácidos o alcalinos en alcohol o haciendo uso de enzimas desesterificantes (como la pectinesterasa) (May, 1990; Gilabert, 1998; Voragen, 2003). Cuando la pectina se somete a una desesterificación alcalina, en presencia de amoníaco, se forman amidas ($-\text{COONH}_2$) en las cadenas ácidas, obteniéndose la pectina amidada (Voragen, 2003).

A mayor grado de esterificación, se obtiene una gelificación más rápida. En función a dicha velocidad de gelificación y dependiendo de si están o no amidadas, las pectinas de alto y bajo metoxilo se subdividen como se detalla en la Fig. II.8.

La Tabla II.3 presenta las características de algunas de las pectinas comerciales de alto metoxilo.

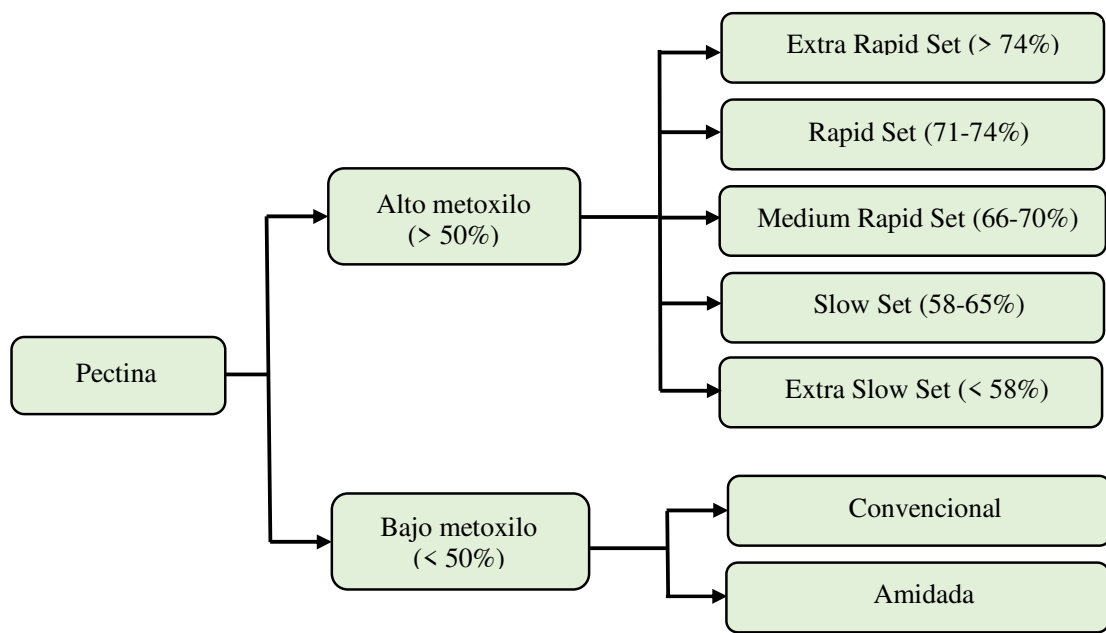


Figura II.8: Clasificación de Pectinas Comerciales (Voragen, 2003, Zegada, 2015).

Tabla II.3: Características de las pectinas comerciales

Características	Extra Rapid Set	Rapid Set	Medium Rapid Set	Slow Set
% de esterificación	74-95	71-74	66-70	58-65
Formación del gel (minutos)	1-3	4-8	15-25	30-120
pH de gelificación óptimo	3,1-3,4	3,0-3,3	2,8-3,1	2,6-2,9

(Navarro y Navarro, 1985)

Clase o grado de la pectina (poder gelificante)

La graduación de una pectina es medida por la consistencia o fuerza del gel obtenido al emplear una formulación determinada.

Existen diversos métodos para determinar el grado de la pectina. Entre los varios métodos usados para realizar esta medición, se halla la medida de los grados SAG. Los grados SAG se definen como el número de gramos de sacarosa que en la solución acuosa de 65° Brix y un valor de pH 3,0 - 3,5 son gelificados por un gramo de pectina obteniéndose un gel de consistencia o firmeza determinada.

Este método está recomendado por el Comité de Expertos IFT (International Food Technologist) para la normalización de pectinas desde 1959 y ha tomado el nombre de método USA –SAG (IFT).

Método USA – SAG

Es el método en el cual la firmeza del gel se mide en el Ridgelmómetro, instrumento que dispone de un tornillo que permite medir la deflexión de un gel normalizado, como puede observarse en la Fig. II.9. Los gramos de azúcar requeridos para formar el gel se expresan como grados SAG; así, por ejemplo, 150° SAG significa que la pectina es de 150 grados SAG; cuando se trata de la producción de mermelada, un gramo de ella trabaja sobre 150 gramos de azúcar para formar el gel estándar, a las condiciones de pH = 3,0 y a un contenido de sólidos solubles finales de 65° Brix (medida que se obtiene directamente del refractómetro).

Es indispensable entonces que el industrial conozca y esté seguro con qué grado compra la pectina y en que producto va a ser usada; la pectina HM más corriente en el mercado es de 150° SAG (SS = 65%, pH = 3,0 - 3,5, resistencia del gel = 23,5% hundimiento), pero se pueden conseguir de otras graduaciones.



Figura II.9: Ridgelmómetro (equipo para medir la graduación de la pectina)

II.2.6. Métodos de extracción de pectina

Existen muchos procesos patentados para obtener pectinas; en cada uno de ellos, se obtienen productos de diferente calidad; así sus aplicaciones dependen mucho del método de obtención (Devia, 2003; Guidi y Quiroga, 2010). Esto es entendible considerando la complejidad estructural y la variación natural de estos polisacáridos de las plantas, que dependen por ejemplo de la especie, condiciones de maduración y del tipo de almacenamiento (Andersson, 2006; Guidi y Quiroga, 2010). La extracción de pectina del tejido vegetal y su solubilización, es un proceso físico-químico que depende de diversos factores, como temperatura, pH, tipo de ácido y tiempo de extracción (Pagan, 2001; Dos Santos Siqueira y col, 2012).

Puesto que las pectinas generalmente se emplean en alimentos, es necesario extraerlas del tejido vegetal mediante el uso de reactivos, disolventes y equipos que no dejen residuos tóxicos en el producto final. Por ello, el proceso de extracción debe cumplir con estas necesidades; además, las propiedades fisicoquímicas de la pectina extraída, tales como contenido de AG, grado de gelificación y grado de esterificación, porcentaje de cenizas, entre otros, deben estar dentro del rango apropiado para que las cualidades de la pectina puedan aprovecharse (Jo y col., 2005).

Las sustancias pécticas, presentes en la mayoría de la frutas y vegetales, pero en mayor proporción en el albedo de frutas cítricas y bagazo de manzana, pueden ser extraídas empleando ácidos o álcalis. Otros métodos de extracción de polisacáridos involucran el uso de procesos físicos, microbiológicos o enzimáticos (Turakhodhaev y Khodzaev, 1993; Contreras-Esquivel y col., 1997; Hwang, 2001; Fertonani, 2006; Zapata y col., 2008).

Con la finalidad de obtener un mayor rendimiento durante la extracción de sustancias pécticas, comúnmente se realizan pretratamientos al material vegetal para facilitar la

extracción. Es imposible extraer pectina libre del tejido vegetal, porque existe en una forma insoluble conocida como protopectina (Mollea y col., 2008).

II.2.6.1. Extracción de pectina por el método convencional

Comercialmente las pectinas se extraen a altas temperaturas para hidrolizar la protopectina usando ácidos (contribuyen a romper los puentes de hidrógeno entre la celulosa y la protopectina) (Ueno y col., 2008). Diferentes ácidos pueden ser utilizados en el proceso, como el sulfúrico, fosfórico, nítrico o clorhídrico. La extracción ácida genera grandes problemas de efluentes y requiere el empleo de materiales resistentes a agentes corrosivos, lo cual aumenta los costos del proceso (Sakai y col., 1993). En algunos países los ácidos minerales son prohibidos siendo sustituidos por ácido cítrico, láctico o tartárico (Sakai y col., 1993; Canteri y col, 2012). El uso de éstos ácidos débiles como agentes extractores, es poco habitual debido a los bajos rendimientos y su alto costo. Sin embargo, existen reportes en la literatura donde su efectividad de extracción es comparable a la de los ácidos fuertes (Rodríguez-Jasso, 2003).

Las condiciones de extracción son variables, pero en general un pH entre 1-3 es utilizado por tiempos relativamente cortos de extracción (30-120 minutos) y altas temperaturas en un rango de 80-95°C (Contreras-Esquivel, 2003). En el proceso de hidrólisis ácida caliente se ha observado que el pH más ácido produce una mayor extracción (Emaga y col, 2008; Vásquez y col., 2008), pero también afecta el contenido de AG de la pectina extraída. Respecto a la duración, se ha observado que menos tiempo de cocción produce pectinas con una mejor gelificación (Hoejgaard, 2005). Según Kalapathy y Proctor (2001), tiempos de extracción largos favorecen la degradación de la molécula de pectina, principalmente asociada a la alta concentración de ácido. La relación sólido/líquido es generalmente 1/18, siendo cerca de 1/15 para bagazo de manzana y 1/35 para cáscara de cítricos, ambos deshidratados (Sakai y col, 1993; Voragen y col, 1995; Canteri y col, 2012).

La pectina solubilizada es separada del residuo sólido por filtración y/o centrifugación. Después de dicha separación la pectina se precipita con la adición de alcohol. Metanol, etanol y 2-propanol pueden ser utilizados. El precipitado obtenido por la adición de alcohol posteriormente es lavado para remover contaminantes en forma de metales pesados, residuos agrotóxicos, ácidos, azúcares, compuestos fenólicos, pigmentos y otros materiales insolubles en etanol (Voragen y col, 1995; Canteri y col, 2012). La

pectina precipitada se seca, se granula y finalmente se tamiza (Yeoh y col., 2008; Guidi y Quiroga, 2010; Woo y col., 2010).

El rendimiento de pectina depende así de las condiciones de operación utilizadas (temperatura, pH y duración del tratamiento), lo cual justifica probar la mejor combinación de ellas de acuerdo a las propiedades particulares de cada tejido vegetal. El grado de esterificación final, depende igualmente de dichas condiciones; pudiendo obtenerse pectinas fuertemente metiladas o pectinas débilmente metiladas (Hart y Fisher, 1991). Devia (2003), extrajo pectina a partir de la cáscara de naranja *Valencia* mediante hidrólisis ácida y precipitación con alcohol etílico. El rendimiento obtenido en el proceso fue del 10% (p/p) para un pH cercano a 2 y un tiempo de hidrólisis entre 30 y 40 minutos. La pectina obtenida presentó una buena apariencia con capacidades de gelación comparables al estándar comercial. Contreras-Esquivel y col., (2006) extrajeron pectina de pomaza de limón a un pH de 2 (ajustado con HCl) y 90°C por 1 h, siguiendo el procedimiento descrito por Royo-Iranzo y col. (1975) y obtuvieron un rendimiento de 20,2% (g pectina/100 g de pomaza seca). Estos resultados son comparables aunque algo inferiores a los obtenidos por Seggiani y col. (2008), quienes emplearon agua acidulada con HCl y HNO₃ (concentración 0,2 M) a 70°C por 4h para la solubilización de pectina de cáscara de limones y posterior precipitación alcohólica, obteniendo valores cercanos al 25 % de pectina. Kalapathy y Proctor (2001), obtuvieron pectina por extracción ácida de cáscaras de cítricos seguido de una filtración y precipitación con alcohol 2-propanol.

II.2.6.2. Extracción de pectina por métodos biológicos

Las extracciones microbiológica y enzimática se conocen como métodos biológicos de extracción (Contreras-Esquivel y col., 1997).

II.2.6.2.1. Extracción microbiológica de pectina

El término “microbiológica” se refiere al cultivo de microorganismos productores de PPasas, en medios conteniendo como sustrato la materia prima que es fuente de pectina. Tradicionalmente se usan hongos y levaduras (*G. klebahnii*, *Kluyveromices marxianus* y *Endomicopsis capsulares*). Si bien los rendimientos en escala de laboratorio son mínimamente aceptables (10 %) y se pueden obtener pectinas de mejor calidad, el cambio de escala es dificultoso debido a las restricciones para transferir energía

(agitación, aireación adecuadas para el microorganismo en el biorreactor) a medios muy viscosos (generados por la solubilización de las sustancias pécticas) (Sakai y Okushima, 1980).

II.2.6.2.2. 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.

II.2.6.3. Extracción de pectina por métodos fisicoquímicos

Se han empleado otros métodos para extraer la protopectina de las plantas, como ser agentes quelantes para remover los cationes que constituyen a los ácidos pécticos (Ueno y col., 2008). El rendimiento de pectina también depende de las condiciones de operación como la temperatura, el tiempo de extracción, el pH, los tipos de solventes de extracción usados y de agentes quelantes adicionados, como es el caso del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y del ácido ciclohexanodiaminotetraacético (CDTA) para ayudar a liberar la pectina de la pared celular (Yeoh y col., 2008).

II.2.6.4. Extracción de pectina asistida por microondas

Se ha evaluado el uso de microondas para la extracción de pectina (Manabe y col., 1988; Fishman y col., 2000). Existen reportes de la aplicación del método durante la extracción de pectina de cáscara de naranja (Fishman y col., 2000; Kratchanova y col., 2004; Liu y col., 2006), pomaza de manzana (Wang y col., 2007) y pulpa de remolacha azucarera (Fishman y col., 2008). De igual manera, las características fisicoquímicas de la pectina obtenida por esta tecnología son mejores que las obtenidas con la extracción convencional (Kratchanova y col., 2004; Fishman y col., 2000). Todos los autores concluyeron que la aplicación de microondas en la extracción de pectina redujo considerablemente el tiempo de extracción con respecto al método convencional, lo cual tiene un efecto directo sobre la calidad de la pectina extraída. Las condiciones empleadas para llevar a cabo las extracciones mediante esta tecnología van de los 100°C y tiempos de 3 a 10 minutos.

II.2.6.5. Otros métodos de extracción físico-química de pectinas

Se han empleado otros métodos físico-químicos de extracción de pectinas. Ralet y Thibault (1994) usaron la técnica de extrusión como pretratamiento para la extracción de pectina de lima. En esta investigación se concluyó que la cantidad de pectinas

solubles en agua se incrementó después del pretratamiento de extrusión. Rezzoug y col., (2008) obtuvieron un alto rendimiento de pectina en seis minutos, utilizando un pretratamiento termo-mecánico en el que sometieron cáscaras de naranja a presión de vapor (100-700 kPa), seguido de una descompresión instantánea a vacío a 5 kPa.

Se exploró el uso de agua subcrítica (agua sobrecalentada cuya temperatura está comprendida entre el punto de ebullición 100 °C y la temperatura crítica 374 °C y que se mantiene líquida por efecto de la presión) como solvente de extracción de pectina de cáscara de cítricos y pomaza de manzana, investigándose el efecto de la temperatura de extracción sobre las propiedades de las pectinas. El rendimiento máximo de pectina de cáscara de cítricos y pectina de orujo de manzana fue de 21,95% y 16,68%, respectivamente (Wang y col., 2014). Se ha reportado la extracción de pectina de un fruto cítrico japonés conocido como yuzu (*Citrus junos*) usando agua supercrítica a 160 °C y 20 MPa de presión, obteniéndose altos rendimientos (Ueno y col., 2008; Sánchez Aldana-Villarruel y col, 2011).

II.2.7. Composición y pureza de la pectina comercial según el Código Alimentario Argentino

Según la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), la pectina es un Aditivo Alimentario.

Los aditivos son ingredientes agregados intencionalmente, sin el propósito de nutrir, con el objeto de modificar las características físicas, químicas, biológicas o sensoriales, durante el proceso de elaboración y/o envasado y/o acondicionado, almacenado, transporte o manipulación de un alimento. En general se utilizan para aumentar la estabilidad o capacidad de conservación, incrementar la aceptabilidad de alimentos genuinos, pero faltos de atractivo, permitir la elaboración más económica y en gran escala de alimentos de composición y calidad constante en función del tiempo. Son ejemplo de ello, los antioxidantes, espesantes, colorantes, los conservantes, los gelificantes, etc.

Le pectinas se clasifican según el Sistema Numérico Internacional de los Aditivos en E440(i) para las pectinas de alto metoxilo y de bajo metoxilo convencionales, y en E440(ii) para las pectinas de bajo metoxilo amidadas.

El texto del Código Alimentario Argentino (CAA) hace referencia en su Capítulo XVIII. Artículos: 1391 al 1406 a los Aditivos Alimentarios. (Actualizado al 1/2014). La pectina como aditivo según el CAA debe responder a las siguientes especificaciones:

PECTINA (En polvo) (Res 1782, 3.8.83)

Definición: Polímero constituido esencialmente por unidades de ácido galacturónico parcialmente esterificado con metanol.

Los grupos carboxílicos remanentes, pueden estar en la forma de ácido libre o como sales de amonio, potasio, sodio o calcio.

Se obtiene por extracción de materias primas vegetales.

El producto comercial puede presentarse mezclado con azúcares para regular el poder gelificante.

Descripción: Polvo blanco amarillento, ligeramente grisáceo o ligeramente pardo.

Características:

Soluble casi totalmente en 20 partes de agua e insoluble en metanol.

Pérdida por desecación, 100-105°C, 2h, máx.: 12%.

Cenizas insolubles en ácido clorhídrico, máx: 1%. Metanol, etanol e isopropanol libres, separadamente o en conjunto, máx: 1% sobre base seca.

Dióxido de azufre residual, máx: 50 mg/kg

Nitrógeno total, máx: 0,5%, después de lavado con ácido y etanol.

Arsénico, como As, máx: 3 mg/kg. Plomo, como Pb, máx: 10 mg/kg. Zinc, máx: 25 mg/kg. Cobre, máx: 50 mg/kg.

Ácido galacturónico, mín: 65% calculado sobre base seca, libre de cenizas y azúcares, si los tuviera.

Gelificante-Espesante-Estabilizante

II.2.8. Aplicaciones de la pectina en la industria alimenticia

La pectina es un polisacárido natural que posee un amplio espectro de propiedades funcionales. En combinación con agua y algunas otras sustancias, puede actuar como espesante, agente gelificante, estabilizante, emulsionante, agente de unión de cationes, etc. La pectina es no sólo un eficaz o incluso necesario aditivo para formar la estructura de los productos alimenticios, sino que también tiene beneficios medicinales que incluyen bajar el nivel colesterol en la sangre, la eliminación de iones de metales pesados del cuerpo, la estabilización de la presión arterial, y la restauración de las funciones intestinales (Voragen y col., 1995; Mamani y col, 2012; Barreto y col, 2017). La función más importante de las pectinas en los alimentos es la de actuar como gelificante, como agente de textura y espesante en alimentos procesados, y como emulsionante y estabilizante en productos lácteos y en helados (Rezzoug y col., 2008). Las principales aplicaciones de las pectinas en la industria de los alimentos se describen a continuación:

II.2.8.1. Mermeladas y jaleas

La pectina presente en estos alimentos cumple la función de proporcionarles textura, buen sabor y minimizar la sinéresis. El tipo de pectina a utilizar se debe seleccionar cuidadosamente según el alimento a elaborar. El 80% de la producción mundial usa, en la fabricación de mermeladas y jaleas, pectinas de HM, donde se añade la pectina para complementar la falta de pectinas naturales. Las mermeladas y jaleas HM son productos con alto contenido de azúcar, para que el azúcar actúe como preservante (a_w baja), con sólidos solubles (SS) por encima del 60 % y un pH entre 2,5 – 3,8 (Fennema, 1993; Willats, 2006). (Fig. II.10). Estos requerimientos limitan los posibles usos de la pectina HM como gelificante en productos dietéticos

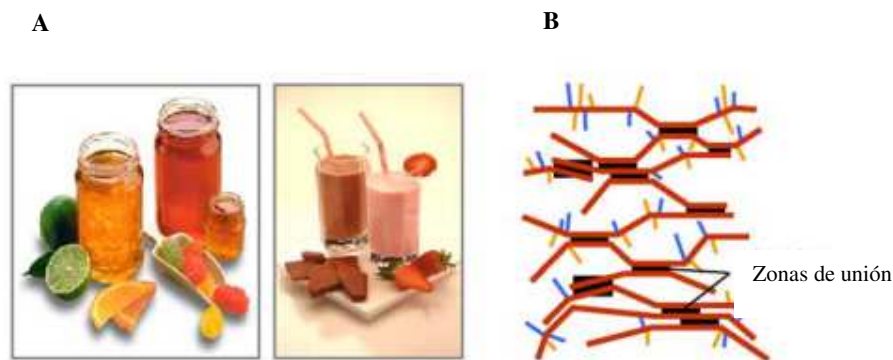


Figura II.10: Geles de pectina (Willats, 2006). Productos elaborados con pectina comercial de cítricos: mermeladas, jaleas, gomas de frutas y bebidas lácteas (A). Geles de pectina formados al generarse zonas de unión en las regiones de HG, formando una red cristalina que atrapa el agua y otras moléculas (B).

Las pectinas LM se utilizan normalmente en mermeladas y jaleas bajas en azúcar, con SS por debajo de 60 % y requieren calcio para gelificar (GENU Pectin Book, 2005-10).

II.2.8.2. Bebidas lácteas acidificadas y bebidas a base de otras fuentes de proteínas

El grado y el patrón de esterificación son importantes para determinar la efectividad de las pectinas para la estabilización (Willats, 2006). La pectina de alto HM estabiliza proteínas en condiciones ácidas en bebidas lácteas como yogures bebibles, mezclas de leche y zumos de fruta y bebidas a base de soja. Cuando estas bebidas que contienen proteínas son tratadas con calor (como en los tratamientos UHT) a pH bajo, las proteínas tienden a agregarse y crear grumos, causando una bebida inestable (Fig. II.11). Las pectinas HM, al cargarse negativamente, se unen a las partículas de proteína por

atracción iónica y protegen a las proteínas de la agregación. Esto permite que se produzcan bebidas con larga vida útil, con baja tendencia a crear sedimentos y suero liberado. La cantidad de pectina depende del contenido de proteína y del pH del producto.

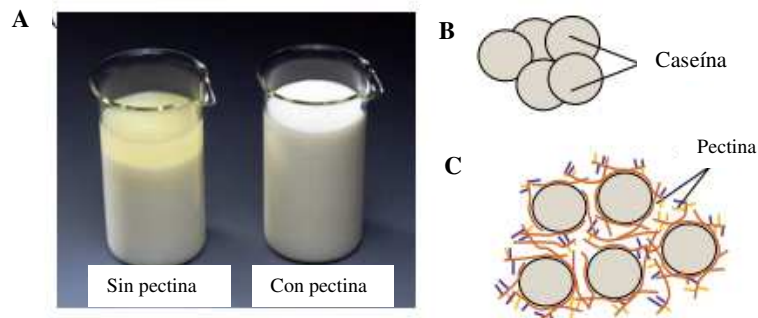


Figura II.11: Pectina y estabilización de la leche (Willats y col, 2006). Estabilización de bebidas lácteas con pectina comercial (A). Agregación de la caseína (B). Unión de las regiones de HG de pectina a las partículas de caseína, evitando así el aglomerado y posterior sedimentación (C).

II.2.8.3. Yogures

Las pectinas LM se utilizan en yogures batidos para lograr la viscosidad deseada, mezclando el producto lácteo con la pectina y agregando la fruta después de la fermentación. La pectina exhibe excelente capacidad de retención de agua, reactividad con calcio e interacción con las proteínas de la leche. La retención de agua ayuda a minimizar la sinéresis y la red proteica en el yogur se refuerza debido a la interacción de la pectina con las proteínas. La reactividad con calcio de la pectina LM ayuda a la formación de la red debido a las zonas de unión con los iones de calcio libres. De esta manera, las pectinas LM mejoran la firmeza, la sensación en la boca y la cremosidad en el yogur. Las pectinas LM contribuyen también a estabilizar las frutas en los yogures frutados.

II.2.8.4. Bebidas a base de fruta

Las pectinas HM mejoran la viscosidad y la sensación en la boca, estabilizan las partículas de pulpa de jugos. Si bien las sustancias pécticas están en el albedo, pequeñas cantidades de ellas pasan al jugo en el proceso de extracción, confiriéndole al mismo un efecto deseable. Las pectinas desarrollan un papel importante en la turbidez del jugo,

llamado vulgarmente “cloud”, permitiendo mantener una suspensión de fragmentos muy finos de pulpa. Además las pectinas son las que le confieren al jugo viscosidad que en términos corrientes se denomina “cuerpo del jugo”.

II.2.8.5. Confitería y rellenos

Las pectinas HM se usan principalmente dentro de la industria para hacer gomitas de fruta y rellenos con componentes de frutas naturales y/o sabores sintéticos. En formulaciones de gomitas se combinan usualmente con gelatina. Comparada con otros agentes gelificantes normalmente usados, la pectina ofrece la ventaja de una mejor textura y una sensación en la boca muy fina (GENU Pectin Book, 2005-10).

II.2.8.6. Helados

En los helados, la pectina controla el crecimiento de cristales de hielo grandes. En los helados frutales se recubren las frutas con pectina LM para optimizar su textura.

II.2.8.7. Salsas:

En el proceso de fabricación de ketchup y salsa de tomate se usan pectinas HM y LM, para espesar el producto, debido a su capacidad de atrapar el agua.

II.2.8.8. Productos untables o esparcibles:

La pectina se utiliza para la sustitución de la grasa en los “untables” bajos en grasa. En estos productos, se une al agua y por lo tanto mejora la estabilidad de la emulsión. Comercialmente se ha desarrollado un tipo pectina para imitar una sensación en la boca similar a la grasa. Dependiendo del contenido de grasa se usan pectinas de HM o LM.

II.2.8.9. Productos de panadería

Debido a sus propiedades de atrapar agua en su red, la pectina HM se usa en este tipo de productos para controlar la pérdida de humedad y el endurecimiento, y aumentar la vida útil de productos panificados. La pectina también asegura un producto final más suave y esponjoso (por ejemplo, en el pan lactal).

II.3. LOS CÍTRICOS COMO FUENTE DE PECTINAS

II.3.1. Generalidades sobre el sector cítrico en la Argentina

Argentina es el octavo productor mundial de cítricos con alrededor de 3 millones de toneladas anuales que representan el 2,8% de la producción mundial (Fedecitrus, 2018). Según INTA-Informes Regionales, en el año 2017, la superficie dedicada a citrus alcanzó cerca de 135.000 ha. La principal producción corresponde al limón (47%), seguido por la naranja (29%), la mandarina (16%) y el pomelo (8%) (Fedecitrus, 2018). La región del NOA produce el 62% y la del NEA el 38% de la producción nacional de cítricos. Estas regiones poseen condiciones agroecológicas ideales para el desarrollo de la producción de cítricos. Las principales provincias con citricultura comercial son: Tucumán, Entre Ríos, Salta, Corrientes, Jujuy y Misiones (Fedecitrus, 2018).

Argentina es el primer productor mundial de limón con alrededor del 21% de la producción. Las principales variedades de limón producidas son: Eureka, Génova, Lisboa y Limoneira. El sector cítrico exporta frutas frescas, jugos y aceites esenciales desde 1970. De los 1,5 millones de toneladas anuales de limón producidas cerca del 79% se procesa en el país para producir jugo, aceites esenciales y cáscaras deshidratadas y tan solo el 18 % de la producción se exporta en fresco a más de 60 países, el resto se utiliza para abastecer el mercado interno (3%) (Fedecitrus, 2018).

Las oportunidades de mejora del sector cítrico y mercados potenciales

Teniendo en cuenta que el 79% (1,1 millones de toneladas) de la producción nacional de limones se destina a la industria juguera, se requiere analizar posibilidades de uso de los subproductos industriales que permitan la diversificación de la oferta del sector. Una de las alternativas del uso de la cáscara del limón es como forraje o alimento para el ganado (cerdo, vaca, pollo, etc.). Otra alternativa es la utilización y transformación industrial del hollejo, que está compuesto por la cáscara y semilla del fruto, para la obtención de pectina (compuesto gelificante) (Fedecitrus, 2018).

Existen oportunidades para seguir desarrollando nuevos productos de citrus y lograr nuevos mercados para estos desarrollos. El desafío de obtener nuevos productos es una inquietud que genera mucho interés en los actores del sector, pero que recién en los últimos años se ha comenzado a investigar. Otra importante razón para intensificar la investigación sobre la obtención de subproductos industriales tiene que ver con la

necesidad de reducir el impacto ambiental de la industria (residuos de la fruta) a los fines de cumplimentar con las crecientes exigencias regulatorias medioambientales.

Descripción del mercado de Pectina

El consumo mundial de pectina crece constantemente y se estima que es de aproximadamente 40.000 toneladas al año. La cáscara de limón o naranja seca y la pulpa de manzana son las principales materias primas para su producción. La existencia de dichas materias primas permite a los principales productores de pectina planear un aumento anual de la producción de aproximadamente 3,8 % (Phillips, 2000). Entre las principales compañías productoras a nivel mundial de pectina se encuentran: Cargill Texturizing Solutions (Bélgica), CP Kelco (Dinamarca), Danisco Ingredients USA Inc. (Estados Unidos), Herbstreith & Fox KG Pektin-Fabriken (Alemania), Naturex AG-Obipektín (Suiza) y Yantai Andre Pectin Co. Ltd (China) (IPPA International Pectin Producers Association, 2011).

En cuanto a la región, en los comienzos de los años '90, CP Kelco adquirió una planta en Brasil y desde entonces produce pectina de cítricos en la ciudad de Limeira (Canteri y col, 2012), aprovechando las ventajas comparativas de tener al país con mayor producción de limones del mundo (Argentina) muy próximo, generando una ventaja competitiva a nivel de transporte. Continúa siendo la única fábrica todavía hoy en ese país. La Argentina posee un mercado de consumo incipiente en este producto (alrededor de 400 toneladas por año), siendo importadora de pectina. Las principales empresas importadoras en nuestro país son: Cicloquímica S.A.C., Danisco S.A, Danone Arg. S.A., Degusta Arg. S.A., Mastellone Hermanos S.A. y Unilever. De estas, la primera es la única que distribuye, ya que las otras empresas las usan directamente en los alimentos que producen (Pardo y col, 2011). La necesidad de importar se puede considerar un claro indicador de una demanda insatisfecha, debido a que no se cuenta con una producción nacional de pectina.

En un contexto de crecimiento a nivel mundial del consumo de pectina, la Argentina como uno de los mayores productores del mundo de limones, con sector industrial que procesa cerca de 1.100.000 toneladas al año y al que le quedan unas 60.000 toneladas de cáscaras del cítrico, podría extraer de ellos pectina para satisfacer el mercado interno y exportar el saldo.

II.3.2. Estructura del fruto de los cítricos: El limón

El género *Citrus* se caracteriza por tener un fruto carnoso con características muy particulares y que se denomina hesperidio. En un corte transversal de un hesperidio, se presentan los tres clásicos tejidos de un fruto que forman en conjunto el pericarpio: epicarpio, mesocarpio y endocarpio (Fig. II.12).

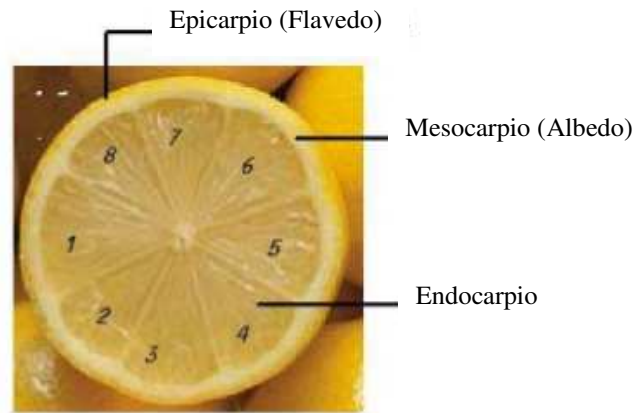


Figura II. 12: Estructura del fruto de limón

El Epicarpio (flavedo): constituido por un tejido parenquimatoso rico en pigmentos (clorofila, carotenos y xantofilas) y que contiene las células en cuyo interior se encuentra el aceite esencial o “esencia”. Sobre el epicarpio se encuentra una cutícula segregada por la epidermis que es una cera natural y tiene por objeto impedir la pérdida de humedad y proteger el fruto contra infecciones causadas por hongos. La epidermis cuenta con pequeñísimas aberturas que permiten el intercambio gaseoso del interior del fruto con el exterior.

El Mesocarpio (albedo): constituido por celulosa, hidratos de carbono y sustancias pécticas. El tejido es parenquimatoso y está formado por células irregulares de aspecto esponjoso, de color blanco, con grandes espacios intercelulares llenos de aire. El epicarpio y el mesocarpio constituyen lo que vulgarmente se conoce como cáscara del fruto.

El Endocarpio: que constituye la porción comestible del cítrico, está constituido por 8 a 12 segmentos, llamados también gajos o lóculos, distribuidos alrededor de un eje central

que presenta la misma composición del albedo. Los segmentos están envueltos en una sutil membrana, en cuyo interior se desarrollan numerosas células glandulosas, ricas en jugo, y que se denominan también celdas o vesículas glandulares. En el ángulo interno del lóculo se ubican las semillas.

En el aprovechamiento industrial de los cítricos mediante distintas tecnologías se obtienen principalmente tres productos intermedios:

1. Jugo (45- 55%)
2. Cáscara (44-55%)
3. Aceites esenciales (0,2- 0,5%)

Cada uno de estos productos tiene una composición química definida, pero es en la cáscara, específicamente en el albedo donde están concentradas las sustancias pécticas.

II.4. LAS ENZIMAS PECTICAS

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).

II.4. 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. (Jayani, 2005).

II.4.1.1. 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.II.13). 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.

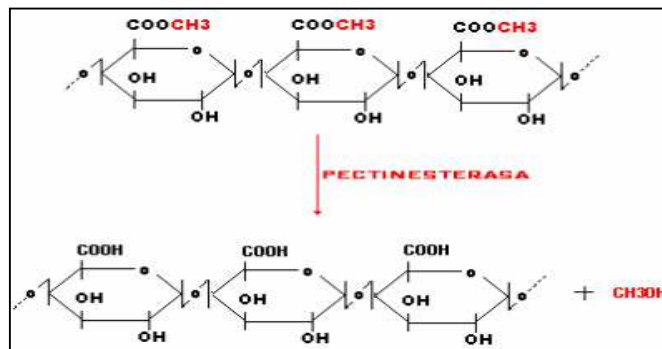


Figura II.13: Mecanismo de acción de las enzimas desesterificantes (pectinesterasa) (Ríos Alzate y Arias Vargas, 2002).

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.

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, 2005).

II.4.1.2. Enzimas depolimerizantes (poligalacturonasas y liasas):

a) Poligalacturonasas:

Las poligalacturonasas (PGasas) son enzimas pécticas que catalizan la ruptura de los enlaces glicosídicos α -(1,4) de las cadenas de APG (Fig. II.14).

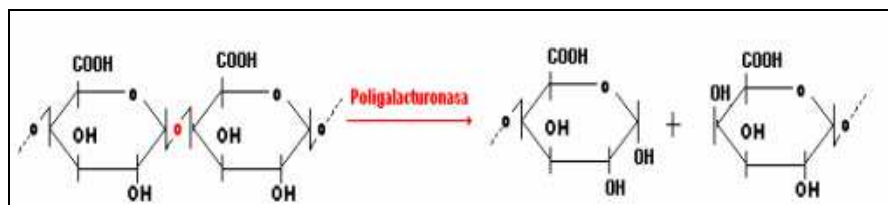


Figura II.14: Mecanismo de acción de las enzimas depolimerizantes (poligalacturonasas) (Ríos Alzate y Arias Vargas, 2002).

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 y Pretorius, 2000).

Las endo-PG producen ruptura al azar de los enlaces glicosídicos α -1,4 del ácido pectínico, liberando monómeros de AG y oligómeros de dos o tres restos (Fig. II.15).

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 α -1,4 de los enlaces glicosídicos a partir del extremo no reductor de la cadena de ácido pectínico, dando AG como producto mayoritario de la reacción (Fig. II.16). 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.

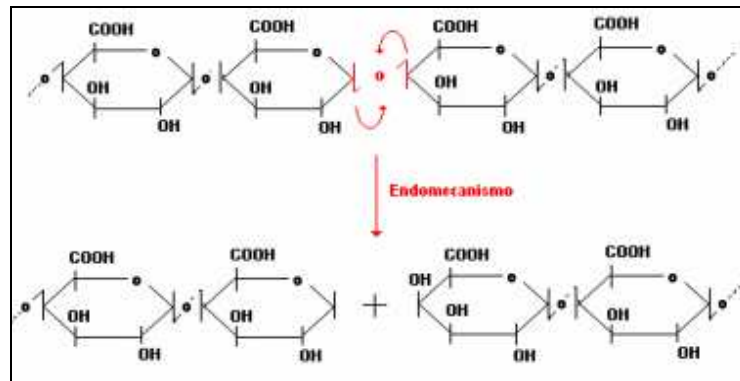


Figura II.15: Mecanismo de acción endo de las poligalacturonasas (Ríos Alzate y Arias Vargas, 2002).

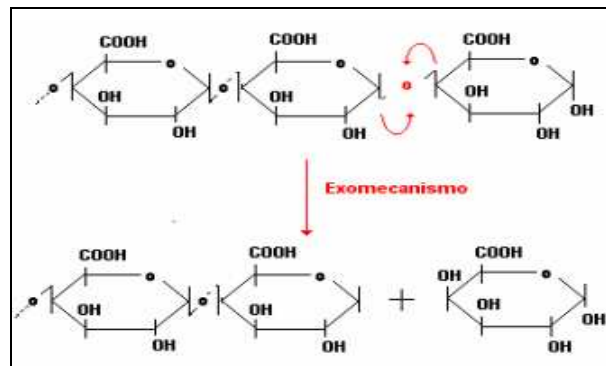


Figura II.16: Mecanismo de acción exo de las poligalacturonasas (Ríos Alzate y Arias Vargas, 2002).

Las PGasas microbianas, 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* 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 (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).

b) *Liasas*:

Las liasas (o transelimininasas) producen una ruptura no hidrolítica de las sustancias pécticas, mediante un mecanismo de transeliminación. Rompen los enlaces glicosídicos α -1,4 de la molécula de ácido péctico por un mecanismo de β -eliminación, formando un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 por cada enlace glicosídico roto (Fig. II.17). 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, 2005).

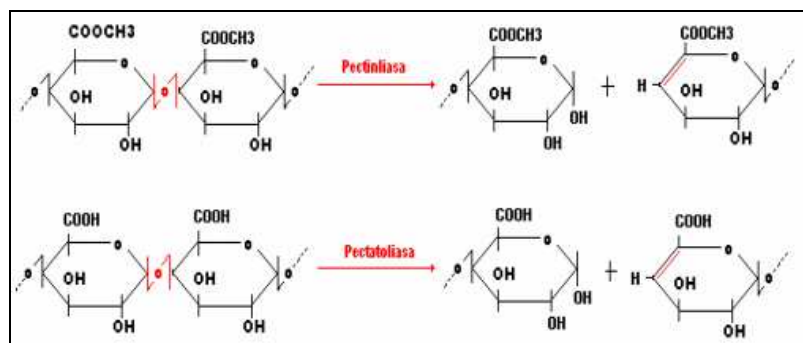


Figura II.17: Mecanismo de acción de las enzimas depolimerizantes liasas (pectinliasa y pectatoliasa) (Ríos Alzate y Arias Vargas, 2002).

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 floclulantes que aparecen cuando, por acción de PG y PE, se generan derivados de pectina desesterificados los que se ponen en contacto con el Ca^{2+} proveniente de la fruta (Delgado y col., 1992).

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

II.4.1.3. Protopectinasas (PPasas):

Las enzimas que catalizan la solubilización de protopectina, liberando pectina soluble de los tejidos vegetales, se conocen como enzimas solubilizadoras de pectina o protopectinasas (PPasas) (Sakai y Okushima, 1978).

Estas PPasas son un grupo heterogéneo de enzimas con diferentes actividades catalíticas, dependiendo de sus mecanismos de acción se dividen en: PPasas tipo A y tipo B. En la Figura II.18, se muestra un esquema de la estructura de la protopectina y se representan los productos de las diferentes formas de acción de las PPasas.

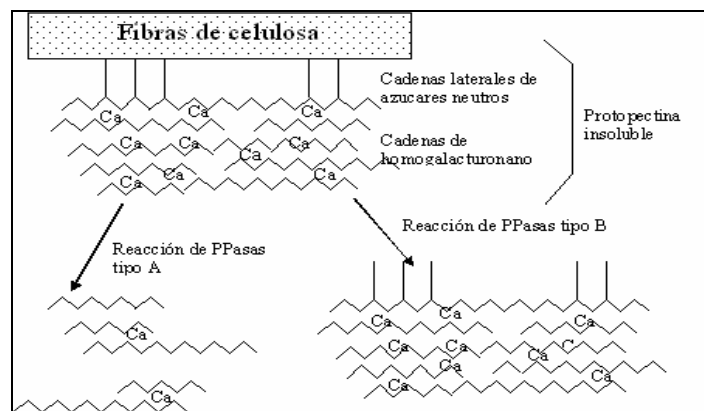


Figura II. 18: Acción de las PPasas Tipo A y Tipo B (Nakamura y col., 1995)

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 (Nakamura y col., 1995; Zapata Zapata, 2008).

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 (Nakamura y col., 1995; Cavalitto y col., 1999; Zapata Zapata, 2008).

La primer enzima péctica con actividad 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. 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 II.4 se presentan el tipo de enzimas pécticas producidas por algunos microorganismos.

Tabla II.4: 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, 2005)

II.4. 2. Principales aplicaciones de las enzimas pécticas

Las pectinasas microbianas son importantes desde el punto de vista industrial principalmente por su uso en el procesamiento de frutas y vegetales (elaboración de vinos, extracción y clarificación de jugos de frutas, extracción de aceites vegetales, maceración de vegetales, etc.) (Hoondal y col., 2002; 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 (Blanco y col., 1999).

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

II.4.2.1. Maceración

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. 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. 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.

II.4.2.2. Extracción de pectina

Algunas pectinasas (particularmente las PPasas) tienen la capacidad de liberar pectina soluble a partir de protopectina de la pared celular de las plantas. La extracción enzimática de pectina, depende de la concentración de enzima, del pH, tiempo de reacción y de la velocidad de agitación (Nakamura y col., 1995).

Las condiciones usadas para la extracción de pectina por métodos enzimáticas, 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 pectinasas, sin embargo, son escasos los estudios que relacionan dichos procesos con la optimización de las condiciones de operación (Contreras Esquivel y col., 1997; Schroder, 2004).

II.4.2.3. Extracción y clarificación de jugos de frutas

Los jugos de frutas son generalmente extraídos bajo presión, pero esto no es fácil en el caso de frutas blandas como frutillas, manzanas, frambuesas, arándanos, etc. Las pectinasas se adicionan a la masa prensada de frutas para degradar a la pectina que causa la gelificación de la pulpa, facilitando así el proceso de filtración y asegurando altos rendimientos de jugo (Kashyap 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).

CAPÍTULO III

III.1. PROPUESTA METODOLÓGICA

El presente trabajo de tesis se planteó en dos etapas claramente diferenciadas pero concatenadas: una dedicada a la producción de la enzima PG por *W. anomalus* y otra donde se estudió el proceso de extracción enzimática de pectina a partir de albedo de limón.

En la primera etapa se estudió la capacidad de la levadura pectinolítica, autóctona de la Provincia de Misiones (*W. anomalus*) de crecer y producir PG en un medio de cultivo sintético, compuesto por glucosa como fuente de carbono y energía, pectina de citrus como inductor, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, vitaminas, aminoácidos, sales. Se evaluó la influencia de las vitaminas y los aminoácidos sobre el crecimiento y la producción de la enzima. Los cultivos se realizaron a escala frascos agitados, a 30 °C, a 180 rpm, hasta 24 h. Los sobrenadantes de los cultivos, libre de células, denominados extractos enzimáticos (EE), se utilizaron como fuente de enzima para los estudios de extracción de pectina.

En la segunda etapa se evaluó la utilización del EE de *W. anomalus* en la extracción de pectina a partir de albedo de limón. Para la obtención de la materia prima, el albedo obtenido a partir de limones frescos, fue escaldado, lavado, secado, molido y tamizado. El proceso de extracción se realizó en frascos Erlenmeyer conteniendo el material vegetal, buffer y el EE, los mismos se incubaron a 40 °C, durante 6 h, con agitación. La mezcla resultante se centrifugó y el material polimérico del sobrenadante se precipitó con etanol y se secó. Se evaluó el efecto del pH, la relación sólido/líquido, la temperatura y el tiempo de extracción sobre el rendimiento del proceso extractivo. Posteriormente se comparó con el rendimiento utilizando el método de extracción químico. Finalmente se caracterizó parcialmente la pectina extraída.

III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1. PRODUCCIÓN DE POLIGALACTURONASA POR *W. anomalus*

III.2.1.1. Microorganismo y medios de cultivos

Microorganismo: *W. anomalus*, aislada de cáscaras de frutas cítricas en el laboratorio de “Microbiología de los Alimentos y Biotecnología, Dr. Fernando Benassi” de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales – UNaM (Martos y col., 2013a).

Conservación por liofilización: a partir de estrías jóvenes de la levadura en medio de conservación se realizó una suspensión de células en una solución estéril crioprotectora de leche descremada (Molico) al 10 % (p/v) e inositol trifosfato (Anedra) al 5 % (p/v). La suspensión fue congelada a -80 °C y posteriormente liofilizadas en ampollas. 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. Los cultivos, fueron conservados a 5 °C hasta 2 meses.

Conservación en estrías: las cepas se sembraron en estrías de medio de conservación, se incubaron a 30°C durante 24 h y se conservaron a 5 °C.

Medios de cultivos:

a) *Medio de conservación:* extracto de levadura (Sigma), 5 g/L; triptona (Difco), 5 g/L; glucosa (Britania), 15 g/L; agar (Britania), 15 g/L; pH: 5,0. El medio de cultivo se esterilizó a 1 atm, 15 min.

b) *Medio YNB:* Yeast Nitrogen Base (Difco), 6,7 g/L; glucosa (Britania), 5 g/L; pectina cítrica comercial (Parafarm), 5 g/L; pH 5,0.

La pectina fue lavada con etanol al 70 % en HCl 0,05 N para eliminar los restos de azúcares que normalmente contienen las pectinas comerciales como excipiente.

La solución conteniendo glucosa (fuente de carbono y energía, FCE) y pectina (inductor), se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121 °C. La solución de YNB (10 ×) se esterilizó por filtración utilizando un filtro de nitrato de celulosa (Sartorius, 0,22 µm) y se la conservó a 5 °C. Antes de inocular, se reconstituyó el medio de cultivo y se controló el pH de la solución en forma aséptica con varillas de pH con divisiones 0,2/0,5 unidades de pH (Merck), el cual varió entre 4,8 – 5,0. El medio completo se conservó a 5 °C hasta su utilización y por un tiempo máximo de una semana (Martos y col., 2013a).

La solución conteniendo la FCE se esterilizó en forma separada de la solución YNB para evitar la reacción de Maillard que tendría lugar entre los grupos carbonilos de los azúcares con los grupos amino de los aminoácidos presentes en el medio YNB.

La solución YNB aporta al medio de cultivo, fuente de nitrógeno (sulfato de amonio), aminoácidos (histidina, metionina y triptófano), vitaminas (biotina, pantotenato cálcico, ácido fólico, inositol, niacina, ácido *p*-amino benzoico, riboflavina, tiamina) y sales.

c) *Medio sintético (MS)*: glucosa (Britania), 5 g/L; pectina (Parafarm), 5 g/L; (NH₄)₂SO₄, 3 g/L; KH₂PO₄, 1 g/L; MgSO₄, 0,5 g/L; CaCl₂, 0,1 g/L; solución de vitaminas (1000 ×), 1 ml/L; solución de aminoácidos (100 ×), 10 ml/L; solución de microelementos 1000 ×, 1 ml/L; pH 5,0 (Manual Difco, 1986).

Solución (1000 ×) de vitaminas (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 (100 ×) de aminoácidos (Sigma) (mg/L): histidina, 10; metionina, 20 y triptófano, 20.

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

La pectina y la glucosa, el sulfato de amonio, los fosfatos, el resto de las sales (MgSO₄, CaCl₂, solución de microelementos) y los aminoácidos, fueron esterilizados por separado, en autoclave 15 min a 121 °C, previo ajuste del pH a 5,0. La solución de vitaminas se esterilizó por filtración utilizando membranas de nitrato de celulosa de 0,22 μm de tamaño de poro (Sartorius). Antes de su utilización, se mezclaron las cantidades correspondientes de cada una de las soluciones en forma aséptica y se midió el pH del medio completo.

III.2.1.2. Fermentación

Para el inóculo se partió de cultivos jóvenes (24 h) de la levadura desarrollada en estrías de medio de conservación. Se realizó una suspensión de células en agua destilada estéril y se efectuaron diluciones decimales, de tal modo de ajustar la concentración celular a una Densidad Óptica de 0,96, medidos en un espectrofotómetro a 620 nm.

Los cultivos se realizaron en frascos Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 95 mL del medio MS o YNB), según corresponda, inoculados con 5 ml de la suspensión de células (Abs₆₂₀=0,96). Los frascos Erlenmeyer se incubaron a 30 °C en baño termostático rotatorio (New Brunswick, modelo 676, 1,27 cm de excentricidad) a 180 rpm. En el

transcurso de la fermentación se fueron tomando muestras a ciertos intervalos de tiempo. Las muestras fueron centrifugadas a $2350 \times g$ por 10 min, para remover las células de levadura.

Debido a que la enzima es extracelular, el sobrenadante, denominado extracto enzimático (EE), fue utilizado para evaluar la actividad pectinolítica. Los EE, se mantuvieron a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización como fuente de enzima extracelular. Cuando fue necesario, las muestras se descongelaron rápidamente en un baño de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación a los efectos de acelerar el proceso de modo de minimizar la desnaturalización de las proteínas presentes.

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

III.2.1.3. Influencia de las vitaminas sobre el crecimiento de *W. anomalus* y la producción de PG

En esta etapa del trabajo se definieron las necesidades de vitaminas para el crecimiento de la levadura en estudio.

Para estudiar el efecto de las vitaminas sobre el crecimiento de *W. anomalus* se realizaron una serie de cultivos sólidos en medio MS, omitiendo la adición de una vitamina en cada experiencia, lo que permitió evaluar la influencia de ese único nutriente. Para ello se prepararon 9 medios de cultivos denominados MS₂ a MS₁₀ (Tabla III.1).

Tabla III.1: Soluciones de vitaminas para los medios MS₂ a MS₁₀.

Vitamina	MS ₂	MS ₃	MS ₄	MS ₅	MS ₆	MS ₇	MS ₈	MS ₉	MS ₁₀
Biotina	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Pantotenato de Ca	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ac. Fólico	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Niacina	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Ac. <i>p</i> -aminobenz.	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Piridoxina	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Riboflavina	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Tiamina	+	+	+	+	+	+	+	+	-

El medio completo se distribuyó en Cajas Petri a razón de 20 mL/placa, las mismas fueron conservadas a 4 °C durante no más de 7 días y antes de su utilización fueron secadas en estufa de cultivo a 40 °C por 2 h. A partir de una estría joven de la levadura en estudio, se sembró una sección (1/4) de la Caja Petri, que contenía el correspondiente medio. Las mismas se incubaron a 30 °C y se fueron realizando repiques sucesivos en las otras secciones de la placa, cada 24 h y hasta los 4 días.

III.2.1.4. Influencia de los aminoácidos sobre el crecimiento de *W. anomalus* y la producción de PG

Para estudiar el efecto de los aminoácidos sobre la expresión de PG y la producción de biomasa, se realizaron una serie de cultivos en medio MS líquido, omitiendo la adición de un aminoácido en cada experiencia. Se prepararon 3 medios de cultivos denominados MS₁₁ a MS₁₃, según se detalla en la Tabla III.2.

Tabla III.2: Soluciones de aminoácidos para los medios MS₁₁ a MS₁₃.

Aminoácido	MS ₁₁	MS ₁₂	MS ₁₃
Histidina	+	+	-
Metionina	-	+	+
Triptófano	+	-	+

Las fermentaciones se realizaron en medio líquido, según se describió anteriormente (III.2.1.2) realizándose dos pasajes sucesivos de 24 h en cada medio (pre-cultivos) y evaluándose el crecimiento y la producción de la enzima en el 3° cultivo, a las 12 h de fermentación.

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

III.2.1.5. Determinaciones analíticas

Actividad poligalacturonasa (PG):

La actividad PG se determinó midiendo los grupos reductores liberados mediante el método del DNS (Miller, 1951). Se utilizó ácido galacturónico (AG) como patrón.

Sustrato: ácido poligalacturónico (APG -Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, EE.UU.), 2 g/L en buffer acetato de sodio/ácido acético (BAC) 0,2 M, pH 5,0.

Reactivo DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma), 1 g; fenol, 0,2 g; NaOH, 1 g; H₂O, 100 mL. Se preparó la solución de NaOH con agua destilada hervida y enfriada a temperatura ambiente. Se mezcló el DNS con el fenol y se agregó lentamente la solución de NaOH. Antes de usar el reactivo DNS, se agregaron 0,05 g de Na₂SO₃.

Procedimiento: se colocaron 1,45 mL del sustrato en tubos de 12 mm de diámetro interno y 190 mm de longitud. A cada tubo se le adicionó 50 µL del EE diluido apropiadamente y se llevaron a baño termostatzado a 37 °C durante 10 min. Luego, los tubos se colocaron nuevamente en el baño de agua-hielo y se agregó 1,5 ml del reactivo DNS a cada tubo. Se transfirieron los tubos a baño de agua hirviente, durante 15 min. Posteriormente se agregó a cada tubo, 0,5 ml de sal de Rochelle (al 40 % p/v), se llevaron a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 575 nm (espectrofotómetro Beckman DU 640). Mediante una curva de calibración de AG (Sigma) en el rango 0 a 900 mg/l, en BAc(0,2 M, pH 5,0), se determinó la cantidad equivalente de grupos reductores producidos durante la reacción.

El blanco de la reacción se realizó con la enzima inactivada térmicamente (5 min, 100 °C). El valor de absorbancia del blanco se usó como control de la posible degradación del APG durante la incubación y como medida de la cantidad de AG residual, presente en los sobrenadantes, como producto de la fermentación.

Cálculo de actividad PG (UE/ml):

$$PG = \frac{[GALA] \frac{mg}{l}}{212,2 \frac{g}{mol}} * \frac{Vol de reacción (ml)}{t de reacción (min)} * \frac{1}{Vol enzima (\mu l)} * \frac{1}{Dil} * \frac{1000 \mu l}{ml}$$

Una unidad de actividad PG se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de ácido galacturónico por minuto bajo las condiciones de ensayo (Forchiassin y col., 2004).

Fundamento de la técnica: Durante la reacción, el reactivo 3,5-dinitrosalicílico es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico y la función aldehído de los grupos reductores oxidada a ácido carboxílico. El fenol se agrega a la mezcla de reacción para aumentar la intensidad del color. El álcali es necesario para la acción reductora del AG sobre el DNS. El sulfito se utiliza para eliminar el oxígeno disuelto de la solución y evitar así la pérdida de grupos reductores por oxidación. La sal de Rochelle se agrega a la mezcla de reacción luego del desarrollo del color y antes del enfriamiento para estabilizar el color.

Biomasa: El crecimiento microbiano (g/L) se determinó por medidas de peso seco. Luego del proceso de centrifugación, las células fueron lavadas con agua destilada, centrifugadas y colocadas en estufa a 45 °C, hasta peso constante.

Glucosa residual: La glucosa residual fue determinada con el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (Glicemia, Wiener, Argentina).

III.2.2. EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE PECTINA DE ALBEDO DE LIMÓN

III. 2.2.1. Protocolo de extracción N° 1 con albedo húmedo

La extracción enzimática, a partir de albedo húmedo involucró las siguientes etapas:

A) Obtención del albedo

Las experiencias se realizaron utilizando como materia prima limones frescos de la variedad Eureka. Las frutas fueron seleccionadas y lavadas. En el paso de selección del material se debe tener en cuenta la calidad del material vegetal que se ha de utilizar, es decir, material sin hongos, sin partes putrefactas y el nivel de maduración del vegetal, ya que el material sin madurar tiende a contener mayor porcentaje de pectina (Devia, 2003).

Las cáscaras (flavedo) fueron retiradas manualmente haciendo cortes circulares, con la ayuda de un cuchillo de acero inoxidable. Luego se extrajo el albedo. Otra muestra consistió en extraer el albedo y flavedo. Este material vegetal (albedo o albedo + flavedo) se cortó en piezas pequeñas y se mezcló con agua (relación 1:2, peso cáscara: volumen de agua).

B) Pretratamiento del material vegetal

El material vegetal extraído (albedo o albedo + flavedo) fue inmediatamente tratado, con calor (15 min, a 100°C) simulando un proceso de escaldado para inactivar enzimas endógenas principalmente PE, que desmetoxilan y despolimerizan las pectinas (Vasquez y col., 2008).

Para eliminar sustancias pécticas solubles, el material vegetal se lavó varias veces con agua destilada hasta obtener un líquido claro. El material vegetal así obtenido se filtró con tela muselina de nylon, se prensó manualmente para eliminar el líquido residual y se trituró con un procesador de alimentos doméstico (Fig. III.1). En este tratamiento se habrán eliminado los azúcares, principios amargos, materias colorantes, ácidos, sustancias pécticas solubles y algunos otros componentes solubles en agua. El material vegetal así obtenido se conservó a

5 °C hasta el momento de ser utilizado, aproximadamente dentro de las 24 h (Contreras Esquivel y col., 1999; Rojas y col., 2008).

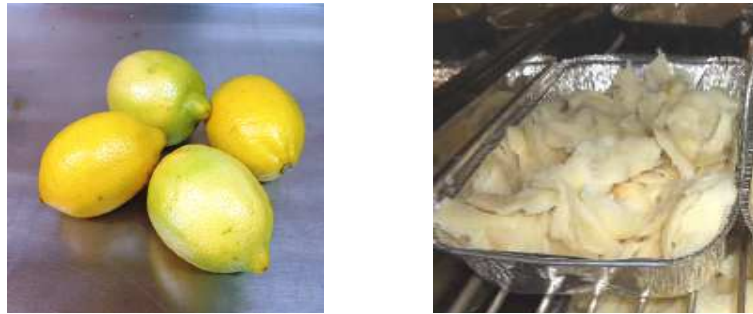


Figura III. 1: Albedo húmedo obtenido a partir de limones de la variedad Eureka

C) Tratamiento del material vegetal con la enzima

Se colocaron 30 g del material vegetal (albedo o albedo + flavedo), procesado según se describió anteriormente, en frascos Erlenmeyer de 250 mL, a los que se les agregó 20 mL de buffer acetato de sodio/ácido acético (BAC) (0,2 M, pH 5,0) y 20 mL de 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. III.2).



Figura III. 2: Frascos Erlenmeyer conteniendo la mezcla de reacción (material vegetal +EE+buffer), incubados en shaker rotatorio a 150 rpm.

D) Recuperación de la pectina del sobrenadante

Finalizada la etapa de incubación, la fase líquida fue separada de la fase sólida (albedo 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 colador doméstico (Fig. III.3).

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 (Fig. III.4A). 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.

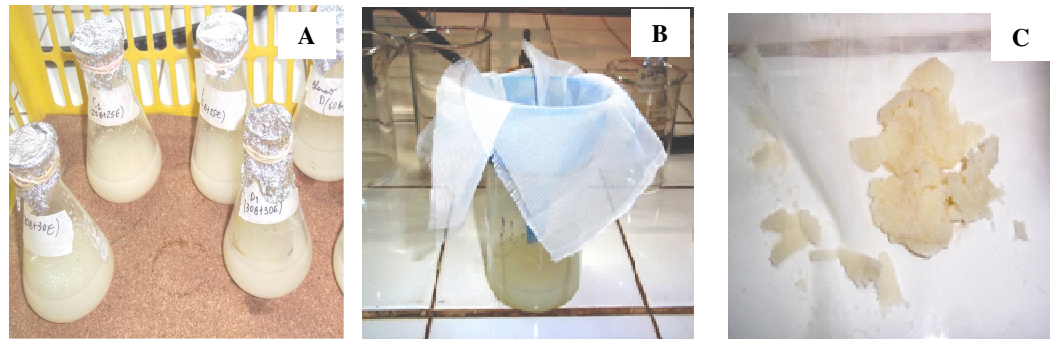


Figura III. 3: Frascos Erlenmeyer conteniendo la mezcla de reacción luego de la etapa de incubación (A), filtración de la mezcla de reacción con tela de muselina (B), residuo (tejido macerado) despectinizado (C)

E) 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. III.4B). 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 (albedo), según la siguiente ecuación (Contreras Esquivel, 1999; Zapata y col., 2009; Munhoz y col., 2010; Dos Santos Siqueira, 2012).

$$\text{Rendimiento (\%)} = \text{pectina extraída (g)} \times 100 / \text{albedo en base seca (g)}$$

En todos los casos, las experiencias se realizaron por duplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios.



Figura III. 4: Gel de material polimérico, luego de la precipitación con etanol (A). Material insoluble en etanol secado a 40 °C (B)

III. 2.2.2. Protocolo de extracción N° 2 con protopectina

Obtención de la protopectina:

Para la obtención de la protopectina, se partió de albedo obtenido según se describió en la etapa anterior. El albedo fue secado en estufa a 60 °C, durante 2 h y luego a 50 °C hasta peso constante, posteriormente fue molido en un molino de café y tamizado tomando la fracción de partículas que atravesó una malla de 45 mesh, a este material se lo denominó albedo tamizado (AT) (Fig. III.5).

El hecho de trabajar con albedo seco en lugar de albedo húmedo, permitió contar con un stock de materia prima homogénea a los efectos de ser utilizada en las diferentes experiencias y evitar posibles variaciones que se pueden generar en el contenido de pectina debido a cambios en el grado de maduración y época de cosecha de los limones utilizados. Además, utilizar albedo seco, triturado y molido facilitaría la adsorción de la enzima al sólido (Zapata Zapata, 2008). La tasa de transferencia de masa es directamente proporcional al área superficial del sólido, de esa forma, la reducción en el tamaño de las partículas aumenta la tasa de extracción hasta ciertos límites (Fellows, 2007).

El producto deshidratado se almacenó en frascos de polietileno al abrigo de la luz y de la humedad (Soares y col., 2009). Vale resaltar la importancia de la rápida deshidratación de de la materia prima, a fin de evitar la acción de enzimas y hongos productores de enzimas pécticas (May, 1990; Thakur y col., 1997).



Figura III. 5: Albedo húmedo en estufa a 45 °C (A), albedo seco molido (B)

Extracción de pectina

Se colocó 1 g de AT en frascos Erlenmeyer de 125 mL, a los que se les agregó 20 mL de BAc (0,2 M, pH 5,0) y 20 mL del EE y se incubó a 40°C en baño termostatzado rotatorio (150 rpm) por 6 h. La mezcla resultante se refrigeró inmediatamente a 5 °C, a los efectos de frenar la actividad enzimática y se filtró empleando tela muselina y aplicando presión manual. El residuo se descartó y el filtrado, conteniendo la pectina solubilizada, se colocó en vasos precipitados al que se le adicionó 2 volúmenes de etanol frío al 96 % (v/v) y se refrigeró durante 2 h a 5 °C para precipitar el material polimérico (Dos Santos Siqueira, 2012). El gel de pectina obtenido se centrifugó a 2350 × g durante 10 min, descartándose el sobrenadante y se colocó en cajas de Petri de vidrio, previamente taradas, las que se mantuvieron en estufa a 40°C hasta peso constante.

El rendimiento en extracción de pectina se reportó como gramos de MIE por cada 100 g de albedo (Zapata y col., 2009). Este material fue solubilizado en 50 mL de agua destilada y se midió contenido de ácidos urónicos por el método del mhdf que se describirá posteriormente.

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

III. 2.2.3. Protocolo de extracción N° 3 con protopectina

En esta etapa se siguió el protocolo de extracción N° 2 pero se reemplazó la etapa de filtración con tela muselina, luego de la etapa de extracción, por una centrifugación a 2350 × g, durante 10 min (Vásquez y col., 2008). Finalizada la misma, el residuo se descartó y

al sobrenadante, conteniendo la pectina solubilizada, se le adicionó 2 volúmenes de etanol frío al 96 % (v/v) y se prosiguió según se detalla en el protocolo N°2.

III.2.3. 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, G., 2007).

En la presente etapa se estudió el efecto de diferentes variables, entre ellas relación sólido/líquido, pH, temperatura, concentración de la enzima y tiempo de hidrólisis, sobre la capacidad de extracción del EE con albedo de limón.

III.2.3.1. Efecto del pH

En esta etapa se evaluó la extracción de pectina a dos valores de pH, con el objeto de determinar si dicho factor tienen un efecto significativo sobre la solubilización de pectina. Se realizó la extracción a pH 3,5 (pH mezcla) y pH 4,5, este último pH se seleccionó por estar dentro del rango de estabilidad de la enzima PG (Martos y col., 2013b; Martos y col., 2014). El pH de 4,5 se debió ajustar para cada experiencia.

Se utilizó el protocolo de extracción descrito anteriormente (Protocolo de extracción N° 3).

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.

III.2.3.2. Efecto de la relación sólido/líquido

El efecto de la relación sólido-líquido ha sido estudiado por varios autores para diferentes materias primas. Se sabe que una disminución de la relación sólido-líquido 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, G., 2007).

En esta etapa del trabajo se evaluó el rendimiento de extracción de pectina, empleando diferentes relaciones sólido/líquido (p/v): 1:20, 1:40, 1:50 y 1:60, manteniendo la concentración de enzima constante. Se siguió el protocolo de extracción N° 3.

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.

III.2.3.3. Efecto de la temperatura y el tiempo

Se evaluó la solubilización enzimática de pectina a diferentes temperaturas (30 a 50 °C) y en función del tiempo de reacción, hasta las 8 h.

Se siguió el protocolo de extracción N° 3. Para cada muestra, determinadas en función del tiempo, se utilizó la totalidad de la mezcla de reacción contenida en el Erlenmeyer.

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.

III.2.3.4. Influencia de la concentración del extracto enzimático

En esta etapa se evaluó la posibilidad de utilizar menor concentración del EE, a fin de disminuir los costos del proceso. Para ellos se evaluó la solubilización de pectina, utilizando diferentes volúmenes de EE (3,125; 6,25 y 12,5 mL) pero manteniendo la misma relación sólido/líquido (1/50). Se siguió el Protocolo de extracción N° 3. 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.

III.2.4. COMPARACION DE RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN CON LA ENZIMA COMERCIAL Y EL MÉTODO QUÍMICO

El rendimiento del proceso de extracción usando el EE de *W. anomalus*, se comparó con la extracción usando la enzima comercial Novozym 33095 con actividades pectinliasa,

pectinesterasa y poligalacturonasa, provista por Frutos Patagónicos SRL. La enzima se diluyó de tal manera de obtener una solución con una actividad PG similar a la del EE de *W. anomalus* y se siguió la metodología descrita anteriormente.

La extracción química de pectina fue llevada a cabo por el procedimiento descrito por Royo- Iranzo y col., (1975). La metodología consistió en suspender 2,5 g de albedo de limón seco en 60 mL de agua destilada, ajustar el pH a 2,0 con ácido clorhídrico 1 N, calentar la mezcla a una temperatura de 90 °C en baño de agua termostaticado durante 60 minutos agitando a intervalos frecuentes, para evitar que el material sólido precipitara. Luego la mezcla se enfrió rápidamente por debajo de 25°C para minimizar la degradación térmica de la pectina y se centrifugó durante 10 minutos a 3.000 rpm. Al sobrenadante se le adicionó etanol al 95% (p/v) mediante agitación lenta y constante, la mezcla se dejó reposar durante 2 h, a 5 °C. La pectina se separó de la solución mediante centrifugación y se lavó con dos volúmenes de etanol al 50% v/v. Luego, la pectina se extendió en cápsula de vidrio para su secado en estufa a 40°C hasta peso constante. La pectina obtenida parcialmente seca se trituró, pulverizó y envasó para su almacenamiento en lugar libre de humedad (Normah y Hasnah, 2000; Rojas y col., 2008).

III.2.5. CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINA EXTRAÍDA

III. 2.5.1. 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 y Smith, 2001. En este procedimiento se emplea el reactivo *m*-hidroxidifenilo (mHDP), en presencia de ácido sulfámico (H_3NSO_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:

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 freezeada. 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. 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.

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.

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 H₂SO₄. Se debió preparar solamente la cantidad necesaria para el uso inmediato, y se almacenó a temperatura ambiente.

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 H₂SO₄, en baño de hielo. La mezcla se agitó en frío por 5 min. Se agregó 1 mL más de H₂SO₄ 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 *m*HDF/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 H₂SO₄ 20%.

Se colocó una alícuota de 400 µL de la muestra recientemente preparada y diluida en tubos de vidrio de borosilicato y se agregó 40 µL 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 µL de la solución de *m*HDP a dos tubos de cada muestra y al tubo blanco de reactivo. Al tercer tubo de muestra se agregaron 80 µL 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 H₂SO₄ 15%. Se midió absorbancia a 525 nm. (Fig. III.6). 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 III. 6: Reacción del *m*-hidroxidifenilo

III. 2.5.2. 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):

$$GE = \frac{V2 * 100}{(V1 + V2)}$$

III. 2.5.3. 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 Ridgélímetro, 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 III.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.

III.3. RESULTADOS Y DISCUSION

III.3.1. PRODUCCIÓN DE POLIGALACTURONASA POR *W. anomalus*

III.3.1.1. Cinética de crecimiento y producción de PG en el medio MS

En la Figura III.7 se presentan los valores de actividad PG y biomasa durante el curso del cultivo de *W. anomalus*, en el medio MS, con glucosa como fuente de carbono y energía y pectina como inductor.

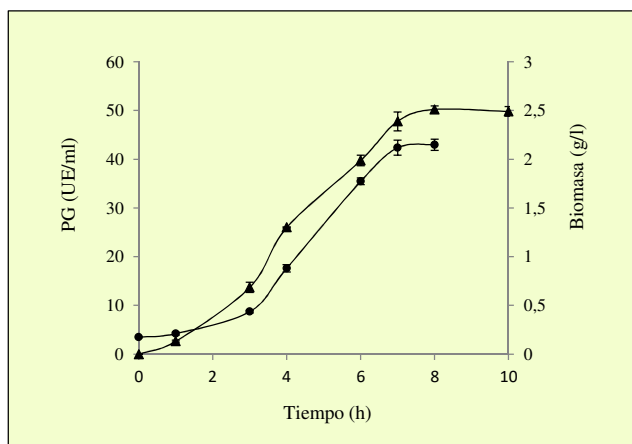


Figura III. 7: Evolución del cultivo de *W. anomalus* en el medio MS. Símbolos: Actividad PG (▲), Biomasa (●)

En la Figura III.7 se observa que la biomasa aumentó hasta un valor de $2,148 \pm 0,0570$ g/L a las 8 h de cultivo, tiempo en el cuál se consumió la totalidad de la FCE, alcanzando un rendimiento ($Y_{x/s}$) de $0,395$ g_x/g_s en base a glucosa. La producción de PG comenzó a las 2 h, obteniéndose a las 8 h de cultivo un valor de actividad PG de $50,22 \pm 0,735$ UE/mL. El pH disminuyó en el transcurso de la fermentación desde un valor inicial de 5,0, alcanzando valores cercanos a 2,8 al finalizar el cultivo.

El descenso del pH se adjudicó al consumo de NH_4^+ con la concomitante liberación de cantidades equivalentes de H^+ al medio. La síntesis de la enzima estuvo directamente asociada al crecimiento. Este es un comportamiento muy frecuente en el caso de enzimas hidrolíticas extracelulares.

La producción de enzimas extracelulares puede estar o no asociada al crecimiento celular. Uno u otro comportamiento resulta de la existencia o no de represión catabólica sobre la síntesis enzimática. En el caso de enzimas reprimibles por algún sustrato del medio de

cultivo, recién al final de la fase de crecimiento, cuando la concentración de los nutrientes disminuye, puede observarse la expresión de la misma (Cavalitto, 2003).

La producción de amilasa por *Bacillus lincheniformis* y *Aspergillus oryzae*, se produjeron durante la fase de crecimiento, otros ejemplos son la proteasa, amilasa y xilanasas de *Bacillus polymyxa*, la exopectinasa de *Aspergillus* sp (Aguilar y Huitrón, 1990) y la PG de *Kluyveromyces fragilis* (García Garibay y col., 1987). De la misma manera, la producción de PG por *A. kawachii* (Contreras Esquivel y col., 1999) y *Geotrichum klebahnii* (Cavalitto y col., 2000), estuvo asociada al crecimiento.

III.3.1.2. Influencia de las vitaminas sobre el crecimiento de *W. anomalus*

Para estudiar el efecto de las vitaminas en la producción de biomasa, se evaluó el crecimiento de *W. anomalus* en medio MS sólido, omitiendo la adición de una vitamina en cada experiencia y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III.4. En la Figura III.8 se observa el crecimiento de *W. anomalus* en los medios MS (con todas las vitaminas) y MS₂ (en ausencia de biotina).

Tabla III.4: Efecto de la omisión de una vitamina en el medio MS sobre el crecimiento de *W. anomalus*.

Medio de cultivo	Vitamina ausente en el medio	Crecimiento 4to subcultivo
MS ₂	Biotina	-
MS ₃	Pantotenato de calcio	-
MS ₄	Ácido fólico	+
MS ₅	Inositol	+
MS ₆	Niacina	+
MS ₇	Ac. <i>p</i> -aminobenzoico	+
MS ₈	Piridoxina	-
MS ₉	Riboflavina	+
MS ₁₀	Tiamina	-

El crecimiento de *W. anomalus* fue despreciable en ausencia de biotina, pantotenato de calcio, piridoxina o tiamina (Tabla III.4). Como se observa en la Figura III.8, el crecimiento de la levadura en medio MS sin biotina (MS₂) fue disminuyendo con los repiques sucesivos, siendo despreciable en el 4° repique, mientras que en presencia de

todas las vitaminas (medio MS) se observó un crecimiento abundante en los 4 repiques. Un comportamiento similar se observó cuando se repitió el ensayo en ausencia de pantotenato de calcio, piridoxina o tiamina. Esta técnica es utilizada en procedimientos microbiológicos en los cuales se estudia la dependencia nutricional de un microorganismo por un determinado nutriente.

Considerando que la enzima PG está asociada al crecimiento, como se demostró de estudios previos, las 4 vitaminas que resultaron esenciales deben estar presentes en el medio de cultivo para lograr un buen desarrollo de la levadura y por lo tanto una buena producción de la enzima de interés.

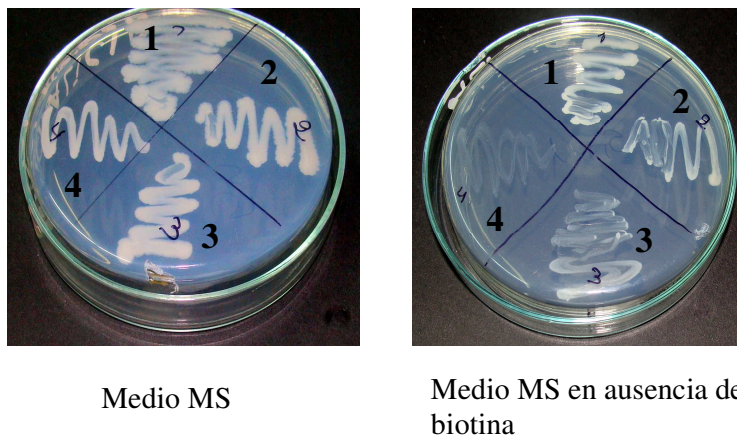


Figura III. 8: Efecto de las vitaminas sobre el crecimiento de *W. anomalous*. Los números corresponden al número del repique sucesivo realizados

III.3.1.3. Influencia de los aminoácidos sobre el crecimiento de *W. anomalous* y la producción de PG

Los resultados de actividad PG y biomasa, obtenidos en los distintos medios MS, a cada uno de los cuales se le omitió la adición de un aminoácido, se presentan en la Figura III.9. Se observa que la omisión de los aminoácidos en el medio de cultivo provocó una disminución en el crecimiento microbiano y por lo tanto en la producción de PG.

La omisión de los aminoácidos en el medio MS produjo una disminución del 77, 83 y 88 % en la producción de PG para triptófano, histidina y metionina, respectivamente.

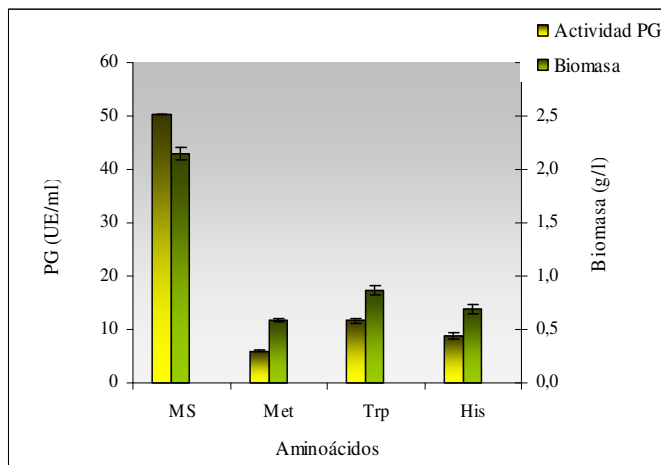


Figura III. 9: Efecto de la omisión de un aminoácido en el medio MS sobre la actividad PG y la producción de biomasa.

III.3.1.4. Producción de PG en el medio MS seleccionado

En base a los resultados que se obtuvieron al analizar el efecto de los diferentes componentes que conforman el medio MS, se formuló un medio de cultivo al que se lo denominó MSO (medio MS optimizado), cuya composición era la correspondiente al medio MS pero conteniendo únicamente las 4 (cuatro) vitaminas que resultaron esenciales para el crecimiento de *W. anomalus* (biotina, pantotenato de calcio, piridoxina y tiamina). Los valores de actividad PG de los sobrenadantes de los cultivos obtenidos a las 8 h en el medio MSO, se presentan en la Figura III.10 y se comparan con los valores obtenidos en los medios MS e YNB.

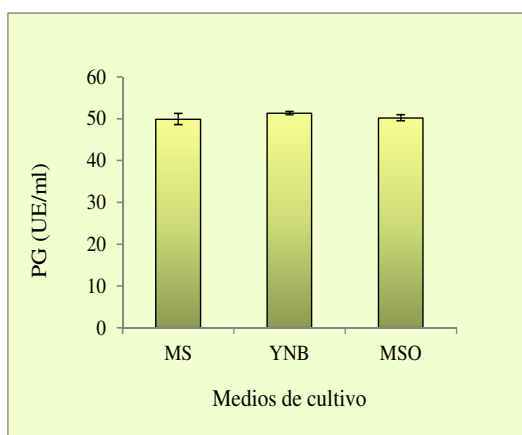


Figura III. 10: Valores de actividad PG obtenidos en los medios MS, YNB y MSO por *W. anomalus*.

Se obtuvieron valores de producción de PG de $49,896 \pm 1,35$ UE/mL, en el medio MSO, a las 8 h de cultivo, valores estos similares al obtenido en el medio MS el cual fue de $50,22 \pm 0,735$ UE/mL y de $51,29 \pm 0,402$ UE/mL en el medio YNB.

Estos resultados muestran que la eliminación de 4 vitaminas del medio MS original manteniendo biotina, pantotenato de calcio, piridoxina y tiamina resulta en una producción enzimática equivalente con la consecuente disminución de costos y mayor simpleza de preparación.

III.3.2. PUESTA A PUNTO DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE PECTINA A PARTIR DE ALBEDO DE LIMÓN

III.3.2.1. Protocolo de extracción N° 1 con albedo húmedo

En la Tabla III.5 se presentan los resultados de los rendimientos de la extracción enzimática de pectina (expresado como MIE), obtenidos, utilizando albedo o albedo + flavado húmedos, como materia prima.

Tabla III.5: Rendimiento de la extracción de enzimática de pectina a partir de albedo y albedo + flavado (húmedos).

Tipo de sustrato	Sustrato húmedo (g)	Buffer (mL)	EE (mL)	MIE (g)	Rendimiento % (p/p)**	Rendimiento Promedio % (p/p)*
				0,3087	25,8716	
Albedo	30	20	20	0,3166	26,5337	26 ± 0,654
				0,301	25,2263	
Albedo y				0,4930	23,5446	
Flavado	30	20	20	0,5102	24,3660	23 ± 0,821
				0,4758	22,7231	

Condiciones de extracción: 40 °C a 150 rpm, 6 h. pH: 3,5 (no se ajustó)

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

Las muestras de albedo y albedo + flavado, contienen 96 y 93 % de humedad, respectivamente.

** g MIE/100 g albedo seco.

EE: extracto enzimático.

El rendimiento de extracción de pectina fue del 26 % y 23 % (p/p) para albedo y albedo + flavado, respectivamente. Como puede observarse el rendimiento utilizando albedo + flavado no superó al rendimiento obtenido a partir de albedo. Esto se debe a que el flavado no contiene pectina, en el mismo se encuentra la mayor parte de los pigmentos y los aceites

esenciales del cítrico. En cambio el albedo está constituido principalmente por celulosa, hemicelulosa y pectina, y también contiene hidratos de carbono solubles. El contenido de pectinas del albedo de cítricos es del 18-35 % (p/p) (Rojas y col., 2008).

II.3.2.2. Protocolo de extracción N° 2 con protopectina

En la Tabla III.6 se presentan los rendimientos de MIE obtenidos al realizar la extracción con albedo seco y tamizado (AT), bajo las mismas condiciones de extracción que las de la experiencia anterior.

Tabla III.6: Rendimiento de extracción de pectina utilizando albedo seco y tamizado

Albedo (g)	Buffer (mL)	EE (mL)	Relación sdo/líqu	Relación (g/mL)	MIE (g)	Rendim.** % (p/p)	Rendim. Prom% (p/p)*
1	20	20	1/40	0,025	0,5113	51,130	49,78 ± 1,91
1	20	20	1/40	0,025	0,4843	48,430	

Condiciones de extracción: 40 °C a 150 rpm, 6 h. pH: 3,5 (no se ajustó)

*Los resultados corresponden al promedio de dos repeticiones ± DS.

** g MIE/100 g albedo seco.

EE: extracto enzimático.

Al utilizar albedo seco como materia prima el rendimiento de extracción de pectina fue del 49,78 % ±1,91 (p/p).

Los resultados del proceso de solubilización de pectina a partir de albedo seco permitieron obtener un mayor rendimiento de pectina extraída que al utilizar albedo húmedo el cual resultó ser del 26 % (p/p), a iguales condiciones de extracción. Esto se podría atribuir a una mejor adsorción de la enzima al sustrato seco lo que favorecería la acción de la enzima (Contreras Esquivel y col, 1997).

III.3.2.3. Protocolo de extracción N° 3 con protopectina

Al disolver el MIE obtenido mediante el protocolo N° 2, en agua, se obtuvo una fracción que no se logró disolver. Esto se atribuyó a la presencia de otros compuestos insolubles en agua, provenientes del albedo despectinizado que hayan atravesado la tela de muselina durante la etapa de filtración, posterior a la etapa de extracción, y que hayan quedado atrapados en el gel de pectina que se formó al agregar el etanol. Como consecuencia de ello se reemplazó la filtración con tela de muselina por una centrifugación (protocolo de extracción N° 3), en la Tabla III.7 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla III.7: Rendimiento de extracción de pectina utilizando albedo seco y tamizado mediante el protocolo N° 3.

Albedo (g)	Buffer (mL)	EE (mL)	Relación sdo/líq.	MIE (g)	Rend. % (p/p)**	Rend. Prom. % (p/p)*
1	20	20	1/40	0,3241	32,41	
1	20	20	1/40	0,3029	30,29	32,17±1,774
1	20	20	1/40	0,3382	33,82	
1	20	20	1/40	0,1696	16,96	

(H₂O)

Condiciones de extracción: 40 °C, 150 rpm, 6 h. pH: 3,5 (no se ajustó)

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

** g MIE/100 g albedo seco.

EE: extracto enzimático.

Al utilizar albedo seco como materia prima y adicionar una etapa de centrifugación luego del proceso extractivo, el rendimiento de extracción de pectina fue del 32 % (p/p), menor al obtenido en la experiencia anterior, bajo las mismas condiciones de reacción. Esto confirma la presencia de otros compuestos insolubles en agua, los que fueron eliminados durante el proceso de centrifugación posterior a la etapa de extracción.

El blanco de la reacción enzimática mostró una solubilización significativa del 17 %. 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 podría considerar que existe un efecto sinérgico entre la catálisis química (Blco) y la enzimática; de manera que la contribución neta de la enzima, asumiendo que la catálisis química y enzimática son procesos aditivos, fue del 15 %.

Zapata Zapata y col. (2009) reportan rendimientos del 27% (g pectina/100 g de tejido, albedo en base seca) utilizando protopectinasa-SE producida por el hongo levaduriforme *Geotrichum klebanii* y del 10 % (p/p) para el blanco.

III.3.3. INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES SOBRE EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PECTINA

III.3.3.1. Efecto del pH

El análisis de este factor (pH) fue necesario debido a que al preparar las muestras el pH de la mezcla de reacción es ácida, con lo cual se trabaja a un pH que está alejado del pH óptimo de actividad de la enzima.

En la Tabla III.8 se presentan los resultados al utilizar pH 3,5 (mezcla de reacción) y al ajustar el pH a 4,5.

En la Tabla III.9, se presenta el análisis de varianza correspondiente, en la Figura III.11 el gráfico de comparación de medias.

Tabla III.8: Influencia del pH en el rendimiento de extracción de pectina

AT (g)	Buffer (mL)	EE (mL)	pH	MIE (g)	Rendim. % (p/p)	Rend. Prom. % (p/p)*
1	20	20	3,5	0,3241	32,41	
1	20	20	3,5	0,3029	30,29	32,17±1,774
1	20	20	3,5	0,3382	33,82	
1	20	20	3,5	0,1696	16,96	
		(H ₂ O)				
1	20	20	4,5	0,3513	35,130	
1	20	20	4,5	0,3802	38,020	36,860± 1,527
1	20	20	4,5	0,3743	37,430	
1	20	20	4,5	0,1517	15,170	
		(H ₂ O)				

Condiciones de extracción: 40 °C en un baño de agua rotatorio -150 rpm - 6 horas.

Relación AT/(B+EE) = 1/40.

Siendo: pH_M = pH de la mezcla resultante (pH_M= 3,5 para Buffer Acético/Acetato)

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

** g MIE/100 g albedo seco.

Tabla III.9: Análisis de varianza para MIE % (p/p) con el pH

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Media. Cuad.	Cociente-F	P-valor
Entre grupos	32,9473	1	32,9473	12,00	0,0257
Intra grupos	10,9779	4	2,74447		
Total (Corr)	43,9251	5			

De la Tabla de análisis de varianza (Tabla III.9) se pudo concluir que el pH influyó significativamente en el proceso de extracción de pectina, siendo el nivel de significación (p) menor a 0,05 para el 95 % del nivel de confianza.

En la Figura III.11 se observa que los mayores rendimientos se obtuvieron a pH 4,5. Este pH coincide con el pH óptimo de actividad de la enzima PG al utilizar AG como sustrato (Martos y col, 2014).

Los blancos arrojaron valores más bajos de solubilización a pH 4,5, el cual resultó ser de 15 %, en relación con el blanco obtenido a pH 3,5 (17 %). Esto indica que la contribución química sería mayor, a menores valores de pH.

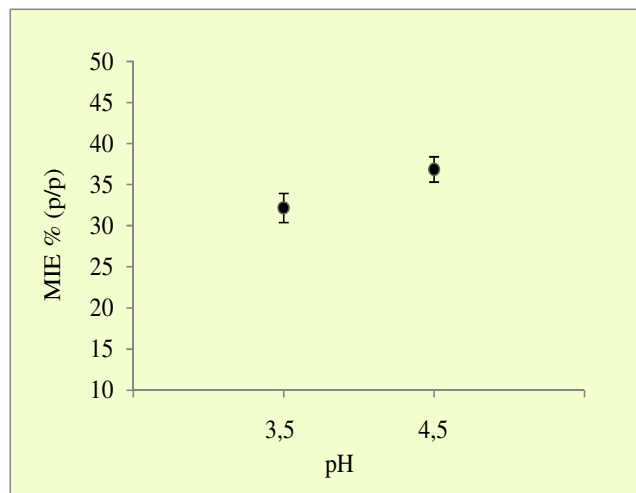


Figura III. 11: Efecto del pH en el rendimiento de extracción de pectina (como MIE)

III.3.3.2. Efecto de la relación sólido/líquido

En la Tabla III.10 se presentan los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la relación sólido-líquido sobre la capacidad de solubilización de pectina por el EE de *W. anomalus*. En la Tabla III.11, se presenta el análisis de varianza correspondiente, en la Tabla III.12 el análisis de rangos múltiples y en la Figura III.12 el gráfico de comparación de medias.

De la Tabla de análisis de varianza (Tabla III.10) se pudo concluir que la relación sólido/líquido influyó significativamente en el proceso de extracción de pectina, siendo el nivel de significación (p) menor a 0,05 para el 95 % del nivel de confianza.

El Test de Rangos Múltiples (Tabla III.11), indicó que la diferencia se observó entre las relaciones 1/20, 1/40 y 1/50, no habiendo diferencia entre las relaciones 1/50 y 1/60.

En la Figura III.12 se observa que los mayores rendimientos se obtuvieron con una relación sólido/líquido de 1/50 o 1/60, con una media de ~ 40,96 % y de 41,74 % (g de MIE/100 g de albedo), respectivamente.

En base a los resultados obtenidos en esta etapa, en las sucesivas experiencias se empleó la relación 1/50 AT/ (Buffer+EE).

Tabla III.10: Extracción de pectina con diferente relación sólido/líquido

AT (g)	Buffer (mL)	EE (mL)	AT/ (Buffer +EE)	MIE (g)	Rendim. * %	Rendim. Prom. **
1	10	10	1/20	0,2378	23,780	
1	10	10	1/20	0,2591	25,910	24,753 ±
1	10	10	1/20	0,2457	24,570	1,076
1	10	10 (H ₂ O)	1/20	0,1244	12,448	
1	20	20	1/40	0,3513	35,130	
1	20	20	1/40	0,3802	38,020	36,860±
1	20	20	1/40	0,3743	37,430	1,5269
1	20	20 (H ₂ O)	1/40	0,1517	15,170	
1	25	25	1/50	0,4042	40,42	
1	25	25	1/50	0,3888	42,88	40,96 ±1,715
1	25	25	1/50	0,3958	39,58	
1	25	25 (H ₂ O)	1/50	0,1618	16,180	
1	30	30	1/60	0,4321	43,210	
1	30	30	1/60	0,399	39,900	41,737±1,685
1	30	30	1/60	0,421	42,100	
1	30	30 (H ₂ O)	1/60	0,1665	16,650	

Condiciones de extracción: 40 °C a 150 rpm, 6 h. pH: 4,5

AT/ (Buffer + EE): Albedo tamizado/Buffer+ Extracto Enzimático

* g MIE/100 g albedo seco

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

Tabla III.11: Análisis de varianza para Rendimiento según Relación AT/ (Buffer+EE)

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Media. Cuad.	Cociente-F	P-valor
Entre grupos	519,082	3	173,027	99,96	0,0000
Intra grupos	13,8474	8	1,73093		
Total (Corr)	532,929	11			

Tabla III.12: Análisis de rangos múltiples

Relación	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1/20	3	24,7533	X
1/40	3	36,86	X
1/50	3	39,6267	X
1/60	3	41,7367	X
Contraste		Diferencias	
1/20-1/40		*-12,1067	
1/20-1/50		*-14,8733	
1/20-1/60		*-16,9833	
1/40-1/50		*2,76667	
1/40-1/60		*-4,87667	
1/50-1/60		-2,11	

* denota diferencia significativa.

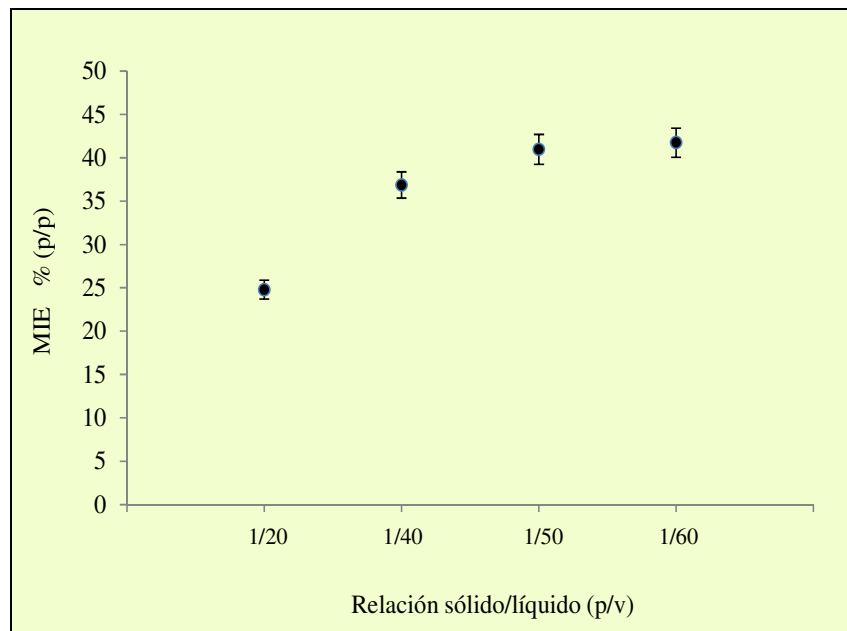


Figura III. 12: Efecto de la relación sólido/líquido en el rendimiento de extracción de pectina (como MIE).

III.3.3.3. Efecto de la temperatura y el tiempo

En esta etapa se adicionó el lavado del gel obtenido con solución hidroalcohólica (etanol al 20%), antes del proceso de secado, a los efectos de eliminar mayor cantidad de impurezas (Voragen y col, 1995; Canteri y col, 2012).

En las Tablas III.13, III.14, III.15 y III.16, se presentan los resultados obtenidos al realizar la extracción de pectina a 30, 35, 40 y 50 °C, respectivamente.

Tabla III.13: Rendimiento de extracción de pectina a 30 °C

Tiempo	MIE (g)	Rendim. (%)*	Rendim. Promedio (%)*
1	0,1471	29,42	29,88± 0,651
1	0,1517	30,34	
2	0,1598	31,96	31,66± 1,273
2	0,1568	31,36	
4	0,17012	34,02	33,60± 0,597
4	0,1659	33,18	
6	0,17068	34,14	35,13± 1,403
6	0,1806	36,12	
8	0,1682	33,64	32,95± 1,683
8	0,1613	32,26	

*g MIE/100 g albedo seco- Relación: 1/50- 30 °C-pH 4,5

Tabla III.14: Rendimiento de extracción de pectina a 35 °C

Tiempo	MIE (g)	Rendim. (%)*	Rendim. Promedio (%)*
1	0,146	29,2	28,18± 0,6788
1	0,1358	27,16	
2	0,161	32,2	31,68± 0,0849
2	0,1558	32,16	
4	0,17135	34,27	34,24± 1,3544
4	0,1695	33,9	
4	0,1693	33,86	
4	0,1747	34,94	
6	0,1793	35,86	36,86± 0,5755
6	0,1871	37,42	
6	0,1827	36,54	
6	0,1881	37,62	
8	0,1878	37,62	36,14± 1,500
8	0,1815	37,56	
8	0,1728	36,3	

*g MIE/100 g albedo seco- Relación: 1/50- 35 °C-pH 4,5.

Tabla III.15: Rendimiento de extracción de pectina a 40 °C

Tiempo	MIE (g)	Rendim. (%)*	Rendim. Promedio (%)*
1	0,1511	30,22	30,32 ± 0,140
1	0,1521	30,42	
2	0,171	34,2	33,81 ± 0,540
2	0,1706	34,12	
2	0,1655	33,1	
4	0,1843	36,89	36,54 ± 0,960
4	0,178	35,6	
4	0,1887	37,74	
4	0,1798	35,96	
6	0,1869	37,38	37,21 ± 0,240
6	0,1852	37,04	
8	0,1823	36,46	35,97 ± 0,693
8	0,1774	35,48	

*g MIE/100 g albedo seco- Relación: 1/50- 40 °C-pH 4,5.

Tabla III.16: Rendimiento de extracción de pectina a 50 °C

Tiempo	MIE (g)	Rendim. (%)*	Rendim. Promedio (%)*
1	0,1039	20,78	21,59 ± 0,550
1	0,112	22,4	
2	0,1382	27,64	27,82 ± 0,2546
2	0,14	28	
4	0,1548	30,96	30,92 ± 0,933
4	0,1544	30,88	
6	0,1537	30,74	31,4 ± 0,0566
6	0,1603	32,06	
8	0,1525	30,5	30,05 ± 0,6364
8	0,148	29,6	

*g MIE/100 g albedo seco- Relación: 1/50- 50 °C-pH 4,5.

Los menores rendimientos obtenidos en esta etapa, respecto a la anterior (ítem III.3.3.2), bajo las mismas condiciones de extracción (pH 4,5, 6 h), se considera que se debieron a la etapa adicional de lavado del gel con etanol, eliminándose impurezas que pudieran haber quedado atrapadas en el mismo.

El análisis de varianza correspondiente (datos no mostrados) indicó que el tiempo influyó significativamente en el proceso de extracción de pectina a todas las temperaturas estudiadas, siendo el nivel de significación (p) menor a 0,05 para el 95 % del nivel de confianza para todas las temperaturas estudiadas.

En la Figura III.13 se presenta la cinética de extracción de pectina a las distintas temperaturas estudiadas. En la Figura III.14, se presenta el rendimiento MIE a 35 y 40°C durante 4 y 6 h de reacción.

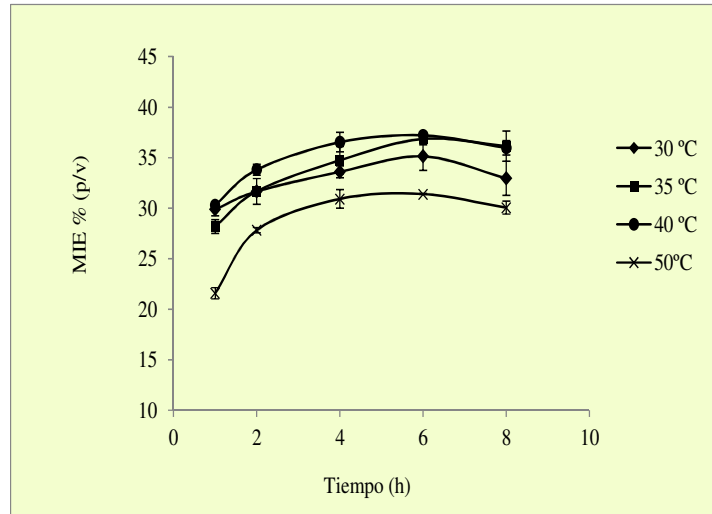


Figura III. 13: Cinética de extracción de pectina a 30, 35, 40 y 50 °C con el extracto enzimático de *W. anomalus*.

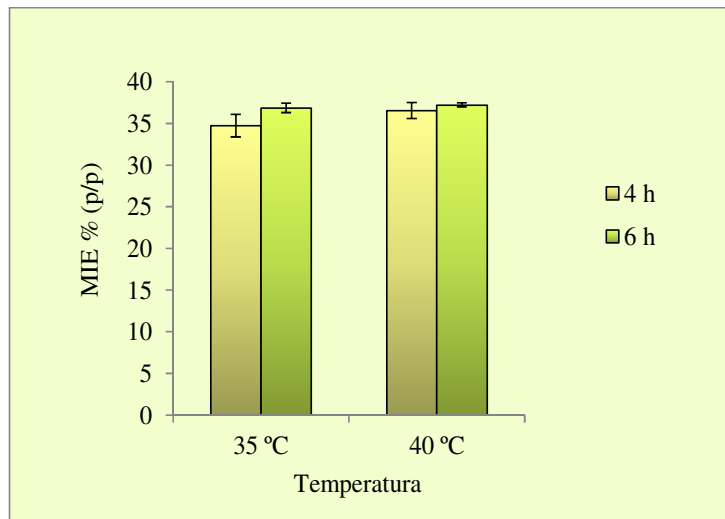


Figura III. 14: Rendimiento MIE a 35 y 40°C durante 4 y 6 h de reacción.

Como se observa en la Figura III.13, el rendimiento de extracción de pectina aumentó con el tiempo de reacción, hasta las 4 h para 40 y 50 °C o hasta las 6 h para 30 y 35 °C. La leve disminución observada a partir de las 6 h fue no significativa, para un nivel de confianza del 95 %.

De estudios previos se demostró que la enzima permanece estable hasta los 50 °C, durante 10 h de incubación (Martos y col., 2014).

Los rendimientos obtenidos a 35 y 40 °C fueron superiores respecto a los obtenidos a 30 y 50 °C a todos los tiempos evaluados (Tablas III.12 a III.15 y Fig. III.13).

Para 35 °C, el rendimiento de extracción de pectina alcanzó un valor máximo de 36,86 ± 0,575 % p/p (g MIE/g albedo) a las 6 h de reacción (Fig. III.14). Para 40 °C, se obtuvo un rendimiento de 36,540 ± 0,960 % p/p (g MIE/100 g albedo) a las 4 h de reacción, no habiendo diferencia significativa entre las 4 y 6 h (Fig. III.14). El análisis de varianza determinó que no hubo diferencia significativa entre los rendimientos de extracción a 35 °C- 6 h y 40 °C- 4 h.

Se obtuvieron blancos de reacción de 9,33 ± 0,337 % p/p (g MIE/100 g albedo) a 30 y 40 °C, mientras que a 50 °C fueron de 17,95 ± 0,39 % p/p (g MIE/100 g albedo). El blanco de la reacción enzimática a 50 °C mostró una solubilización significativa. 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 PG de *A. kawachii* y de 17,6 g de pectina/100 g de material seco con PG de *A. niger* (Contreras Esquivel, 2003). Zapata, Zapata y col. (2009) reportaron rendimientos del 27 % (g MIE/100 g albedo) utilizando protopectinasa-SE producida por el hongo levaduriforme *Geotrichum klebanii* y del 10 % (p/p) para los blancos.

III.3.3.4. Efecto de la concentración de enzima

En la Figura III.15 se presentan los resultados obtenidos al variar el volumen del EE, manteniendo constante la relación sólido/líquido (1/50), a 40 °C y durante 4 h de incubación.

El análisis de varianza correspondiente (datos no mostrados), indicó que la concentración de enzima 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. Se obtuvo un aumento en el rendimiento de MIE desde un valor de 28,133 % ± 0,8145 (p/p) con 3,125 mL de EE (3,118 UE/mL), hasta un valor de 36,54 % ± 0,96 (p/p) con 12,5 mL de EE (12,47 UE/mL).

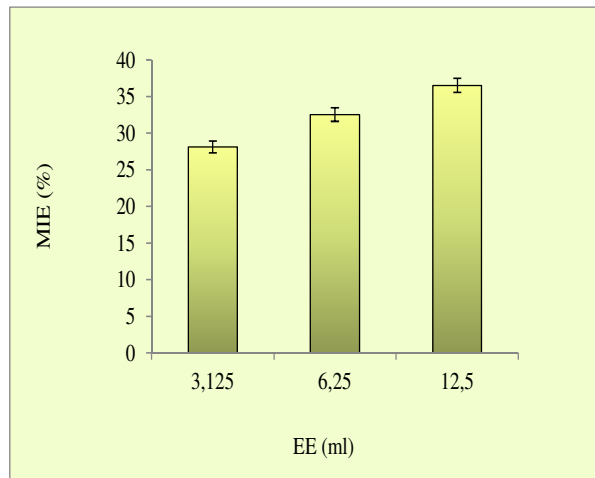


Figura III. 15: Efecto de la concentración de la enzima en el rendimiento de extracción de pectina (como MIE)

III.3.4. COMPARACIÓN DE RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN CON UNA ENZIMA COMERCIAL Y EL MÉTODO QUÍMICO

En la Tabla III.17 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 III.17: Rendimientos de MIE con diferentes métodos de extracción.

Método de extracción	Especificaciones	Rendimiento % *	Rendimiento % promedio
Enzimático*	PG <i>W. anomalus</i>	36,89	36,54 ± 0,96
		35,6	
		37,74	
		35,96	
Enzimático*	Novozym 33095	7,72	7,52 ± 0,3464
		7,12	
		7,72	
		23,31	
Químico	-	25,26	24,17 ± 0,99
		23,96	

* Condiciones de extracción: 40 °C, 4 h, pH: 5,0, 180 rpm.

El rendimiento de extracción por el método químico fue de $24 \pm 0,99$ % (g MIE/100 g de albedo seco), utilizando la enzima comercial de $7,52 \pm 0,3464$ % (p/p) y con el EE de *W. anomalus* de $36,54 \pm 0,96$ % (p/p) (Tabla III.17). Lo anterior indica un aumento del 12,5 % en la extracción de pectina con el EE de *W. anomalus* respecto al método químico.

Sakamoto y col. (1994) informaron rendimientos del 10 a 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).

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 descritos por otros autores, lo cual confirma la bondad del proceso enzimático utilizado.

III.3.5. CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINA

III. 3.5.1. 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 III.17.

En la Tabla III.18 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 4h, mientras que por el método químico la concentración fue de 336 mg/L de AGA.

Tabla III.18: Concentración de AG en el MIE, obtenido por los métodos enzimático y químico.

Método	AG (mg/L)	AG (mg/L)*	Porcentaje % (g _{AG} /100 g _{MIE})
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, 4h, agitación: 180 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_{AGA}/100 g_{MIE}), indicando que la pectina extraída es lo suficientemente pura y que no contiene cantidades considerables de impurezas por presencia de proteínas, almidón y azúcares.

III. 3.5.2. Determinación del grado de esterificación

Los valores de grado de esterificación del MIE extraído del albedo por método enzimático, se muestran en la Tabla III.19.

El grado de esterificación de la pectina obtenida empleando los extractos de *W. anomalus* fue de 79,10 % ± 0,0082, el valor indica que se trata de pectina de alto metoxilo (HM).

Tabla III.19: Grado de esterificación del MIE obtenido por métodos enzimático

Ensayo	V ₁ (mL)	V ₂ (mL)	GE	GE promedio
Ensayo 1	0,08	0,29	78,37 %	79,10 % ± 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. Condiciones de extracción: 40 °C, pH 5,0, 4h, 180 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.

III. 3.5.3. 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. III.16.

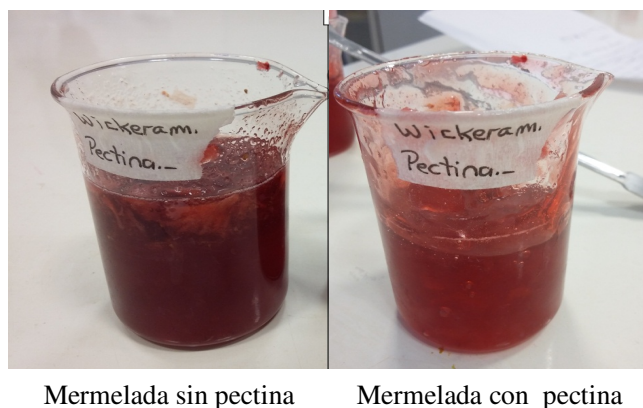


Figura III. 16: Gelificación de pectina obtenida con el EE de *W. anomalus*

III.3.6. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEFINITIVO

El esquema general definitivo del proceso de extracción de pectina a partir de albedo de limón y utilizando el extracto enzimático de *W. anomalus* se detalla en la Figura III.17

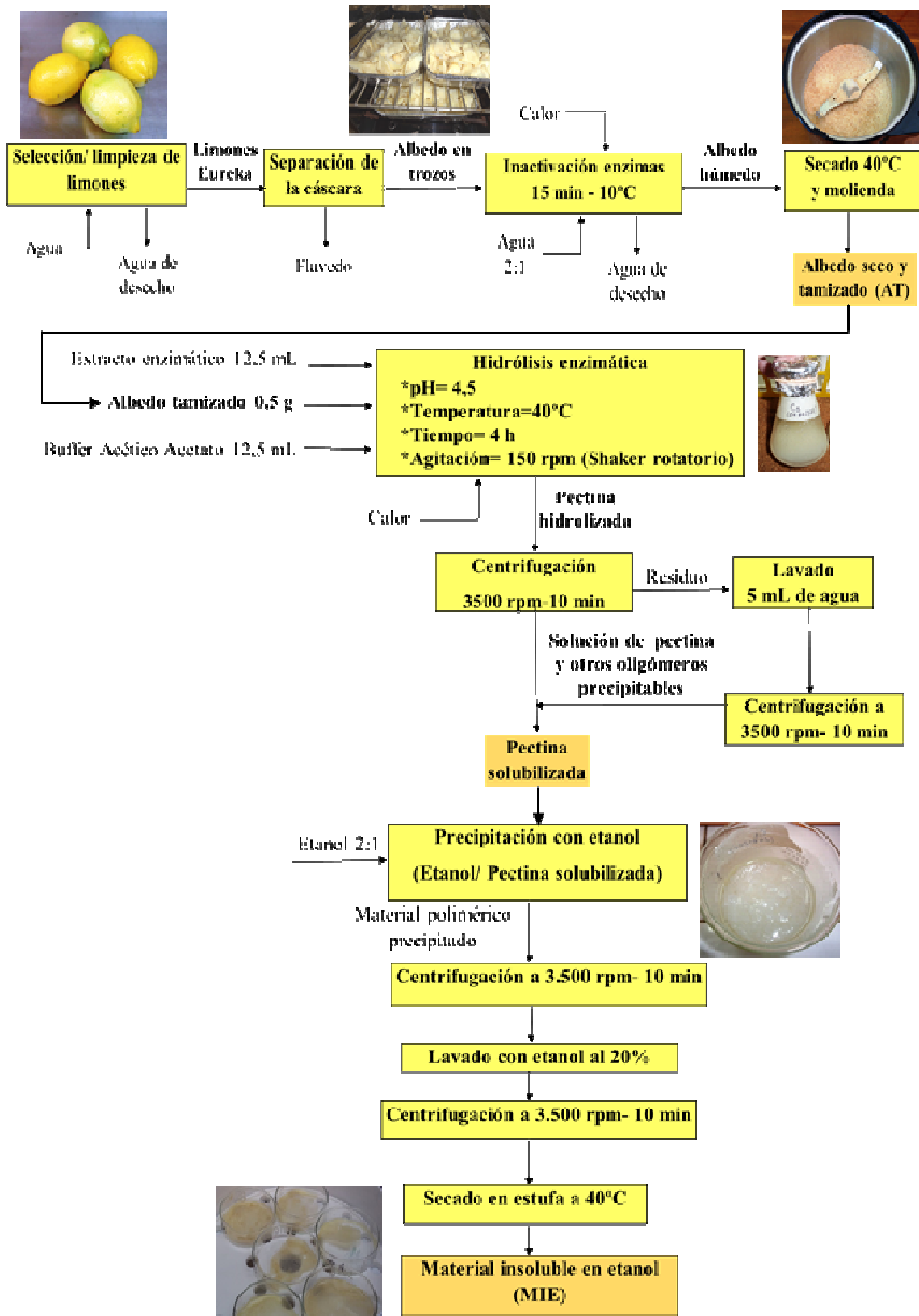


Figura III. 17: Esquema del proceso completo de extracción enzimática de pectina

III.4. CONCLUSIONES

- El crecimiento de *W. anomalous* fue despreciable en ausencia de biotina, pantotenato de calcio, piridoxina o tiamina.
- La omisión de los aminoácidos (triptófano, histidina y metionina) en el medio MS produjo una disminución en la producción de PG.
- Se obtuvieron valores de producción de PG de $49,896 \pm 1,35$ UE/mL, en el medio de cultivo sintético que contenía glucosa, pectina, sales, aminoácidos y 4 (cuatro) vitaminas que resultaron esenciales para el crecimiento de la levadura.
- El extracto enzimático, con actividad PG, fue capaz de extraer pectina a partir de albedo de limón, indicando la capacidad PPasa de la enzima.
- El pH, la relación sólido/líquido, y la concentración del extracto enzimático, influyeron significativamente en los niveles de solubilización de pectina.
- Los mayores rendimientos se obtuvieron a pH 4,5 y con una relación sólido/líquido de 1/50 y utilizando 12,5 mL del extracto enzimático.
- Los rendimientos obtenidos a 35 y 40 °C fueron superiores respecto a los obtenidos a 30 y 50 °C.
- Para 35 °C el rendimiento de extracción de pectina alcanzó un valor máximo de $36,86 \pm 0,575$ % p/p (g MIE/100 g albedo) a las 6 h de reacción.
- Para 40 °C se obtuvo un rendimiento de $36,540 \pm 0,960$ p/p (g MIE/100 g albedo) a las 4 h de reacción.
- 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.
- 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 % ($g_{AG}/100 g_{MIE}$), indicando que la misma es lo suficientemente pura.
- La pectina extraída presentó buena capacidad gelificante.
- El extracto enzimático de *W. anomalous*, resultó de potencial importancia para su utilización en la extracción de pectina a partir de albedo de limón, un residuo de las industrias cítricas.

A modo de corolario final de este trabajo de tesis se puede decir que:

Mediante las experiencias realizadas en este trabajo se logró poner a punto un protocolo de extracción enzimática de pectina y se identificaron los factores que inciden en el rendimiento del proceso extractivo. De esta manera este trabajo sienta las bases para el futuro desarrollo de un proceso tecnológico innovador, respecto al proceso de extracción de pectina tradicional, luego de estudios posteriores de optimización, escalamiento y estimación de los costos del proceso completo que pruebe la factibilidad económica del mismo.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aguilar, G. and Huitrón, C. (1990). Constitutive exopectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon sources. *Biotechnology Letters*, 12:655-660.

Andersson, R; Westerlund, E.; Aman, P. (2006). Cell Wall Polysaccharides: Structural, Chemical, and Analytical Aspects. *Carbohydrates in food* (pág. 139). CRC Press.

Axelos, M.A.V. y Thibault, J.F. (1991). The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. In *The chemistry and technology of pectin*. Ed. R.H. Walter. New York: Academic Press.

Aza, M. y Méndez, M. (2011). Tesis de grado: Extracción de pectina de nopal (*Opuntia ficus indica*) por medio de ácido aplicando dos niveles de temperatura, tiempo y estados de madurez. Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Facultad de ingeniería en ciencias agropecuarias y ambientales. Universidad Técnica del Norte.

Baciu J.; Jördening H. (2005) Kinetics of galacturonic acid release from sugar- beet pulp. *Enzyme and Microbial Technology*; 34: 505-512

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

Barreto, G. E.; Púa, A. L.; De Alba D.D.; Pión, M. M. (2017). Extracción y caracterización de pectina de mango de azúcar (*Mangifera indica* L.). *Temas Agrarios Vol. 22*:(1) (77 - 84)

Berardini, N; Knödler, M; Schieber, A and Cale, R. (2005). Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 6: 442-452.

Betancourt, P. (2007). Industrialización de frutas y hortalizas: dulces, mermeladas y jaleas. *Tecnología de alimentos*. LATU, 2007. Disponible en: <http://www.biblioteca.fagro.edu.uy>.

Blanco, P.; Sieiro, C. y Villa, T.G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts- mini review. FEMS Microbiology Letters, 175:1-9.

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.

Canteri, M. H. G.; Scheer, A. P.; Ginies C.; Renard C. M. G. C.y Wosiacki G. (2010). A Comparative Study of pectin Extracted from Passion Fruit Flours. Journal of Polymers and the Environment, 18: 593-599.

Canteri-Schemin, M.H.; Fertonani, H.C.R.; Waszczynskyj, N.; Wosiacki, G. (2005). Extraction of pectin from apple pomace. Brazilian Archives of Biology and Technology, 48: 259-266.

Canteri, M. H. G.; Moreno, L.; Wosiacki G.; Scheer, A. (2012). Pectina: da- Matéria ao Produto Final. Polímeros, vol 22, n. 2: 149-157.

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 klebahnii* y expresión de Protopectinasa-SE. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

Commitee for the Revision of the Nomenclature of Pectic Substances. (1944). Chemical and Engineering News, 22:105-106.

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.; Aguilar, C.N.; Reyes-Vega, M.L. Romero, J. (1997). Revisión: extracción microbiológica y enzimática de pectina. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 47:208-216.

Contreras-Esquivel, J.C.; Hours, R.A.; Voget, C.E.; Mignone, C.F. (1999). *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88: 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.

D'Addosio, R. D.; Páez, G.; Marín, M.; Mármol, Z. y Ferrer, J. (2005). Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 22: 241 -251.

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. y Aguilar, G. (1992). Pectin lyase from *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39:515-519.

Devia, J. E. *Revista Universidad EAFIT*. Recuperado en Mayo de 2009, de <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/215/21512902.pdf>.

Donaghy, J.A.; McKay, A.M. (1994). Pectin extraction from citrus peel by polygalacturonase produced on whey. *Bioresource Technology*, 47: 25-28.

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.

Emaga, HT; Romkart, S N; Wathelet, B; Paquot, M. (2008). Characterisation of pectins extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design. *Food Chemistry*, 118 (2): 467-471

Favela-Torres, E.; Volke-Sepulveda, T. and Viniestra-González, G. (2006). Production of Hydrolytic Depolymerising Pectinases – a review. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2): 221-227.

Federación Argentina del Citrus- Fedecitrus- (2018). La actividad cítrica argentina. Disponible en línea en <http://www.fedecitrus.org>

Fellows, P (2007). *Tecnología del procesamiento de alimentos: principios y práctica*. 2da ed. Acribia.

Fennema, O. (1993). *Química de los alimentos*. Acribia, Zaragoza, España, p 1258.

Fertonani, H. C. R. Estabelecimento de um modelo de extração ácida de pectina de bagaço de maçã. (2006). 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Fishman, M. L.; Chau, H. K.; Hoagland, P.; Ayyad, K. (2000). Characterization of pectin, ash extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure. *Carbohydrate Research*, 323 (1-4):126–138.

Food Chemicals Codex. FCC. (1996). Revised Monograph- Pectins. Estados Unidos. Disponible en: books.nap.edu/html/fcc/pectins.pdf.

Forchiassin, F.; Diorio, L.A.; Levin, L.; Magnelli, P. y Mercuri, O.A. (2004). *Micología Experimental. Manual de Procedimientos*. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental. FCEN. UBA. 7º edición.

Francis, B J and Bel, K J. (1975). Commercial Pectin: A Review. *Trop. Science*, 17: 25-43.

García-Garibay, M.; Gomez-Ruiz, L. and Bárzana, E. (1987). Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology Letters*, 9:411-416.

GENU Pectin Book. (2005-10). Disponible en línea en <http://www.cfs.purdue.edu/fn/fn453/GENUPectinBook2005-10.pdf>

Gilabert, J. (1998). "Degradación Enzimática y Características Físicas y Químicas de la Pectina de Bagazo de Melocotón." Tesis Doctoral. Universitat de Lleida.

Guidi, A; Quiroga, M. (2010). Obtención de pectina a partir de la cáscara de maracuyá mediante hidrólisis. *JBC*, 7 (21): 67-71

Happi Emaga, T. H.; Ronkart, S. N.; Robert, C.; Wathelet, B.; Paquot, M. (2008). Characterisation of pectins extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design. *Food Chem.*, 108: 463-471.

Hart, L. y Fisher, H. (1991). *Análisis moderno de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza. España.

Herbstreith & Fox. Regulations for Purity Requirements of Pectins. (2009) [Online]. (http://www.herbstreithfox.de/fileadmin/tmpl/pdf/qualitaet/HF_Rechtsvorschriften_Reinheit_sanforderungen_en.pdf).

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.

Hoejgaard, S. (2005). Pectin chemistry, functionality and applications. Disponible en línea en <http://www.cisg.law.pace.edu/cisg/biblio/ferrari4.html.pectin.cc>

Hoondal, G.S.; Tiwari, R.P.; Tiwari, R.; Dahiya, N. and Beg, Q.K. (2002). Microbial alkaline pectinases and their applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:409–18.

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.

Hwang, J.-K. (2001). Production of functional carbohydrates by the extrusion reactor. *Food Science and Biotechnology*, 10:455-459.

Iglesias, M.T. and Lozano, J.E. (2004). Extraction and characterization of sunflower pectin. *Journal of Food Engineering*, 62:215-223.

International Pectin Producers Association. "What is pectin?" (2001). Disponible en: http://www.ippa.info/what_is_pectin.htm.

Ishii, S. (1976). Enzymatic maceration of plant tissues by endo-pectin lyase and endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. *Phytopathology*, 66:281-289.

Jane, J (2007). "Carbohydrates: Basic Concepts". *Food Chemistry: Principles and Applications*, 2nd ed. Science Technology System.

Jayani, R.S.; Saxena, S.; Gupta R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes - a review. *Process Biochemistry*, 40:2931-2944.

Jo, C.; Kang, H.; Young Lee, N.; Ho Kwon, J. and Woo Byuna, M. (2005). Pectin- and gelatin-based film: effect of gamma irradiation on the mechanical properties and biodegradation. *Radiation Physics and Chemistry*, 72 (6):745–750.

Joslyn, M. A. and Deuel, H. (1963). The extraction of pectins from apple marc preparations. *Journal of Food Science*, 28: 65-83.

Kalapathy, U.; Proctor, A. (2001). Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. *Food Chemistry*, 73 (4):393-396.

Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S. and Tewari, R. (2000). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77:215-227.

Kertesz, Z. I. (1951). "The pectic substances". Editorial Interscience.

Kim DH; Kim, DG; Lee DY; Kim KE; Kim CW. (2000) Physicochemical characterization of pectin extracted from cheju mandarin (*Citrus unshiu*) peels with citric acid. Food Science and Food Biotechnology, 9: 95-98.

Koubala, B. B.; Mbome, L. I.; Kansci, G.; Tchouanguep, M. F.; Crepeau, M. J.; Thibault, J. F.; Ralet, M. C. (2008). Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. Food Chemistry, 106: 1202-1207.

Kratchanova, M.; Pavlova, E.; Panchev (2004). The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. Carbohydrates Polymers, 56: 181-185.

Lee, W.C.; Yusof, S.; Hamid, N.S.A. and Baharin, B.S. (2006). Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). Journal of Food Engineering, 73: 55-63.

Levigne, S.; Ralet, M, C; Thibault, J.F. (2002). Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. Carbohydrates Polymers, 49: 145-153.

Liu, Y.; Shi, J; Langrish, T.A.G. (2006). Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. Chemical Engineering Journal, 120:203-209.

Mamani, P., Ruíz, R. y Veiga, M. (2012). Pectina: Usos Farmacéuticos y Aplicaciones Terapéuticas. Anales de la Real Academia de Farmacia, Madrid, España 78(1): 82-97.

Manabe, M.; Naohara, J.; Sato, T.; Okada, J (1988). The extraction of pectin by microwave heating. Journal of the Japanense Society for Food Science and Technology, 35: 497-501.

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 tissues. *Food Science and Technology*, 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 Research International*, 1: 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*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57(4): 587-594.

Masmoudi, M; Besbes, S. ; Chaabouni, M. ; Robert, C. ; Paquot, M. ; Blecker, C. ; Attia, H. (2008) Optimization of pectin extraction from lemon by- product with acidified date juice using respose surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 74: 185-192

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.

May, C. D. (1990). Industrial pectins: sources, production and applications. *Carbohydrate Polimers*, 12 (15): 79-99.

Melton, L.D. and Smith, B.G. (2001). Determination of the uronic acid content of plant cells walls using a colorimetric assay. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: E3.3.1-E3.3.4

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426–428.

Mollea, C.; Chiampo F.; Conti R. (2008). Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. *Food Chemistry*, 107 (3):1353–1356.

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.

Nagai, M.; Ozawa, A.; Katsuragi, T.; Sakai, T. (2000). Purification and characterization of acid-stable protopectinase produced by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64:1337-1344.

Nighojkar, S.; Phanse, Y.; Sinha, D.; Nighojkar, A. y Kumar, A. (2006). Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. *Process Biochemistry*, 41:1136-1140.

Naidu, G.S.N. y Panda, T. (1998). Production of pectolytic enzymes, a review. *Biochemical Engineering Journal*, 19: 355-361.

Nakamura, T.; Hours, R.A. y Sakai, T. (1995). Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science*, 60: 468-472.

Navarro García, G. y Navarro García, S. (1985). Sustancias Pécicas: Química y aplicaciones, 1: 65-68.

Normah O. and Ku Hasnah K. A. (2000). Pectin content of selected local fruit by-products (Kandungan pektin dalam hasil sampingan buah-buahan tempatan terpilih) *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 28(2) 195–201.

Obergoso, A.G. (2002). Tesis de Magíster en Biotecnología: Producción de enzimas pectinasas por *Actinomyces* en cultivo sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Ortega, N.; de Diego, S.; Perez-Mateos, M. y Busto, M.D. (2004). Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 88:209-217.

Pagán, J.; Ibarz, A.; Ilorca, M.; Pagán, A.; Barbosa -Cánovas, G. V. Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. (2001). *Food Research International*, 34 (7): 605-612.

Paredes, J; Hernández, R; Cañizares, A. (2015). Efecto del grado de madurez sobre las propiedades fisicoquímicas de pectinas extraídas de cascos de guayaba (*Psidium guajava L.*). *IDESIA*, 33 (3): 35-41.

Pardo, L; Menéndez, J.; Giraudo, M. (2011). Pectinas: aplicación en la industria alimentaria. *La Alimentación Latinoamericana*, 295: 60-65.

Pedrolli, D.B.; Monteiro, AC; Gomes, E. y Carmona, E.C. (2009). Pectin and pectinases production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, 3: 9-18.

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.

Phillips, G. O. (2000). Colloids: A partnership with nature. In K. Nishinari (Ed.), *Hydrocolloids. Part 2. Fundamentals and applications in food, biology and medicine* (pp. 3–15). Amsterdam: Elsevier.

Ptichkina, N.M; Markina, O.A, Rumyantseva, G.N. (2008) Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes. *Food Hydrocolloids*, 22: 192–195.

Ralet, M. C. and Thibault, J. F. (1994). Extraction and characterization of very highly methylated pectins from lemon cell walls. *Carbohydrate Research*, 260 (2): 283–296.

Ranveer, S.J.; Shivalika, S. and Reena, G. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40:2931–2944.

Rezzoug, S. A.; Maache-Rezzoug, Z.; Sannie, F.; Allaf, K. (2008). A thermomechanical preprocessing for pectin extraction from orange peel. Optimization by response surface methodology. *International Journal of Food Engineering*, 4 (1):1-18.

Ríos Alzate, L.R. y Arias Vargas F.J. (2002) Tesis de grado: Inmovilización de pectinasas y/o celulasas y determinación de algunos efectos sobre el jugo de guayaba. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. UNAL.

Rodriguez Jasso, R.M. (2003). Tesis de Grado: Desarrollo de una metodología alternativa para la extracción de pectina de cáscara de limón mexicano mediante un tratamiento termoquímico. Facultad de Ciencias Químicas. UAC.

Rojas, J.; Perea, A.; Stashenko, E. (2008). Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(1): 110-115.

Rombouts, F. M. y Pilnik, W. (1980). *Microbial Enzymes and Bioconversions*. Ed. A.H. Rose. Academic Press. London.

Royo-Iranzo, J.; Miralles, M.C.; Claramunt, P. (1975). Preparación de corteza de naranja para la obtención de pectina a partir de dos variedades cultivadas en España. Rendimiento y calidad del producto. *Agroquímica Tecnología de Alimentos*, 15: 539-546.

Sadava, D.E.; Hilis, D. M.; Heller, C.H.; Berenbaum, M. (2011). *Life: The Science of Biology*, 9 th edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers.

Sakai, T. y Okushima, M. (1978). Protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42: 2427-2429.

Sakai, T. y Okushima, M. (1980). Microbial production of pectin from citrus peel. *Applied and Environmental Microbiology*. 39: 908-912.

Sakai, T; Sakamoto, T; Hallaert y Vandamme, E.J. (1993). Pectin, Pectinase and Protopectinase: Production, Properties and Applications. *Advances in applied microbiology*, 39: 213-291.

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.

Sanchez Aldana-Villarruel, D.; Aguilar Gonzalez, C. N.; Contreras Esquivel, J. C.; Nevárez Moorillon; V. (2011). Moléculas pécticas: extracción y su potencial aplicación como empaque. *Tecnociencia Chihuahua*, vol V, N°2.

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

Seggiani, M.; Puccini, M.; Pierini, M.; Giovando, S.; Forneris, C. (2008). Effect of different extraction and precipitation methods on yield and quality of pectin. *International Journal of Food Science and Technology*, N° 1849: 1-7.

Sin, H.N.; Yusof, S.; Hamid, N.S.A. and Rahman, R.A. (2006). Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 73:313-319.

Sinclair W.B. and Crandall, P.R. (2008). Carbohydrate fractions of lemon peel. *Plant Physiology* 601: 681-705.

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.

Soares Junior, M. S.; Reis, R. C.; Bassinello, P. Z.; Lacerda, D. B. C.; Koakuzu, S. N.; Caliari, M. (2009). Qualidade de biscoitos formulados com diferentes teores de farinha de casca de pequi. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 39, n. 2, p. 98-104.

Souza, J.V.B.; Silva, E.S.; Maia, M.L.S. and Teixeira, M.F. (2003). Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavissporus* 2A.UMIDA.1. *Process Biochemistry*, 39: 455-458.

Stechina, D.E. (2005). Tesis de Maestría: Estudios de obtención de pectina aplicando procesos de membrana. Facultad de Ingeniería Química. UNL.

Tari, C.; Göğus, N. and 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.

Thakur, B.R.; Singh, R. K.; Handa, A. K. (1997). Chemistry and uses of pectin: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37: 47-73.

Thomas, M.; Gullemin, F.; Guillon, F.; Thibault, J.F. (2003). Pectins in the fruits of Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Carbohydrate polymers*, 53: 361–372.

Turakhozhaev, M.T. and Khodzhaev, M.A. (1993). Plant pectin substances. Methods of isolating pectin substances. *Chemistry of Natural Compounds*, 31:457-459.

Ueno, H.; Tanak, M.; Hosino, M.; Sasaki, M.; Goto, M. (2008). Extraction of valuable compounds from the avelo of Citrus junos using subcritical water. *Separation and Purification Technology*, 62 (3):513–516.

Van Rensburg, P. and Pretorius, I.S. (2000). Enzymes in winemaking: harnessing natural catalyst for efficient biotransformations-a review. *South African Journal Enology & Viticulture*, 21:52-73.

Vásquez R; Ryesga, L; D`Addosio, R; Paez, G; Marin, M (2008) Extracción de pectina a partir de La cascara de plátano (*Musa AAB*, subgrupo plátano) clon Hartón. Revista Facultad de Agronomía, 25: 318-333.

Voragen, F. (2003). Advances in Pectin and Pectinase Research. Editorial Springer.

Voragen, A. G. J.; Pilnik, W.; Thibault, J.F.; Axelos, M. A. V.; Renart, C. M. G. C. (1995). Pectins. A. M. Stephen (Ed.), Food polysaccharides and their applications, 287–369.

Voragen, A. G. J.; Coenen, G.; Verhoef; R. P.; Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. Structural Chemistry, 20: 263– 275.

Wang, S.; Chen, F.; Wu, J.; Wang, Z.; Liao, X.; Hu, X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. Journal of Food Engineering, 78 (2): 693–700.

Wang, X.; Chen, Q.; Lü, X (2014). Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical Water. Food Hydrocolloids, 38: 129-137.

Willats, W.G.T; Knox, J P.; Mikkelsen, J.D: (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. Trends in food Science and Technology, 17: 97:104.

Woo, K.K.; Chong, Y.Y.; Li Hiong, S.K.; Tang, P.Y. (2010). Pectin extraction and characterizacion from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*): A preliminary study. Journal of Biological Sciences, 10 (7): 631-636.

Yapo, B. M.; Koffi, K.L. (2013). Extraction and characterization of gelling and emulsifying pectin fractions from cacao pod husk. Journal of Food and Nutrition Research, 1 (4): 46-51.

Yeoh, S.; Shi, J.; Langrish, T. A. G. (2008). Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. Desalination, 218 (1-3): 229–237.

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. UNLP.

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.

Zegada Franco, V. Y. (2015). Extracción de pectina de residuos de cáscara de naranja por hidrólisis ácida asistida por microondas (HMO). *Centro de Investigaciones de Procesos Industriales (CIPI). UPB. Investigación y Desarrollo*, 1 (15): 65 – 76.