



Departamento de Ciencia y Tecnología  
Licenciatura en Biotecnología

# Seminario de Investigación

**Maceración enzimática de tejidos vegetales.**

**Acción de protopectinasa de *Geotrichum klebahnii* sobre  
cáscara de pomelo.**

**Romina Belén Sainz**

Dirección:

Dr. Sebastián Fernando Cavalitto

Bernal, Argentina

Mayo 2008

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Sebastián F. Cavalitto en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI -CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

### Agradecimientos

- A Tato mi director, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el Cindefi junto a él y su grupo de trabajo. Por haberme guiado y aconsejado a lo largo de un año y medio; y por aguantar la lista interminable de preguntas que siempre le hice.
- A Arley que formo parte importante de mi formación en el laboratorio ya que fue el que me enseñó cada una de las técnicas de trabajo y me fue orientando en cada uno de los ensayos realizados
- A todos mis compañeros del laboratorio 1 que compartieron muchos de sus días de trabajo conmigo: Euge, Clau, Maty, Fede, Dolo, Su y Gi.
- A Lore por los consejos y el apoyo que me brindó durante mi seminario.
- A Nico por apoyarme y contenerme durante todo este tiempo que llevamos juntos.
- A mi familia, eternamente agradecida por el esfuerzo que realizaron y realizan día a día; y por el apoyo y la contención que me brindan a cada momento.

# Índice.

<b>Capítulo I</b> -----	<b>1</b>
<b>Introducción general</b> -----	<b>1</b>
<b>1. Sustancias pécticas, organismos productores de enzimas pectinolíticas y maceración de tejidos vegetales.</b> -----	<b>1</b>
<b>1.1. Sustancias pécticas.</b> -----	<b>1</b>
1.1.1. Definición y principal función.-----	1
1.1.2. Nomenclatura y composición química.-----	2
1.1.3. Propiedades generales.-----	4
<b>1.2. Enzimas péctinolíticas.</b> -----	<b>5</b>
<b>1.3. Aplicación industrial de las enzimas pectinolíticas.</b> -----	<b>8</b>
<b>1.4. Microorganismos pectinolíticos.</b> -----	<b>9</b>
1.4.1. <i>Geotrichum klebahnii</i> .-----	11
<b>1.5. Maceración de tejidos vegetales.</b> -----	<b>14</b>
1.5.1. Cítricos.-----	15
1.5.2. Pomelo.-----	16
1.5.3. Flavonoides.-----	17
<b>1.6. Objetivos.</b> -----	<b>19</b>
<b>1.7. Bibliografía.</b> -----	<b>20</b>
<b>Capítulo II</b> -----	<b>23</b>
<b>Estudio del efecto de distintas variables de cultivo sobre la expresión de la PPasa-SE de <i>Geotrichum klebahnii</i>.</b> -----	<b>23</b>
<b>2.1. Introducción.</b> -----	<b>23</b>
<b>2.2. Materiales y métodos.</b> -----	<b>24</b>
2.2.1. Reactivos químicos.-----	24
2.2.2. Cepa.-----	24
2.2.3. Mantenimiento de la cepa.-----	24
2.2.4. Composición de los medios de cultivo.-----	24
2.2.5. Determinación de fuente de carbono.-----	26
2.2.6. Determinación de la actividad enzimática.-----	26
2.2.7. Cultivos en frascos erlenmeyer agitados.-----	27
2.2.8. Cultivos en biorreactor.-----	28
2.2.9. Determinación del KLa.-----	29
<b>2.3. Resultados y discusión.</b> -----	<b>29</b>
2.3.1. Determinación de la concentración de inóculo.-----	29
2.3.2. Determinación de la velocidad de agitación.-----	31
<b>2.4. Bibliografía.</b> -----	<b>34</b>
<b>Capítulo III</b> -----	<b>37</b>
<b>Estudio de la maceración enzimática de albedo de pomelo.</b> -----	<b>37</b>
<b>3.1. Introducción.</b> -----	<b>37</b>
<b>3.2. Materiales y métodos.</b> -----	<b>38</b>
3.2.1. Reactivos químicos.-----	38
3.2.2. Obtención del sustrato.-----	38

3.2.3. Fuente de enzima. -----	39
3.2.4. Procedimiento de maceración. -----	39
3.2.5. Análisis estadístico. -----	40
<b>3.3. Resultados y discusión. -----</b>	<b>45</b>
3.3.1. Efecto del tiempo en el proceso de maceración. -----	45
3.3.2. Análisis del proceso de maceración por medio de superficies de respuesta. -----	47
3.3.3. Estudio del efecto de la FI y el pH sobre el proceso de maceración. -----	54
3.3.4. Comparación del uso de la enzima purificada o el extracto crudo para el proceso de maceración. -----	59
<b>3.4. Bibliografía. -----</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo IV -----</b>	<b>62</b>
<i>Estudio de la liberación de azúcares, flavonoides y pectina durante la maceración de albedo de pomelo.-----</i>	<i>62</i>
<b>4.1. Introducción. -----</b>	<b>62</b>
<b>4.2. Materiales y métodos -----</b>	<b>64</b>
4.2.1. Reactivos químicos. -----	64
4.2.2. Determinación de pectina. -----	64
4.2.3. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).-----	65
4.2.3.1. Determinación cuantitativa de azúcares. -----	65
4.2.3.2. Determinación cuantitativa de naringina.-----	66
<b>4.3. Resultados y discusión. -----</b>	<b>66</b>
4.3.1. Determinación de pectina. -----	66
4.3.2. Cuantificación de azúcares.-----	67
4.3.3. Cuantificación de naringina. -----	68
<b>4.4. Bibliografía. -----</b>	<b>72</b>
<b>Capítulo V -----</b>	<b>75</b>
<b>5.1. Conclusiones. -----</b>	<b>75</b>

## Introducción general

### *1. Sustancias pécticas, organismos productores de enzimas pectinolíticas y maceración de tejidos vegetales.*

#### *1.1. Sustancias pécticas.*

##### **1.1.1. Definición y principal función.**

Las sustancias pécticas son complejos de macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular, cargadas negativamente, ácidas, que están ampliamente distribuidas en el reino vegetal [1] [2] [3] [4]. La pared celular de las células vegetales puede ser dividida en tres capas: laminilla media, pared celular primaria y pared celular secundaria [5]. Las sustancias pécticas constituyen los componentes mayoritarios de la laminilla media y en la pared celular primaria de las plantas superiores en la forma de pectato de calcio y pectato de magnesio, en donde actúan como agente lubricante o cementante intercelular [2] [6], mientras que en la pared celular secundaria las sustancias pécticas están prácticamente ausentes [5].

La pared celular se compone no sólo de las sustancias pécticas sino que también contiene celulosa, xiloglucanos, xilanos, arabinoxilanos, arabinanos, arabinogalactanos, galactanos, glucanos, (galacto)-glucomananos, glicoproteínas y lignina [5]. Las sustancias pécticas constituyen desde 0.5% a un 4% del peso húmedo del material vegetal [1].

A diferencia de las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, las sustancias pécticas, como todos los polisacáridos, no tienen un peso molecular definido ya que su composición varía dependiendo de la fuente de la cual se obtiene [1].

## Capítulo I

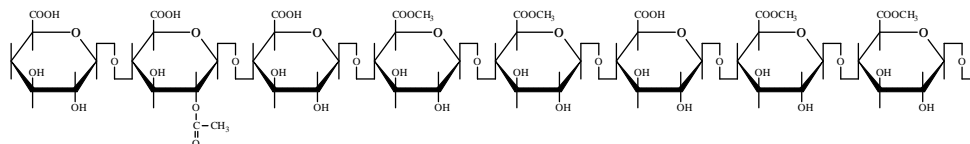
### 1.1.2. Nomenclatura y composición química.

Las sustancias pécticas se pueden clasificar en cuatro principales grupos según la American Chemical Society [1] [7]:

- (I) **Ácidos péctnicos:** el término es usado para definir a los ácidos poligalacturónicos coloidales que contienen una proporción considerable de grupos metil éster. El ácido pectínico, bajo condiciones adecuadas, es capaz de formar geles con azúcar y ácido; si el contenido de metoxilo es bajo, el gel podría formarse con ciertos iones metálicos. En forma de sal se denominan pectinatos [7] [1].
- (II) **Ácidos pécticos:** sustancias pécticas compuestas principalmente por ácido poligalacturónico coloidal y esencialmente libre de grupos metil éster. En forma de sal se denominan pectatos [7] [1].
- (III) **Pectina:** designa a los ácidos pécticos solubles en agua, con diferente contenido de grupos metil éster y grado de neutralización, los cuales son capaces de formar geles con azúcar y ácido bajo condiciones favorables [7] [1].
- (IV) **Protopectina:** sustancias insolubles en agua, las cuales se encuentran en las plantas y, bajo hidrólisis restringida, producen ácidos pectínicos [7] [1].

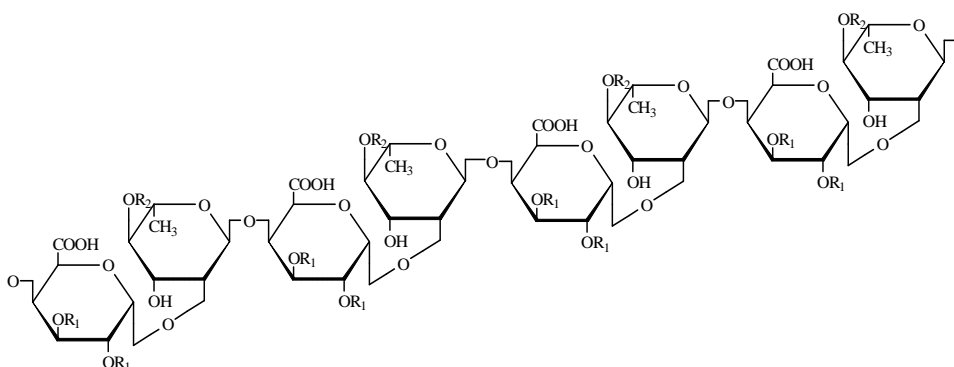
La molécula de pectina se divide estructuralmente en dos partes: la cadena principal y las cadenas laterales. La cadena principal está formada por unidades lineales de ácido D-galacturónico unidas mediante enlaces  $\alpha$ -(1,4) interrumpidas por enlaces  $\alpha$ -(1,2) de unidades de L-ramnosa. De esta manera, la cadena principal está formada por dos regiones: a) la región "lisa" u homogalacturonano (HG) integrada por unidades lineales de ácido D-galacturónico.

## Capítulo I



**Fig. 1:** Estructura normal del homogalacturonano encontrado en las regiones lisas de la pectina. El número de restos metilados y/o acetilados depende de la fuente de la cual se obtuvo la pectina [8].

y b) la región “pilosa” o ramno-galacturonano está formada por dímeros de D-galacturónico y L-ramnosa. Las cadenas laterales están formadas por restos de azúcares neutros que se encuentran unidos covalentemente al átomo de carbono 4 de las unidades de ramnosa dentro de la región del ramnogalacturonano [7].



**Fig. 2.** Estructura esquemática del esqueleto de ramno-galacturonano. R1 puede ser H o grupos acetilo (-CO-CH3). R2 puede ser H o una serie de cadenas de composición y tamaño variable dependiendo de la fuente de la pectina [8].

La distribución de las inserciones de L-ramnosa a lo largo del ramnogalacturonano no se ha dilucidado completamente. Sin embargo, existen dos hipótesis, la primera de ellas sugiere la presencia de las cadenas laterales y las inserciones de L-ramnosa de manera uniforme, mientras que la segunda indica que la incidencia es de forma aleatoria.

Por otro lado, las cadenas laterales de la pectina están constituidas principalmente por residuos de D-galactosa, L-arabinosa, D-xilosa y en menor medida de D-manosa, L-fructosa y D-apiosa, todas ellas unidas a la cadena principal a través del átomo de carbono 4 de los residuos de ramnosa.

## Capítulo I

Dentro de la cadena principal se encuentran algunos sustituyentes no glucídicos sobre los restos de ácido galacturónico, tales como metanol, ácido acético y ácidos fenólicos [7]. Los grupos carboxílicos del ácido galacturónico pueden estar neutralizados por iones monovalentes o divalentes como  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  [4] o pueden estar esterificados con metanol [7] [9] y algunos grupos hidroxilo en los átomos de carbono 2 y 3 de las unidades del ácido galacturónico pueden estar esterificados con ácido acético [7] [9].

### 1.1.3. Propiedades generales.

Si bien la principal función de las sustancias pécticas es como agente lubricante o cementante en la pared celular de las plantas superiores, éstas también se encuentran involucradas en las interacciones entre la planta hospedadora y sus respectivos patógenos [1]. Además, son responsables de la textura de frutas y vegetales durante el crecimiento, la maduración y el almacenamiento. Tradicionalmente, las sustancias pécticas tenían su aplicación sólo en la industria alimenticia como agente gelificante, pero actualmente ellas son también utilizadas como fibra nutricional [1] [2].

El gel de pectina se forma cuando las porciones de HG están unidas entrecruzadas formando una red cristalina tridimensional en donde el agua y los solutos quedan atrapados. Son varios los factores que determinan las propiedades gelificantes entre los que se incluyen la temperatura, el tipo de pectina, el grado de esterificación con metanol, el grado de acetilación, el pH, los azúcares, el calcio y otros solutos [10].

En el sector alimenticio, como se mencionó anteriormente, la principal utilidad de la pectina es como agente gelificante. Alrededor del 80% de la producción mundial de pectina altamente metoxilada es utilizada en la manufactura de mermelada de frutas y jalea para compensar la falta de pectina en estos productos [4] [2] [5] [11] [10] [3].

La pectina genera una textura que mantiene una distribución uniforme de las porciones de fruta durante el transporte. Además, poseen gran capacidad



## Capítulo I

para estabilizar emulsiones, suspensiones y espumas. Esta característica resulta ser de gran utilidad en la producción de bebidas frutales concentradas [4].

En el sector farmacéutico se utiliza pectina ya que la misma es capaz de aumentar la viscosidad y estabilizar emulsiones y suspensiones.

Otra de las propiedades que posee es la acción detoxificante, ésta probablemente se deba a la unión de la pectina con iones metálicos. También puede ser utilizada como carrier de fármacos, provocando una disminución en la toxicidad de los fármacos y una prolongación de su actividad sin la disminución de su efecto terapéutico [4].

Recientemente, los micro-glóbulos de la pectina fueron desarrollados para su potencial uso en quimioterapia de cáncer regional como sistema de liberación de droga intravascular biodegradable. Las sustancias pécticas probablemente también tengan un favorable efecto homeostático y antifibrinolítico [9].

En el sector de cosmética se utiliza la propiedad tradicional de la pectina, que es la de formar geles. Los productos comerciales realizados a partir de éstos son geles para cabellos y pastas [9].

### ***1.2. Enzimas péctinolíticas.***

Las sustancias pécticas son naturalmente degradadas por las enzimas pécticas. La clasificación de estas enzimas está basada en el ataque sobre la estructura de galacturonano de las moléculas de pectina. Básicamente existen tres tipos de enzimas pecticas: las enzimas desesterificantes (pectinestearasas), las enzimas despolimerizantes (pectinasas: hidrolasas y liasas) y las protopectinasas [2] [4].

La primera de ellas cataliza la desesterificación de los grupos metoxilos de la pectina formando ácido péctico. Estas enzimas son producidas por hongos, bacterias, levaduras y plantas superiores. Estas enzimas, denominadas pectinestearasas (PE), pueden estar involucradas en cambios en las sustancias pécticas de las frutas y vegetales durante la maduración, el almacenamiento y el procesamiento de los mismos [2].

## Capítulo I

Las despolimerasas rompen cualquiera de los enlaces  $\alpha$ -(1,4)-glicosídico entre los monómeros de ácido galacturónico de las sustancias pécticas por hidrólisis (hidrolasas) o por  $\beta$ -eliminación (liasas). Las hidrolasas han sido divididas en cuatro grupos: aquellas que prefieren al pectato fueron denominadas poligalacturonasas, mientras que las que prefieren degradar la pectina fueron denominadas polimetilgalacturonasas. Los prefijos endo- y exo- utilizados en conjunto con cualquiera de estos nombres denotan una acción aleatoria o desde los extremos sobre las moléculas, respectivamente.

Las endopoligalacturonasas (endo-PGasas) son producidas por una amplia variedad de organismos, entre ellos, numerosos hongos y bacterias, algunas levaduras, plantas superiores y algunos parásitos de plantas. Y las exopoligalacturonasas (exo-PGasas) han sido encontradas en diferentes frutas y vegetales, así como también en hongos y algunas bacterias [2].

Las liasas, que son también denominadas *trans*-eliminadas, rompen los enlaces glicosídicos tanto del pectato (endo- y exo- poligalacturonatoliasa) como de la pectina (endopolimetilgalacturonatoliasa o pectin liasa). Las pectinliasas (endo-) son las únicas pectinasas que hidrolizan la pectina altamente metilada[2].

Las protopectinasas (PPasas), son las enzimas capaces de hidrolizar la protopectina convirtiéndolas en pectina altamente polimerizada y soluble. Estas son clasificadas a su vez en dos tipos: las tipo A hidrolizan la región de ácidos poligalacturónicos de la protopectina y las tipo B hidrolizan las cadenas de polisacáridos que conectan las cadenas de ácido poligalacturónico y los constituyentes de la pared celular [2].

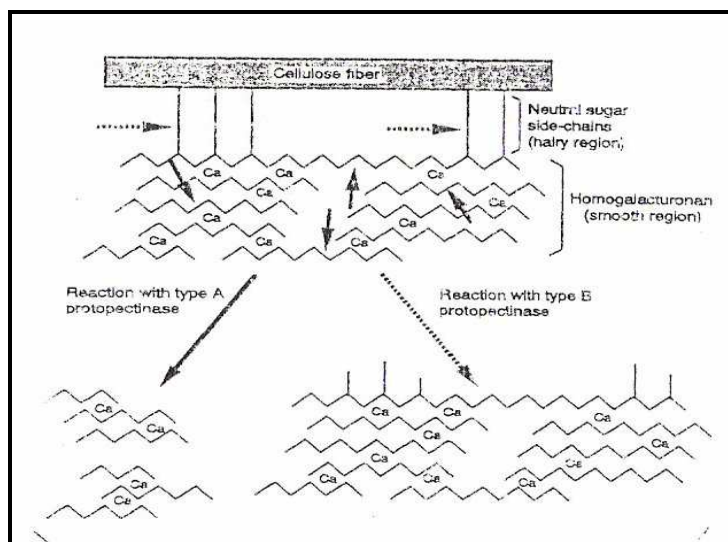


Fig. 3. Acción de la protopectinasa tipo A y B [12] [4].

La existencia de este grupo de enzimas como tal, actualmente 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. En el caso particular de *G. klebahnii*, Iguchi *y col* [13] hallaron que el gen que codifica para la PPasa-SE, objeto de este seminario, muestra una gran homología con poligalacturonasas clásicas. Parece más lógico considerar a la actividad PPasa como una característica particular de algunas enzimas pectolíticas que tienen una afinidad particularmente alta por sustratos insolubles [8].

Finalmente, las ramnogalacturonasas, son enzimas recientemente descritas capaces de degradar pectina. Actúan, junto con una ramnogalacturonano acetilasa, únicamente sobre regiones de la pectina ramificada, liberando oligosacáridos compuestos por secuencias alternadas de residuos L-ramnosilos con uniones  $\alpha$ -(1,2) y D-galacturosilos con uniones  $\alpha$ -(1,4), con grupos galactosilos con uniones  $\alpha$ -(1,4) sobre algunas de las unidades ramnosilos. La terminación no reductora siempre es una unidad de ramnosa [5]. Estas enzimas poseen una gran importancia tecnológica ya que ayudan a la solubilización y fragmentación de las regiones pilosas facilitando la extracción y filtrado de jugos [8].

### ***1.3. Aplicación industrial de las enzimas pectinolíticas.***

#### Producción de pectina.

La pectina, como se mencionó anteriormente, es una sustancia muy utilizada en la fabricación de alimentos, cosméticos y medicina; por lo que es considerada una sustancia industrialmente importante y es de gran interés producirla a escala industrial [4].

Sakai y Okushima [14] han intentado producir pectina utilizando cáscara de mandarina (*Citrus unshiu*) como material crudo y desarrollando un método microbiológico a través del cual la pectina pueda ser extraída enzimáticamente de la cáscara de los cítricos sin la necesidad de macerar el tejido vegetal. En el método microbiológico desarrollado para la “producción” de pectina se utiliza la protopectinasa (PPasa) de *Geotrichum klebahnii* (*G. Klebahnii*). El método consiste en crecer aeróbicamente *G. klebahnii* en un cultivo batch y luego de 24 hs se le adiciona al mismo una suspensión de cáscara de mandarina y se agita a 30 °C por 15 a 20 hs. Este tipo de procesos puede utilizarse como una alternativa a los métodos químicos tradicionales de extracción: extracción ácida (pH 2) en caliente (80-100°C) [8].

En los últimos años, la ingeniería genética ha provocado una revolución, en las industrias relacionadas con procesos microbiológicos, debido a la posibilidad de clonar y expresar en forma heteróloga los genes de estas enzimas consiguiendo cantidades y purezas imposibles de alcanzar por métodos convencionales. Esto ha permitido armar mezclas de enzimas óptimas para cada uno de los procesos en los que se vea involucrado su uso [8].

#### En otros sectores.

Las PPasas pueden ser utilizadas para aislar protoplastos de plantas mesófilas. Se demostró que la PPasa-S puede ser utilizada para aislar tejidos de mesófilos germinados como *Tagetes minuta*, *Brassica napa*, *Raphanus sativus*, *Lactuca sativa*, *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, *Hordum vulgare*, *Panicum crusgalli*, *Avena sativa*, *Zea mays* y *Oryza sativa*. Con frecuencia, estas células vegetales sobreviven y vuelven a crecer para dar una nueva planta. PPasa-S es

## Capítulo I

indispensable para la preparación de protoplastos de células de monocotiledóneas [4].

### Producción de células independientes para producción de alimentos.

En este caso, las PPasas son utilizadas para generar preparados de células simples a partir de vegetales utilizados en la industria alimenticia [4] [15] [6]. Los vegetales procesados que dan preparados de células simples pueden proveer una nueva clase de ingrediente de uso en alimentos. Muchas de las células vegetales aisladas por métodos enzimáticos son capaces de sobrevivir con la pared celular intacta. Como células individuales son capaces de volver a crecer para dar una nueva planta si se incuba bajo condiciones adecuadas. Esto es posible ya que las condiciones de aislamiento no son agresivas y preservan las funciones biológicas de la célula. En este caso, el flavor, los pigmentos, y los nutrientes como las vitaminas presentes en el vegetal original son mayoritariamente preservados en los preparados de células simples [4].

Nakamura y col [12] encontraron que las PPasas pueden ser utilizadas para extraer células simples de tejidos vegetales. Las PPasas de *Geotrichum klebahnii*, *A. awamori*, y *Bacillus subtilis* son útiles para este propósito. Los componentes de las células simples son más estables que aquellos preparados obtenidos por ruptura mecánica de tejidos.

#### **1.4. Microorganismos pectinolíticos.**

Las enzimas pectinolíticas fueron aisladas de diversos microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Estas han sido purificadas y caracterizadas desde el punto de vista molecular así como también desde su mecanismo catalítico.

Las PPasas tipo A son encontradas en cultivos de levadura y de hongos levaduciformes. Ellas han sido aisladas de *Kluveromyces fragilis* IFO0288, *Galactomyces reesei* L. y *Trichosporum penicillatum* SNO-3 (actualmente *Geotrichum klebahnii* ATCC 42397), sus nombres son PPasa-F, PPasa-L y PPasa-S,

## Capítulo I

respectivamente. Las PPasas tipo B han sido encontradas en *Bacillus subtilis* IFO 12113, *B. subtilis* IFO 3134 y *Trametes sp.* y se las denomina de la siguiente manera PPasa-B, PPasa-C y PPasa-T, respectivamente. Las PPasas tipo B fueron encontradas en cultivos filtrados de un amplio rango de *Bacillus sp.* [2].

Las endo-PGasas están ampliamente distribuidas entre hongos, bacterias y levaduras. También son encontradas en plantas superiores y en algunos parásitos de plantas.

Las endo-PGasas de un gran número de microorganismos han sido clonadas y estudiadas genéticamente. En cambio, las exo-PGasas son encontradas con menor frecuencia que las endo-PGasas. Las exo-PGasas, a su vez, se distinguen en dos tipos: las exo-PGasas de hongos que generan como producto final principal ácido monogalacturónico y las exo-PGasas de bacterias que generan como producto final principal ácido digalacturónico [2].

En la Tabla I se muestran algunos de los microorganismos de los cuales se aislaron endo y exo poligalacturonasas.

**Tabla I.** Microorganismos productores de endo y exo poligalacturonasas [2].

Endo-PGasas	Exo-PGasas
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Erwinia carotovora</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>
<i>Neurospora crassa</i>	<i>E. chrisanthemi</i>
<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Alternaria mali</i>
<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
<i>Peecilomyces clavispurus</i>	<i>Bacillus sp.</i>

Las poligalacturonatoliasas (PGLs) son producidas por muchas bacterias y algunos hongos patógenos, siendo las endo-PGLs más abundantes que la exo-PGLs. Las PGLs han sido aisladas de bacterias y hongos asociados con los residuos alimenticios y sobretodo con aquellos de fácil putrefacción.

Ellas han sido encontradas en: *Colletotrichum lindemuthionum*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Erwinia carotovora*, *Amucala sp.*, *Pseudomonas syringae* pv.

## Capítulo I

*Glycinea*, *Colletotrichum magna*, *E. chrysanthemi*, *Bacillus* sp., *Bacillus* sp. DT-7., *C. gloeosporioides*.

Sin embargo, muy pocos productores de polimetilgalacturonato liasas han sido reportadas en la literatura. Entre ellos se encuentran: *Aspergillus japonicus*, *Penicillium paxilli*, *Penicillium* sp., *Pythium splendens*, *Pichia pinus*, *aspergillus* sp., *Thermoascus aurantiacus* [2].

La actividad pectinestearasa (PE) está implicada en el metabolismo de la pared celular, incluyendo el crecimiento celular, la maduración del fruto, la caída del fruto, la senescencia y la patogenicidad. Esta enzima es encontrada en plantas, en bacterias patógenas de plantas y en hongos. Los organismos en donde han sido encontradas son: *Rhodotorula* sp., *Phytophthora infestans*, *Erwinia chrysanthemi* B341, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachnospira pectinoschiza*, *Pseudomonas solanacearum*, *Aspergillus Níger*, *Lactobacillus lactis* Subsp. *Cremoris*, *Penicillium frequentans*, *E. chrysanthemi* 3604, *Penicillium occitans*, *A. japonicus*, entre otros [2].

### 1.4.1. *Geotrichum klebahnii*.

En la década del '70, Sakai y col. en la Universidad Prefectural de Osaka (Japón) iniciaron la búsqueda de microorganismos productores de protopectinasas con el fin de poder utilizar dichas enzimas en la extracción enzimática de pectina. La primera PPasa fue aislada a partir de una levadura aislada de cáscara de mandarina denominada *Trichosporon penicillatum* SNO-3 en 1978 [9]. La enzima fue llamada comercialmente Pectinase-SE. Químicamente es una glicoproteína con un peso molecular de 40000 D que el microorganismo secreta al medio de cultivo. La enzima fue purificada, parcialmente caracterizada e identificada como una endopoligacturonasa (EC 3.2.1.15) [16] [17].

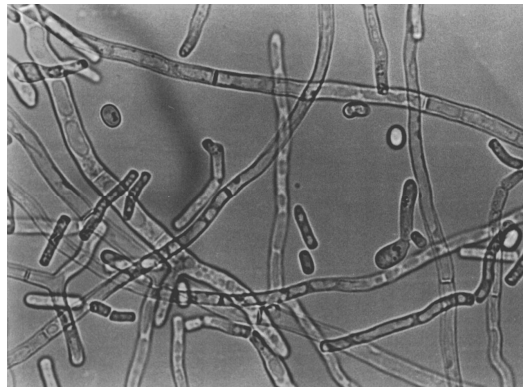
Dado que existían muchas dudas acerca de la taxonomía de éste microorganismo, en un principio fue catalogado como perteneciente al género de levaduras *Trichosporon*, que se caracteriza por tener células gemante de

## Capítulo I

forma muy variable, presentar micelio verdadero y por la formación de artrosporas [18]. Pero, en 1977 el *T. penicillatum* fue transferido al género *Geotrichum* y clasificado como un hongo [19]. Actualmente se lo denomina *Geotrichum klebahnii*.

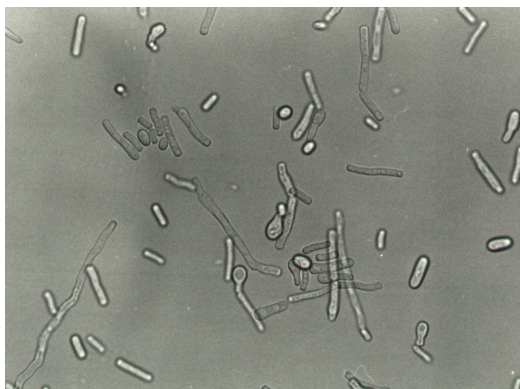
Este género está comprendido dentro del phylum ascomycota. Los miembros de este género son hongos levaduriformes caracterizados por hifas estrechas con ramificaciones escasas y cortas. No poseen blastoconidias, conidioforos ni pseudohifas pero sí presentan artroconidias con un tamaño promedio de 6-12 x 3-6  $\mu\text{m}$ , unicelulares, en cadena, hialinas que resultan de la fragmentación de hifas indiferenciadas por fisión mediante la formación de septos dobles. Pueden ser rectangulares o poseer los extremos redondeados asemejándose a pequeños barriles. La ausencia de células vacías que al fragmentarse produzcan la liberación de las artroconidias (células separadoras) es típica de este género [20] [21] [18] [22].

*Geotrichum* posee en medio sólido un crecimiento rápido con la formación de colonias blancas secas con aspecto de algodón. En medios ricos al final de la fase de crecimiento genera un fuerte aroma a fruta [20] [21].



**Fig. 4.** Fotografía de *Geotrichum klebahnii* creciendo en medio sintético (forma micelar).





**Fig. 5.** Fotografía de *Geotrichum klebahnii* creciendo en medio sintético en forma de artrosporas.

Cuando se cultiva en medio líquido, el ciclo morfológico es sencillo. Si un medio líquido se inocula a partir de medio sólido, *Geotrichum klebahnii* se presenta como artrosporas. La evolución morfológica es la siguiente: germinación de la artrospora; crecimiento e hifas poco ramificadas; fragmentación con formación de artrosporas de las hifas fértiles (con septo visibles en algunas de ellas); artrosporas en el final de la fermentación [8]

Durante el cultivo, las hifas se rompen fácilmente y, como consecuencia de ello no forma pellets sino una suspensión homogénea. Esto es un factor positivo, debido a que la difusión de oxígeno y nutrientes en los pellets es a menudo limitante durante los cultivos con hongos [23].

Es poca la información que existe acerca del metabolismo de *G. klebahnii* aparte de aquella utilizada para la taxonomía. Solo se conocen algunos requerimientos nutricionales, dentro de ellos están: crecimiento utilizando como fuente de carbono y energía (FCE) D-glucosa, D-galactosa, D-ribosa, Lactato, Etanol, etc.; crecimiento usando como fuente de nitrógeno (FN) urea [18].

Cavalitto *y col* [23] reportaron un valor de  $\mu_{max}$  de  $0,45 \text{ h}^{-1}$  para el *G. klebahnii* creciendo en batch a pH 5, con glucosa como FCE y urea como FN.

### ***1.5. Maceración de tejidos vegetales.***

Los preparados enzimáticos encargados de separar los tejidos vegetales son utilizados para el procesamiento de vegetales y frutos. Dichos preparados pueden clasificarse en dos tipos. El primer grupo es capaz de degradar la pared celular y lograr la desintegración total del tejido vegetal. Ellos son utilizados mayoritariamente en la elaboración de comestibles con una alta proporción de sólidos solubles como por ejemplo el puré de tomate y para mejorar el rendimiento en la obtención de jugos de frutas. Generalmente, son utilizadas una combinación de enzimas celulíticas y pectinolíticas para lograr una completa degradación [12] [24].

El segundo grupo actúa preferentemente sobre la laminilla media del tejido vegetal e involucra la maceración enzimática. Dado que generan suspensiones de células libres y/o pequeños cúmulos celulares, estos procesos son utilizados en la elaboración de bases de néctares, puré de vegetales y alimentos para bebés y ancianos [25].

Para lograr este propósito, sólo el material cementante intercelular y algunas porciones de la pared celular primaria deberían ser removidos sin dañar la pared celular secundaria que se encuentra ubicada a continuación de la primaria. Por esta razón, las celulasas son indeseables en esta mezcla enzimática [12].

El material cementante intercelular del tejido vegetal es también llamado laminilla media. La degradación de la misma es llevada a cabo por protopectinasas. Como se detalló anteriormente, la protopectina es la sustancia péctica insoluble presente en los tejidos vegetales que por degradación restringida origina pectina soluble. De este modo, las PPasas constituyen un grupo heterogéneo de enzimas con diferentes actividades catalíticas. Dentro de ellas las enzimas pécticas y las glican hidrolasas ocupan los roles más importantes [3]. Las PPasas poseen una característica común ya que todas ellas presentan una mayor afinidad sobre sustratos insolubles que sobre sus equivalentes solubles, propiedad que es muy deseable en preparaciones para la maceración de tejidos vegetales [12] [24].

### 1.5.1. Cítricos.

Los frutos cítricos tienen tres capas morfológicamente distintas. El epicarpo constituye la porción coloreada, es decir, la corteza y se la conoce como *flavedo*. En el flavedo están las células que contienen a los carotenoides, que le da el color característico a los distintos cítricos, por ejemplo, naranja, mandarina, pomelo, limón, etc. Las glándulas, también se encuentran en el flavedo formando las estructuras más altas en la corteza de los cítricos que contienen los aceites esenciales de cada especie [26].

La capa ubicada por debajo del epicarpo es el mesocarpo o el *albedo*. Se caracteriza por ser gruesa, blanca y esponjosa. Sin embargo, las mandarinas poseen un albedo muy fino y es dificultoso separarlo del flavedo. El albedo está compuesto por una gran cantidad de células parenquimatosas ricas en sustancias pécticas y hemicelulosas. Este envuelve completamente al endocarpo, que constituye la porción comestible de los cítricos. La combinación de albedo y flavedo es llamado pericarpo, y se lo conoce como corteza o cáscara [26].

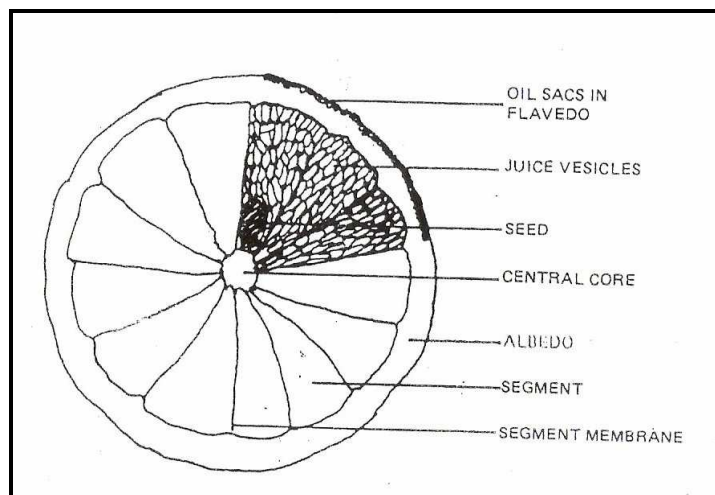


Fig. 6. Partes características de los cítricos [26].

La porción comestible de los cítricos, el endocarpo, está compuesto por varios gajos. Generalmente una fruta puede tener desde 9 hasta 13 gajos. Dentro de cada gajo están localizadas las vesículas de jugo, que están unidos a la membrana de los gajos por un pedúnculo. Las vesículas de jugo tienen

## Capítulo I

membranas relativamente fuertes y muchas células de jugo que poseen una pared más fina.

Muchos de los constituyentes químicos están distribuidos entre los distintos tejidos de manera no homogénea ya que en algunos tejidos están más concentrados que en otros. Por ejemplo, los flavonoides glicosilados se encuentran en mayor concentración en el albedo que en cualquier vesícula de jugo o cualquier flavedo, y el limonin que es el componente amargo se encuentra mayoritariamente en las semillas y en las membranas. Los azúcares se encuentran distribuidos en las células de todos los tejidos, pero las células de jugo son las que poseen la mayor cantidad de azúcares en sus vacuolas y la mayor cantidad de ácido [26].

### 1.5.2. Pomelo.

El pomelo, también conocido como toronja o pamplemusa, es el fruto del árbol homónimo que pertenece al género *Citrus* de la familia de las Rutáceas. Esta familia comprende más de 1.600 especies. El género botánico *Citrus* es el más importante de la familia, y consta de unas 20 especies con frutos comestibles todos ellos muy abundantes en vitamina C, flavonoides y aceites esenciales. Los frutos, llamados espérides, tienen la particularidad de que su pulpa está formada por numerosas vesículas llenas de jugo.

El pomelo es una hibridación natural que se dio en las islas Barbados en el siglo XVII, entre un naranjo dulce y un pummelo (*Citrus grandis*). El fruto es un hesperidio globoso o apenas piriforme, de hasta 15 cm de diámetro. Está recubierto de una cáscara gruesa, carnosa, rugosa, despegada del endocarpo, de color amarillo o rosáceo, con glándulas oleosas pequeñas y muy aromáticas. Tiene 11 a 14 gajos, firmes, muy jugosos, dulces o ácidos según la variedad, separados por paredes membranosas de característico sabor amargo que contienen pulpa de color que va del amarillo pálido al rojo muy intenso. Las semillas son escasas, de hasta 1,25 cm de largo, normalmente poliembriónicas, lisas, elípticas o apicadas, blancas por dentro.

## Capítulo I

La industria alimentaria aprovecha su riqueza en fibras solubles-pectina-, ácido cítrico y ácido ascórbico (vitamina C) como espesantes y conservantes. De la piel se obtienen aceites que son utilizados como aromatizantes, de la piel interior y de la pulpa sin jugo se extrae la naringina, un flavonoide con sabor amargo muy utilizado para aromatizar bebidas tónicas amargas, dulces, helados, productos de panadería, etc. Actualmente, también se utilizan para que los aceites vegetales no se enrancien.

### 1.5.3. Flavonoides.

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas cuyo esqueleto común es el 2-fenil-1,4-benzo pireno. Este esqueleto carbonado puede estar modificado, y es la porción del flavonoide que se denomina aglicón.

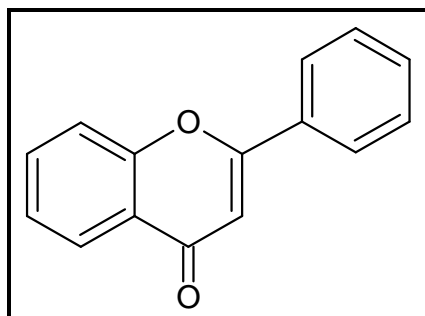


Fig. 7. Estructura molecular del 2-fenil-1,4-benzo pireno esqueleto químico de los flavonoides.

Los flavonoides están presentes en casi todas las plantas, fundamentalmente en las partes aéreas, pero varían cualitativamente de una planta a otra. Se han descubierto más de 4.000 y están recibiendo gran atención por parte de la comunidad científica, debido a que se les atribuyen propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y como protectores de vasos sanguíneos. Estas propiedades biológicas los señalan como posibles opciones para el tratamiento de enfermedades vasculares [27].

La L-ramnosa se encuentra formando parte de una gran familia de flavonoides presente en las plantas del género *Citrus*. Entre los flavonoides

## Capítulo I

glicosilados más importantes de la familia *Citrus* se encuentran la naringina, la hesperidina, narirutina y diosmina.

Todas las frutas cítricas contienen los aglicones tales como hesperetina y naringenina pero estas mismas rara vez se encuentran como moléculas libres en la planta, sino que suelen estar glicosilados por los disacáridos rutinosa o neohesperidosa. De las posibles combinaciones entre estos aglicones y los disacáridos surgen los distintos flavonoides glicosilados. (Fig. 8) [28] [29].

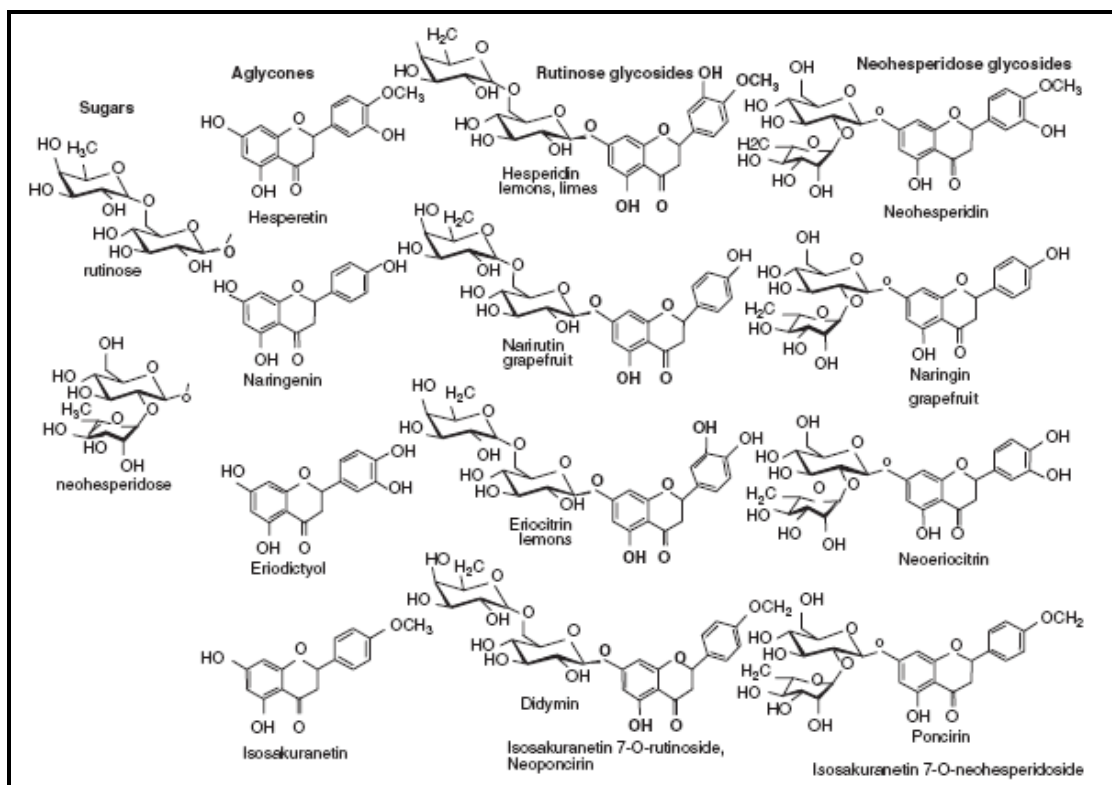


Fig. 8. Flavonoides presentes en la familia *Citrus*, disacáridos y aglicones que los componen. [29].

En este trabajo el antioxidante de mayor interés es la naringina, el principal flavonoide amargo glicosilado y el principal componente amargo en el pomelo [30] [31] [29] [32]. Keterson y Hendrickson encontraron que la mayor concentración de naringina está en el albedo, aunque en menor concentración se encontró también en los gajos y en el jugo [26].

### **1.6. Objetivos.**

- Estudiar el efecto de la concentración de inóculo sobre la producción de PPasa-SE en cultivos líquidos de *G. klebahnii*.
- Estudiar el efecto de la agitación del cultivo sobre la producción de la PPasa-SE.
- Estudiar la maceración de cáscara de pomelo con PPasa-SE bajo diferentes condiciones de agitación, pH, concentración de buffer citrato y fuerza iónica.
- Estudiar y cuantificar la liberación de azúcares, flavonoides y pectina provocada a partir de la maceración de albedo de pomelo.

### 1.7. Bibliografía.

- [1] Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry* 2005;40:2931-2944.
- [2] Alkorta I, Garbisu C, LLama MJ, Serra JL. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biotechnology* 1998;33:21-28.
- [3] Sakai T. Degradation of pectins. 1992;57-81.
- [4] Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme EJ. Pectin, pectinase, protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology* 1993;39:213-294.
- [5] Voragen AG, Pilnik W., Thibault JF, Axelos MA, Renard C. Pectins. 1995;1:287-339.
- [6] Voragen AG and Pilnik W. Pectin-degrading enzymes in fruit and vegetable processing. *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology* 1989;93-115.
- [7] Contreras Esquivel JC, Hours RA, Aguilar C, Reyes-Vega ML, Romero J. Revision: Extracción microbiológica y enzimática de pectina. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 1997;47:208-216.
- [8] Cavalitto SF. Crecimiento de *Geotrichum klebahnii* y expresión de protopectinasa-SE. 2003;
- [9] Sakai T and Okushima M. Protopectin solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric.Biol.Chem.* 1978;42:2427-2429.
- [10] Willats WGT, Knox JP, Mikkelsen JD. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* 2006;17:97-104.
- [11] Arslan N and Togrul H. Filtration of pectic extract from grapefruit peel and viscosity of pectin solutions. *Journal of Food Engineering* 1996;27:191-201.
- [12] Nakamura T, Hours RA, Sakai T. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science* 1995;60:468-472.
- [13] Iguchi K, Kishida M, Sakai T. Purification and characterization of three extracellular protopectinases with polygalacturonase activities from *Trichosporon penicillatum*. *Biosc.Biotech.Biochem* 1996;60:603-607.
- [14] Sakai T and Okushima M. Microbial production of pectin from citrus peel. *Applied and Environmental Microbiology* 1980;39:908-912.
- [15] Biely P and Kremmický L. Yeast and their enzymes system degrading cellulose, hemicellulose and pectin. *Food technol.biotechnol.* 1998;36:305-312.



## Capítulo I

- [16] Sakai T, Okushima M, Sawada M. Some properties of endopolygalacturonase from *Trichosporon penicillatum* SNO-3. *Agric.Biol.Chem.* 1978;46:2223-2231.
- [17] Sakai T and Okushima M. Purification and crystallization of protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agriculture, Biology and Chemistry* 1982;46:667-676.
- [18] de Hoog GS, Smith MT, Guého E. A revision of the genus *Geotrichum* and its teleomorphs. *Studies in Mycology* 1986;1-130.
- [19] Von Arx JA. Notes on dipodascus, Endomyces and Geotricum with the description of two new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1977;43:333-340.
- [20] Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi M. *Guide to Clinically Significant Fungi.* 1988;1:
- [21] Larone.D.H. *Medically Important Fungi - A guide to Identification.* 1995;3:
- [22] King DS and Jong SC. Induction of arthroconidia in *Trichosporom.* *Mycopathologia* 1976;59:61-63.
- [23] Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF. Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with syntetic media. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2000;25:260-265.
- [24] Carné M, Cavalitto SF, Hours RA. Maceracion de papa con protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii*. 2008;873-880.
- [25] Rombouts FM and Pilnik W. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochemistry* 1978;13:9-13.
- [26] Ting SV and Rouseff RL. Morphology and physiology. 1986;1:1-6.
- [27] Garcia Mesa M, Armenteros Herrera DM, Vilas MM, Coma Alfonso C, Hernandez Carretero J, Diaz Batista A, Fernandez Montequini J. Plantas citricas en el tratamiento de enfermedades vasculares. *Rev.Cubana Angiol.y Circ.Vasc.* 2002;3:39-46.
- [28] Peterson JJ, Dwyer JT, Beecher GR, Bhagwat SA, Gebhardt SE, Haytowitz DB, Holden JM. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos:a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006;19:566-573.
- [29] Peterson J, Beecher G, Bhagwat S, Dwyer J, Gebhardt S, Haytowitz D, Holden J. Flavonones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and rewiew of

## Capítulo I

the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006;19:S74-S80.

[30] Vila Real H, Alfaia A, Calado A, Ribeiro M. High pressure-temperature effects on enzymatic activity: Naringin biotransformation. *Food Chemistry* 2007;102:565-570.

[31] Wu T, Guan Y, Ye J. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry* 2007;100:1573-1579.

[32] Reichart E and Obendorf D. Determination of naringin in grapefruit juice by cathodic stripping differential pulse voltammetry at the hanging mercury drop electrode. *Analytica Chimica Acta* 1998;360:179-187.

## Capítulo II

### Estudio del efecto de distintas variables de cultivo sobre la expresión de la PPasa-SE de *Geotrichum klebahnii*.

#### **2.1. Introducción.**

Como se detalló en el capítulo I *Geotrichum klebahnii* (Gk) es capaz de producir, en medio sintético con glucosa como fuente de carbono y energía (FCE) y urea como fuente de nitrógeno (FN), una poligalacturonasa con actividad protopectinasa denominada PPasa-SE.

La expresión de las enzimas hidrolíticas por microorganismos está fuertemente influenciada por variables del cultivo tales como la composición del medio de cultivo [1]. Es por ello, que para realizar los distintos ensayos se utilizó el medio sintético propuesto por Cavalitto y Mignone [2] optimizado para la producción de esta enzima.

Las técnicas comúnmente aplicadas para la medición de actividad poligalacturonasa se basan en la disminución de la viscosidad de una solución de ácido poligalacturónico (PGA) o en el incremento del poder reductor debido a la liberación de grupos reductores a partir de PGA. La medición de las dos técnicas permite catalogar a una poligalacturonasa (PGasa) como endo o exo PGasa ya que, mientras las primeras producen una gran disminución de la viscosidad junto con el aumento del poder reductor, las últimas sólo incrementan el poder reductor de la mezcla de reacción. El poder reductor generado puede medirse por varios métodos. Algunos autores [3] [4] [5] [6] [7] [8] utilizan el método de Somogyi-Nelson [9] [10], otros [11] el método de la reducción de ferrocianuro de potasio. También es utilizado [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) de Miller [19]. En el presente trabajo se eligió el método de Somogyi-Nelson [20] [21] dado que posee una mayor sensibilidad [22].

En este capítulo se reportan los resultados obtenidos en los trabajos tendientes a determinar las condiciones óptimas de velocidad de agitación y

concentración de inóculo para la producción de PPasa-SE por *Gk* en cultivos batch.

## 2.2. Materiales y métodos.

### 2.2.1. Reactivos químicos.

El ácido D-galacturónico monohidrato (a partir de ahora, GALA) y el ácido poligalacturónico (PGA) de frutos cítricos fueron de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

### 2.2.2. Cepa.

La cepa que se utilizó en todos los ensayos fue *Geotrichum klebahnii* ATCC 42397.

### 2.2.3. Mantenimiento de la cepa.

La cepa se conserva a  $-70^{\circ}\text{C}$  en glicerol al 15 % (V/V). A partir de este stock se replica en un medio de mantenimiento (YPD) y se la mantiene a  $4^{\circ}\text{C}$  bajo vaselina durante 6 meses aproximadamente luego de lo cual se la descarta. A partir de este cultivo se sembraron los inóculos para los distintos ensayos realizados.

### 2.2.4. Composición de los medios de cultivo.

Como medio de mantenimiento se utilizó el medio YPD reportado por Sakai *et al* [23].

**Tabla II.** Medio de mantenimiento YPD.

Componentes	Concentración (g/L)
Peptona de carne	5.0
Extracto de levadura	5.0
Glucosa	20.0
Agar	20.0
pH	5.0

Medio de referencia (MR).

El medio sintético que se utilizó es el propuesto por Cavalitto y Mignone [2] optimizado para la producción de PPasa-SE de *Geotrichum klebahnii*. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C, a excepción de las vitaminas y la urea las cuales se esterilizaron por filtración y se agregaron al medio estéril previo a la inoculación del mismo.

**Tabla III.** Medio de referencia (MR).

Componentes	Concentración
Glucosa	10.0 g/L
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.2 g/L
Urea	1.2 g/L
Solución de cationes	2.0 ml/L
Solución de vitaminas	2.0 ml/L
pH	2.8

**Tabla IV.** Composición de la solución de vitaminas.

Solución de vitaminas*	
Componentes	Concentración (g/L)
Inositol	70.0
Ácido p-amino benzoico	1.0
Pantotenato de Ca	4.0
D-Biotina	0.06
Piridoxina	1.0
Ácido nicotínico	12.0
Tiamina	0.6

(\*) Solución stock de cationes 200X y solución stock de vitaminas 1000X se agregan al medio a razón de 2 mL/L.

**Tabla V.** Composición de la solución de cationes optimizados.

Solución de cationes*	
Componentes	Concentración
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	60.0 µg/L

### 2.2.5. Determinación de fuente de carbono.

La glucosa se determinó por el método enzimático de glucosa oxidasa (Wiener lab. Argentina) [24].

### 2.2.6. Determinación de la actividad enzimática.

La determinación de la actividad poligalacturonasa de *G. klebahnii* fue realizada siguiendo el protocolo de Cavalitto y col [25] utilizando la técnica de Somogyi-Nelson para la determinación del poder reductor liberado. El protocolo se detalla a continuación:

Se agregan 450 µl de PGA 0.2% disuelto en Buffer acetato (AcB) 20mM pH 5 en tubos de ensayo (se utilizan por muestra tres tubos en los que se colocan la muestra, un duplicado y un blanco de reacción).

Se coloca en un baño hielo para enfriar.

Se incorporan 50 µl de enzima (diluida convenientemente) en AcB (sólo a los tubos de muestra, no a los blancos).

Se incuba a 37 °C durante 10 minutos.

Se coloca en un baño hielo para detener la reacción.

Se realiza la curva patrón con una solución de GALA desde 0 ppm hasta 250 ppm la cual es sometida al mismo tratamiento que las muestras.

Se agregan 500 µl de reactivo Somogyi a todos los tubos (a las muestras, a los blancos y a la curva patrón).

Se agrega 50 µl de la muestra (diluida convenientemente) a cada blanco.

Se lleva a ebullición por 10 minutos.

Se coloca en un baño de agua/hielo durante 10 minutos para enfriar.

Se agregan 500 µl reactivo Nelson a todos los tubos.

Se agita vigorosamente en vortex y se dejan en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se agregan 4.5 mL de agua destilada en cada tubo.

Se lee en espectrofotómetro a 660 nm.

Se define la unidad de actividad PGasa como la cantidad de enzima que libera un µmol de poder reductor (como GALA) por minuto en las condiciones de reacción.

### **2.2.7. Cultivos en frascos erlenmeyer agitados.**

Se realizó un repique en un tubo conteniendo medio YPD en pico de flauta. Luego de incubarlo a 30°C por un lapso de 40-44 horas, los microorganismos se resuspendieron mediante agitación en vortex con el agregado de 10 ml de agua destilada estéril y con esa suspensión se sembraron frascos erlenmeyers de 1000 ml con 100 ml finales para asegurar una correcta transferencia de oxígeno. En estos cultivos se utilizó el medio MR diluido a la mitad.

En todos los casos la densidad óptica (DO 620 nm) de la suspensión obtenida desde el pico de flauta fue de alrededor de 0.7.

Los cultivos se realizaron en un agitador rotatorio New Brunswick a 30°C y 200 RPM, el crecimiento microbiano se siguió por medidas de DO, de glucosa y de pH. Se tomaron muestras para medida de actividad enzimática luego de terminada la FCE, en el momento en que el pH alcanzó un valor de 6 ya que la enzima es inestable a pH superiores. El incremento de pH en cultivos realizados con urea como FN es un buen indicador del agotamiento de la FCE ya que la urea es hidrolizada en forma periplasmática liberando NH<sub>3</sub> y CO<sub>2</sub>. Mientras hay FCE en el medio, el NH<sub>3</sub> es fijado como biomasa. Cuando la FCE se agota, el NH<sub>3</sub> se libera al medio de cultivo, incrementando rápidamente el valor del pH del mismo. Cavalitto *y col* [26] han reportado que el pico máximo de actividad PGasa ocurre luego de agotada la FCE. La inestabilidad de la PGasa de *G. klebahnii* a valores elevados de pH ha sido

reportada por Iguchi *y col* [27] y es una propiedad compartida por PGasas de otro origen.

Para la determinación enzimática se recolecta una alícuota de cultivo en tubos de polipropileno y se centrifuga a 10000 RPM durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se guarda en tubos eppendorfs de 1.5 ml a -18 °C hasta su análisis.

### 2.2.8. Cultivos en biorreactor.

**Biorreactor:** Para los cultivos en sistema batch se utiliza un biorreactor Inceltech LH 210 de 1.5 litros de capacidad máxima. El mismo cuenta con control automático de pH y monitoreo de O<sub>2</sub> disuelto. Se utilizó un volumen de MR de 1200 ml aproximadamente. El fermentador fue esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 121°C con el medio de cultivo.

**Inóculo:** El biorreactor se inoculó a partir del cultivo realizado en erlenmeyer agitado.

**Medida de oxígeno disuelto:** durante el cultivo se midió el nivel de O<sub>2</sub> disuelto con un electrodo de tipo polarográfico (Mettler Toledo).

**Medida de gases:** los niveles de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el gas de salida del reactor se midieron mediante un detector Servomex de tipo paramagnético y con un detector Horiba Pir 2000 con sensor infrarrojo respectivamente.

**Toma de muestras líquidas:** Las muestras líquidas se tomaron cada hora, de la siguiente manera: 20 ml de cultivo se recogieron en una probeta de 50 ml colocada en baño de hielo, de dicho volumen se tomaron 10 ml para determinar peso seco y el resto del volumen se centrifugó a 10000 RPM por 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes recuperados, se guardaron en tubos eppendorf de 1.5 ml en freezer a -18 °C hasta las determinaciones analíticas.

**Biomasa:** dado que el microorganismo no forma pellets compactos cuando se lo centrifuga, la determinación de peso seco debe ser realizada por filtración en filtro de acetato de celulosa de 0.45 µm de poro y 47 mm de diámetro. La biomasa retenida se lava y seca a peso constante en estufa a 60°C.



### 2.2.9. Determinación del K<sub>L</sub>a.

Se realizó la determinación del K<sub>L</sub>a del frasco erlenmeyer de 1000 ml y del biorreactor tipo tanque agitado, para poder calcular y analizar la transferencia de oxígeno que es capaz de proporcionar cada uno de los sistemas utilizados. Para medirlo se utilizó el método del N<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> de Cooper [28] en el caso de los erlenmeyers agitados, el consumo de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> se determinó por el método iodométrico mientras que en el fermentador se determinó por el método del balance gaseoso [29].

## 2.3. Resultados y discusión.

### 2.3.1. Determinación de la concentración de inóculo.

La primer variable evaluada fue la concentración de inóculo en frascos erlenmeyer agitados de 1000 ml. Los frascos erlenmeyers se sembraron según indica la Tabla VI.

**Tabla VI.** Composición de los cultivos en frascos erlenmeyers.

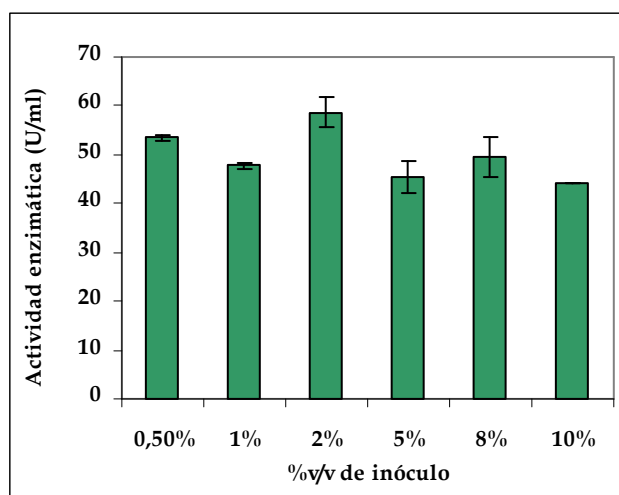
Suspensión de cultivo (ml)	Agua estéril (ml)	Medio de referencia (ml)
0.5	9.5	90
1	9	90
2	8	90
5	5	90
8	2	90
10	0	90

Tal como se indicó en materiales y métodos, la actividad máxima de los cultivos se obtiene luego de agotada la FCE y antes de que el pH del medio supere el valor de 7. Debido a esto, se tomaron muestras sólo cuando el cultivo alcanzó un valor de pH cercano a 6. Los resultados de dichos cultivos se observan en la siguiente tabla.

**Tabla VII.** Resultados obtenidos a partir de los cultivos en erlenmeyer. Tiempo de agotamiento de FCE, tiempo final y medida de la actividad enzimática.

%v/v de inóculo	Tiempo de agotamiento		Actividad PGasa (U/ml)
	de la FCE (h)	Tiempo final (h)	
0.5	18.8	21.5	53.54
1	17.0	20.8	47.69
2	15.0	19.0	58.67
5	12.2	15.7	45.45
8	11.0	16.2	49.61
10	10.2	14.0	44.08

Los valores de actividad PGasa obtenida en los cultivos se muestran en la Fig. 9.



**Fig. 9.** Medida de actividad enzimática a partir de los cultivos en erlenmeyer. Los volúmenes de suspensión en cultivo se encuentran expresados como %v/v.

Puede observarse que las actividades obtenidas no dependen mayormente del inóculo del cultivo. Sin embargo, como es esperable, a medida que aumenta el inóculo, se observa una disminución en el tiempo de cultivo. La variable tiempo resulta de mayor importancia a la hora de evaluar la productividad del cultivo.

### 2.3.2. Determinación de la velocidad de agitación.

La segunda variable a estudiar es la velocidad de agitación en biorreactor. Se eligió como concentración de inóculo 2% v/v ya que es con la que se obtuvo mayor actividad enzimática. Dado que sólo se tomaron muestras en la etapa final de los cultivos, el tiempo resultante de los cultivos realizados con dicho inóculo (entre 15 y 19 horas), permitió sembrarlos a última hora de la tarde y cosecharlos a la mañana temprano con lo que la enzima pudo ser procesada y medida en el día.

Se ensayaron tres velocidades de agitación para evaluar con cual de ellas se obtiene mayor actividad poligalacturonasa: 200, 400 y 700 rpm. Estos cultivos se sembraron con 2 ml de un inóculo líquido crecido en MR. En todos los casos el pH inicial en el biorreactor fue de 2.5. La duración de estos cultivos fue de 28-30 horas aproximadamente.

Los resultados obtenidos a partir de los cultivos en biorreactor se muestran en la figura 10.

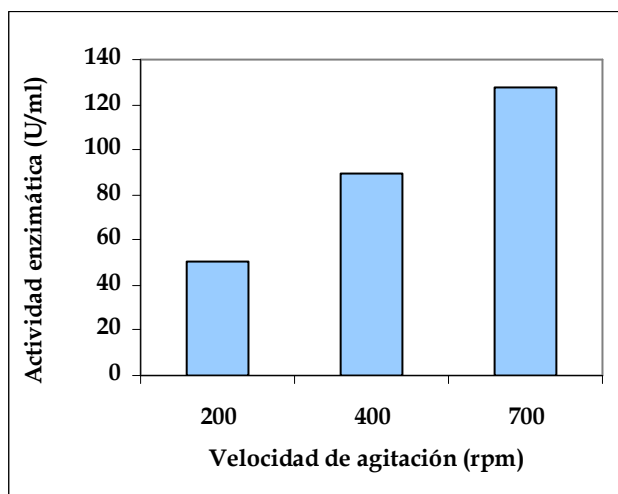


Fig. 10. Medida de la actividad enzimática en función de la velocidad de agitación.

Los resultados muestran que a medida que la velocidad de agitación aumenta, la actividad enzimática final también aumenta en gran medida. Esto puede deberse a que, a medida que aumenta la velocidad de agitación también aumenta la transferencia de oxígeno en el sistema y mejoran las

condiciones de mezclado. Esta disminución de la actividad en forma proporcional a la agitación puede deberse a la existencia de una limitación por O<sub>2</sub>. Dado que no fue posible medir el oxígeno disuelto por problemas en el electrodo correspondiente, se determinó el valor del K<sub>LA</sub> del fermentador en las condiciones de trabajo para tener una idea de la capacidad de transferir O<sub>2</sub> del fermentador.

Los valores del K<sub>LA</sub> para las distintas condiciones se pueden observar en la tabla VIII.

**Tabla VIII.** Medidas de k<sub>LA</sub> para los distintos cultivos ensayados.

Cultivos	Velocidad de agitación (rpm)	k <sub>LA</sub> (h <sup>-1</sup> )
Erlenmeyer	200	57.36
Biorreactor	200	80.26
	400	206.10
	700	857.59

Zapata Zapata *y col* [30] determinaron parámetros fisiológicos para el *G. klebahnii* creciendo en MR. En la tabla IX se resumen alguno de ellos.

**Tabla IX.** Parámetros fisiológicos de *G.k* en medio MR.

Parámetros	Valores
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0.29
Y <sub>x/s</sub>	0.564
Y <sub>CO<sub>2</sub>/s</sub>	0.462
b	0.434
CB	1.025
$\gamma_B$	1.026

En base a estos parámetros y utilizando el balance en fase líquida para el O<sub>2</sub> disuelto se puede determinar que para el crecimiento irrestricto de *G. klebahnii* en MR con 10 g/l iniciales de FCE el K<sub>LA</sub> mínimo requerido es de aproximadamente 220 h<sup>-1</sup>. Según puede verse en la tabla VIII es factible que

en las dos primeras condiciones de agitación el cultivo se haya limitado en  $O_2$ , provocando una disminución en la productividad de la enzima. Máxime si se tiene en cuenta que el método de Cooper sobreestima los valores de  $K_{La}$  por lo que los valores reales pueden ser menores que los indicados en la tabla.

Además, en un biorreactor tipo tanque agitado no sólo la transferencia de oxígeno aumenta sino que también aumenta el mezclado y estos dos factores proporcionan un ambiente favorable para el crecimiento del microorganismo de interés.

En base a estos resultados fue posible determinar que la condición de cultivo que optimiza la producción de enzima es inocular el biorreactor utilizando como concentración inicial 2% v/v de inóculo y trabajar a una velocidad de agitación de 700 rpm ya que la transferencia de oxígeno es adecuada y la enzima mantiene su actividad.

## 2.4. Bibliografía.

- [1] Rexova-Benková L and Markovic O. Pectic enzymes. 1976;33:323-385.
- [2] Cavalitto SF and Mignone CF. Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. Process Biochemistry 2007;42:175-179.
- [3] Voragen AG, Schols HA, Pilnik W. Structural feature of the hemicellulose polymers of apple. Z.Lebensm.Unters.Forsch. 1986;183:105-
- [4] Darvill AG, McNeil M, Albersheim P. Structure of plant cell walls VIII: a new pectic polysaccharide. PLANT PHYSIOLOGY 1978;62:418-
- [5] Renard C, Voragen AG, Thibault JF, Pilnik W. Studies in apple protopectin. V: structural studies on enzymically extracted pectin. Carbohydrate Polymers 1991;16:137-
- [6] Sun HH, Wooten JB, Ryan WSJ, Bokelman GH, Aman P. Structural characterization of a tobacco rhamnogalacturonan. Carbohydrate Polymers 1987;7:143-
- [7] Stevens BJH and Selvendran RR. Structural features of cell wall polysaccharides of the carrot. Carbohydrate Research 1984;128:321-
- [8] Massiot P, Rouau X, Thibault JF. Structural studies of cell wall of carrot (*Daucus carota* L.) 2: characterization of extractable pectin and hemicelluloses. Carbohydrate Research 1988;172:229-
- [9] Saulnier L, Brillouet JM, Joseleau JP. Structural studies of pectic substances from the pulp of grapes berries. Carbohydrate Research 1988;182:63-
- [10] Guillon F and Thibault JF. Structural investigation of the neutral side-chains of sugar-beet pectins. Part 1- methylation analysis and mild acid acid of hairy fragments from sugar-beet pectins. Carbohydrate Research 1989;170:85-

- [11] Seymour GB, Colquhoun IJ, DuPont MS, Parsley KR, Selvendran RR. Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. *Phytochem* 1990;29:725-
- [12] Darvill AG, McNeil M, Albersheim P, Delmer DP. The primary cell walls of flowering plants, the biochemistry of plants. 1980;91-
- [13] Dey PM and Brinson K. Plant cell wall. *Adv.Carbohyd.Chem.and Biochem.* 1984;42:265-
- [14] Selvendran RR. Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulocic polymers. *J.Cell.Scy.* 1985;2:1985-
- [15] Redgwell RJ, Melton LD, Brasch DJ. Cell wall polysaccharides of kiwi fruit (*actinia deliciosa*) chemical structure in different zones of the fruit al harvest. *Carbohydrate Research* 1988;182:241-
- [16] Ralet MC, Della Valle G, Thibault JF. Raw and extruded fibre from pea hulls. Part II: structural studies of the water soluble polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 1993;20:25-
- [17] de Vries JA, den Uijl CH, Voragen AG, Rombouts FM, Pilnik W. Structural features of the neutral side-chains of apple pectin substances. *Carbohydrate Polymers* 1983;3:193-
- [18] Voragen AG, Rombouts FM, Searle-van Leeuwen MF, Schols HA, Pilnik W. The degradation of arabinan by endo-arabinase arabinofuranosidases purified from *Aspergillus niger*. *Food Hydrocolloids* 1987;1:423-
- [19] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959;31:426-428.
- [20] Nelson N. A phtometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 1944;153:376-380.
- [21] Somogyi N. Notes on sugar determination. *Journal Biological Chemistry* 1952;195:19-23.
- [22] Cavalitto SF. Crecimiento de *Geotrichum klebahnii* y expresion de protopectinasa-SE. 2003;

[23] Sakai T and Okushima M. Purification and crystallization of protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. Agriculture, Biology and Chemistry 1982;46:667-676.

[24] Bergmeyer HU and Bernt E. Methods of enzymatic analysis. 1977;1205-1212.

[25] Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF. Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. Biotechnology Techniques 1999;13:385-390.

[26] Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF. Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with syntetic media. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 2000;25:260-265.

[27] Iguchi K, Kishida M, Sakai T. Purification and characterization of three extracellular protopectinases whith polygalacturonase activities from *Trichosporon penicillatum*. Biosc.Biotech.Biochem 1996;60:603-607.

[28] Cooper CM, Fernstrom GA, Miller SA. Performance of Agitated Gas-Liquid Contactors. Ind.Eng.Chem 1944;36:504-509.

[29] Cooney CL, Wang H, Wand D. Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. Biotechnology and Bioengineering 1977;19:55-67.

[30] Zapata Zapata AD, Cavalitto SF, Hours RA. Protopectinase Production by *Geotrichum klebahnii* in Fed-Batch Culture in Synthetic Medium. 2008;En prensa.



## Capítulo III

### Estudio de la maceración enzimática de albedo de pomelo.

#### ***3.1. Introducción.***

La maceración enzimática es el proceso por medio del cual se logra la desorganización de tejidos vegetales para conseguir células independientes de forma intacta, para producir pulpas de frutas y vegetales que se utilizan como ingredientes en alimentos para bebés y ancianos. Existen dos efectos que influyen en el proceso de maceración. El primero es la acción combinada de enzimas que degradan la lámina media de los tejidos (material cementante), la cual está compuesta principalmente de protopectina y otros polisacáridos. El segundo efecto son las fuerzas de corte o cizalla consecuencia de la agitación, las cuales permiten que luego de la degradación enzimática del material cementante, éste pueda ser separado de las células, proceso que de otra forma no sería eficiente debido principalmente a las fuerzas de atracción intrínsecas entre los componentes del tejido [1].

La Protopectinasa-SE hidroliza la protopectina de los tejidos, liberando de esta manera pectina soluble, dando como resultado la separación de las células [2]. Es por ello, que la aplicación de la PPasa-SE en el proceso de maceración de tejidos vegetales permitirá aprovechar, mediante tratamientos biotecnológicos innovadores y de bajo impacto ambiental, los residuos agrícolas provenientes principalmente de industrias de cítricos, los cuales contienen una alta concentración de compuestos fitoquímicos benéficos para la salud humana. Por su alto nivel de producción en Argentina y su alto contenido de vitaminas y flavonoides, el pomelo es un interesante modelo de estudio del proceso de maceración enzimática. Múltiples variables del sistema fueron analizadas.

En las últimas décadas se han utilizado los métodos estadísticos a fin de estudiar sistemas multivariantes. Suele llevarse a cabo un número de diseños factoriales (fraccionarios y completos) a fin de identificar aquellos componentes (variables independientes) que poseen algún efecto sobre la variable que se

desea optimizar (variable dependiente) seguido de uno o más ensayos de superficie de respuesta para obtener los valores de los componentes estudiados que magnifiquen total o localmente la variable deseada.

Es por ello que en este trabajo se realizaron superficies de respuesta para poder evaluar la actividad enzimática en el proceso de maceración. En este caso la combinación de los valores de pH, temperatura, fuerza iónica y concentración de buffer citrato fueron diseñados para cada experiencia mediante el uso del modelo estadístico de Doehlert [3].

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto que causan diferentes condiciones de operación (temperatura, concentración de buffer citrato, pH y fuerza iónica) sobre el proceso de maceración de albedo de pomelo, en cuanto a la cantidad y calidad de tejido macerado obtenido. Además se comparó el efecto que tiene el uso de la enzima cruda proveniente de un medio de cultivo con la enzima purificada.

## ***3.2. Materiales y métodos.***

### **3.2.1. Reactivos químicos.**

El ácido galacturónico (AGA) y el ácido poligalacturónico (PGA) se obtuvieron de Sigma Química Co., St. Louis, Mo. Los demás reactivos químicos fueron todos de grado analítico.

### **3.2.2. Obtención del sustrato.**

Las muestras de tejido se prepararon en el momento a partir de pomelo rosado comercial. Los frutos fueron adquiridos en el mercado local y fueron elegidos aquellos que presentaron una apariencia similar respecto a su maduración. Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera. Se pelaron los pomelos cuidando de separar el tejido glandular del albedo. Este último se cortó en cilindros de 4 mm de diámetro y 5 mm de longitud con sacabocados. Las muestras no utilizadas en los ensayos fueron descartadas debido a

que cambia su estado de hidratación cuando se las mantiene en heladera, aún en envases cerrados.

### 3.2.3. Fuente de enzima.

Se utilizó como fuente de enzima el sobrenadante del cultivo de *Geotrichum klebahnii* (ATCC 42397) según Cavalitto & Mignone [4]. El mismo fue procesado de dos maneras distintas.

Por una parte se concentró el sobrenadante por evaporación a presión reducida a 40 °C congelándose el producto concentrado hasta su uso. Este producto, llamado extracto crudo, fue utilizado para algunos de los ensayos de maceración.

Para todos los ensayos se utilizó una solución stock de PPasa-SE proveniente de un medio de cultivo crudo, cuya actividad enzimática y concentración de proteína fue de 3.500 U/ml y 5,1 mg/ml, respectivamente.

Por otro lado, la enzima purificada desde el extracto crudo por adsorción selectiva a filtros de fibra de vidrio fue suministrada por (Zapata Zapata, A. D., comunicación personal) La actividad de la enzima purificada fue de 570 U/ml. La actividad macerante de la enzima purificada fue comparada con la del extracto crudo.

### 3.2.4. Procedimiento de maceración.

A 2 gramos de tejido se le agregan 10 ml del buffer correspondiente y se agita en shaker recíprocante durante 1 h a la temperatura de trabajo, empleando una velocidad de 200 golpes/min. Posteriormente, se agregan 5 ml del mismo buffer con una concentración de enzima de 50 U/ml, generando un volumen final de trabajo de 15 ml por erlenmeyer. El agregado de la enzima se considera como el tiempo cero de la maceración. El proceso de maceración se llevó a cabo manteniendo las mismas condiciones de agitación y temperatura por el tiempo correspondiente en cada caso

El producto de maceración fue procesado tal cual se indica en la figura 11:

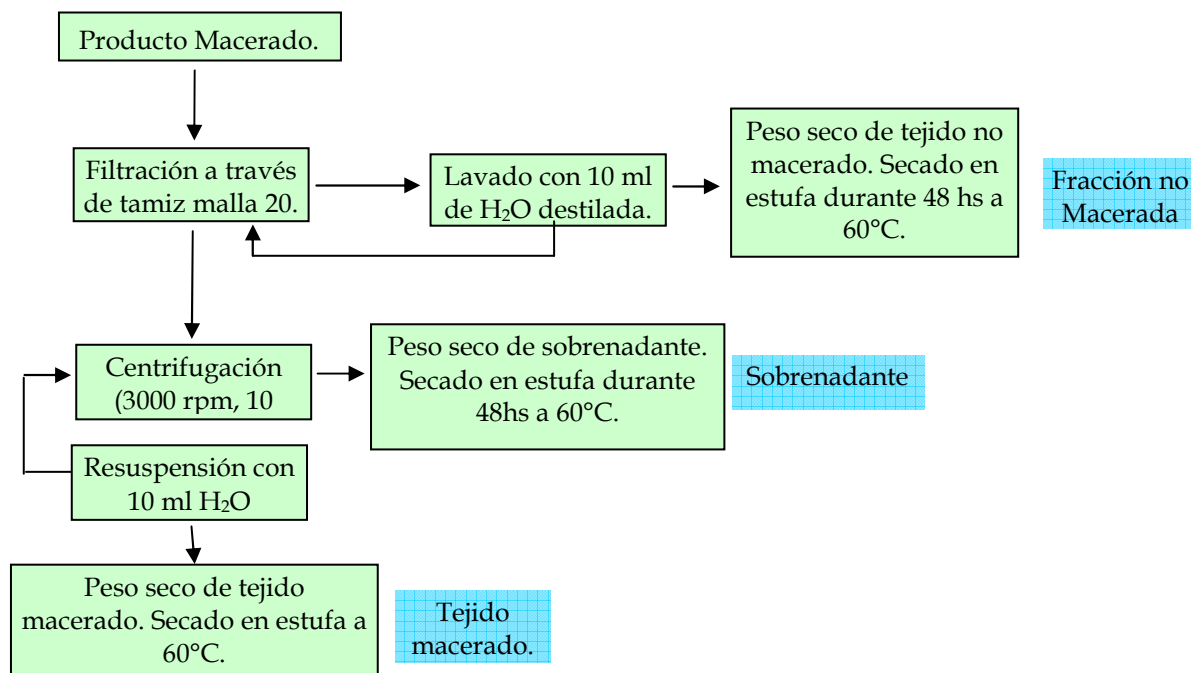


Fig. 11. Tratamiento posterior al proceso de maceración.

Los resultados se reportan como porcentaje de peso seco de cada fracción, con respecto al peso seco del tejido original.

### 3.2.5. Análisis estadístico.

Para conocer cuales son las condiciones óptimas en el proceso de maceración debieron ser estudiadas cuatro variables distintas, ellas son concentración de buffer citrato, pH, fuerza iónica (FI) y temperatura. Las mismas se estudiaron en bloque. En primera instancia, se evaluaron en conjunto temperatura, pH y concentración de buffer citrato. Una vez definida la temperatura de trabajo, se analizaron, por un lado, concentración de buffer citrato y pH y, por otro, fuerza iónica y pH.

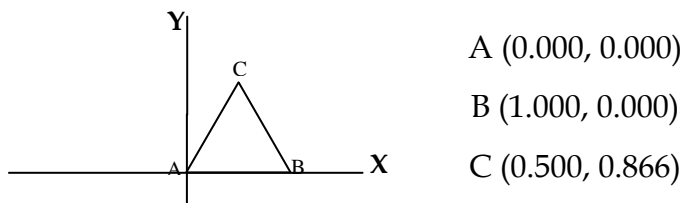
Para la realización de este método los valores que se le asignan a las variables se distribuyen uniformemente alrededor de un valor central, por ejemplo, en el caso de investigar dos variables se distribuyen alrededor de un hexágono y en el caso de estudiar tres variables se distribuyen en un cuboctaedro.

A diferencia de otros diseños de superficie de respuesta, el modelo de Doehlert tiene la ventaja que el universo muestral puede ser ampliado cambiando el centro del hexágono de un nuevo ensayo.

La geometría del universo muestral surge a partir de una figura generatriz que se mueve manteniendo un vértice fijo. En el caso de trabajar en dos dimensiones, la figura generatriz es un triángulo equilátero que se gira hasta formar un hexágono. En tres dimensiones, la figura generatriz es un tetraedro.

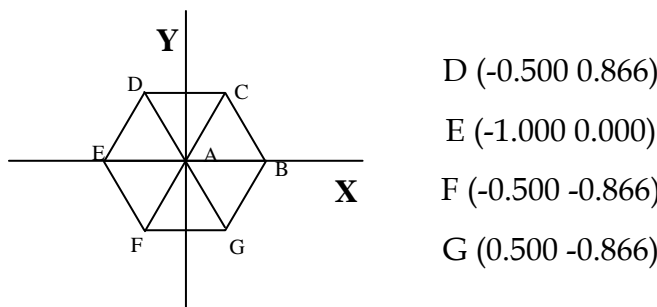
En el caso de trabajar en dos dimensiones, el universo posee ls siguientes puntos codificados para las variables  $x$  e  $y$ , se toma el triángulo equilátero ABC de lado unitario y se determina la posición de cada punto tomando arbitrariamente al punto A como  $x = 0, y = 0$ .

Teniendo en cuenta este valor, los extremos del triángulo quedan situados en



A fin de calcular las coordenadas del resto de los vértices de la figura característica del modelo (en este caso el hexágono) se aprovecha la propiedad de que cada punto surge de la sustracción de dos puntos cualesquiera de la figura generatriz (en este caso el triángulo ABC). Por ejemplo, el punto D resulta de  $C - B$ , E resulta de  $A - B$ , etc.

El resto de los extremos del hexágono se ubican en los siguientes puntos.



Este cálculo no resulta necesario en dos dimensiones ya que intuitivamente se puede determinar el valor de las coordenadas pero es muy práctico cuando el modelo se complica y se usan tres variable o más. En el caso de trabajar con tres variables los puntos experimentales se encuentran en los extremos de un cuboctaedro. Como se mencionó anteriormente, en este caso, la figura generatriz es un tetraedro de arista unitaria cuyos vértices se encuentran en (0,0,0), (1,0,0), (0.5, 0.866, 0), (0.5,0.289, 0.816).

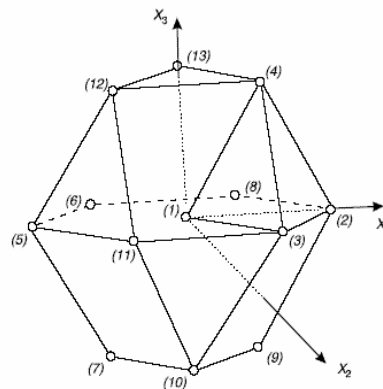


Fig. 12. Cuboctaedro.

En general, para **d** factores, la figura generatriz se arma agregando a la figura **d-1** el punto:

$$\left[ \frac{1}{2}, \frac{1}{2\sqrt{3}}, \frac{1}{2\sqrt{6}}, \dots, \frac{1}{\sqrt{2(d-1)(d-2)}}, \frac{1}{\sqrt{2d(d-1)}}, \frac{\sqrt{(d+1)}}{\sqrt{2d}} \right]$$

y completando los puntos anteriores con ceros para la nueva coordenada. En la tabla X se indica cuales son los valores codificados para más de dos variables independientes. Obsérvese que los valores codificados para el modelo de dos variables resulta de tomar los valores comprendidos a la izquierda y por encima de la primera línea divisoria (valores marcados en rojo) y sus opuestos. Para el modelo de tres variables se utilizan los valores comprendidos por la segunda línea divisoria (valores en azul agregados a los valores en rojo) y sus opuestos. Para cada nueva variable que se desee estudiar, se agrega un nuevo grupo de valores codificados a los ya utilizados (verde para una cuarta variable, etc.).

0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
1.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.50000	0.86602	0.00000	0.00000	0.00000
-0.50000	0.86602	0.00000	0.00000	0.00000
0.50000	0.28868	0.81650	0.00000	0.00000
-0.50000	0.28868	0.81650	0.00000	0.00000
0.00000	-0.57735	0.81650	0.00000	0.00000
0.50000	0.28868	0.20413	0.79067	0.00000
-0.50000	0.28868	0.20413	0.79067	0.00000
0.00000	-0.57735	0.20413	0.79067	0.00000
0.00000	0.00000	-0.61238	0.79067	0.00000
0.50000	0.28868	0.20413	0.15812	0.77460
-0.50000	0.28868	0.20413	0.15812	0.77460
0.00000	-0.57735	0.20413	0.15812	0.77460
0.00000	0.00000	-0.61238	0.15812	0.77460
0.00000	0.00000	0.00000	0.63246	0.77460

**Tabla X.** Tabla generatriz para el diseño de Doehlert.

Estos valores corresponden a las variables codificadas. A partir de ellos se calculan los valores reales de las variables  $x$ ,  $y$  y  $z$ . Para ello es necesario calcular la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de las variables codificadas y las reales,  $\Delta x_{cod}$ ,  $\Delta y_{cod}$ ,  $\Delta z_{cod}$ ,  $\Delta x_{real}$ ,  $\Delta y_{real}$ ,  $\Delta z_{real}$  según se estudien dos o tres variables. Con los valores codificados y los deltas anteriormente citados se determinan los valores reales de  $x$ ,  $y$  y  $z$  mediante las siguientes ecuaciones:

$$x_{real} = x_{codif} \times \frac{\Delta x_{real}}{\Delta x_{codif}} + x_0$$

$$y_{real} = y_{codif} \times \frac{\Delta y_{real}}{\Delta y_{codif}} + y_0$$

$$z_{real} = z_{codif} \times \frac{\Delta z_{real}}{\Delta z_{codif}} + z_0$$

donde  $x_0$ ,  $y_0$  y  $z_0$  son los valores de las variables  $x$ ,  $y$  y  $z$  en el punto central. El mismo tratamiento se sigue para las demás variables. Del punto central se

realiza un triplicado, el cual se utiliza para determinar la varianza propia del experimento. Junto con los valores centrales quedan en total 9 experimentos a realizar.

Una gran ventaja que posee este método es que si se desea aumentar el rango de estudio en alguna de las variables, simplemente se corre el punto central y se recalculan los nuevos valores de las variables  $x$ ,  $y$  y  $z$ . En el caso de estudiar tres variables el número de experimentos a realizar es 15 (12 puntas y 3 centrales).

Para dos factores, se estudian 3 valores del primero y 5 del segundo, si el estudio es de 3 variables, se estudian 3 valores de la primera, 5 de la segunda y 7 de la tercera.

Una vez realizada la experiencia y medida la variable dependiente (en nuestro caso porcentaje de tejido macerado) se determinan los coeficientes de un polinomio del tipo  $z = b_0 + b_1x + b_2y + b_3x^2 + b_4y^2 + b_5xy$ . Los coeficientes se determinan por el método de cuadrados mínimos. La forma más sencilla de manejar este número de datos es mediante el cálculo matricial.

Si se definen las siguientes matrices.

$$X = \begin{pmatrix} 1 & x_1 & y_1 & x_1^2 & y_1^2 & x_1y_1 \\ 1 & x_2 & y_2 & x_2^2 & y_2^2 & x_2y_2 \\ 1 & x_3 & y_3 & x_3^2 & y_3^2 & x_3y_3 \\ 1 & x_4 & y_4 & x_4^2 & y_4^2 & x_4y_4 \\ 1 & x_5 & y_5 & x_5^2 & y_5^2 & x_5y_5 \\ 1 & x_6 & y_6 & x_6^2 & y_6^2 & x_6y_6 \\ 1 & x_7 & y_7 & x_7^2 & y_7^2 & x_7y_7 \\ 1 & x_8 & y_8 & x_8^2 & y_8^2 & x_8y_8 \\ 1 & x_9 & y_9 & x_9^2 & y_9^2 & x_9y_9 \end{pmatrix} \quad B = \begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \\ b_5 \end{pmatrix} \quad Z = \begin{pmatrix} z_1 \\ z_2 \\ z_3 \\ z_4 \\ z_5 \\ z_6 \\ z_7 \\ z_8 \\ z_9 \end{pmatrix}$$

donde los  $x_i$  e  $y_i$  son los valores codificados de  $x$  e  $y$  para cada experiencia,  $B$  es el vector de los coeficientes a determinar e  $Y$  es el vector de los resultados experimentales de cada ensayo, se observa que  $X.B = Y$ . Este es un sistema de ecuaciones redundantes, con más ecuaciones que incógnitas, así que no puede despejarse directamente  $B$  del producto anterior. Para resolverse este sistema se



debe obtener la matriz pseudo inversa de  $X$  a partir de  $(X^T X)^{-1} X^T$  donde  $X^T$  es la matriz transpuesta de  $X$ .

Como hay más ecuaciones que incógnitas los valores obtenidos para los parámetros son estimadores que minimizan la distancia entre las variables reales y las obtenidas. Realizando el análisis de varianza de los resultados obtenidos para cada parámetro del polinomio se decide cuales de ellos son significativos y cuales no. Con aquellos que son significativos se vuelven a calcular los parámetros del polinomio y con ellos puede realizarse el gráfico de la superficie de respuesta o bien calcular en forma analítica la existencia de máximos o mínimos en la zona del estudio.

### ***3.3. Resultados y discusión.***

#### **3.3.1. Efecto del tiempo en el proceso de maceración.**

Condiciones iniciales de trabajo.

Velocidad de agitación: En trabajos previos realizados en papa [5] y limón (Zapata Zapata, comunicación personal) y zanahoria [2] se encontró que con una velocidad de 200 golpes por minuto se obtiene el máximo de maceración independientemente del resto de las condiciones por lo que se eligió esta velocidad para los ensayos en pomelo.

Buffer: Trabajando con albedo de limón se vio que con buffer citrato se mejora la capacidad macerante de la enzima respecto a otros buffers (Acético/acetato de sodio) (Zapata Zapata A. D., comunicación personal). La diferencia encontrada entre el buffer acetato y el buffer citrato en relación al proceso de maceración es que este último, al ser un agente quelante, es capaz de capturar los iones  $Ca^{+2}$  presentes en la estructura de la protopectina dejando la molécula menos rígida, es decir, más accesible para la enzima. El citrato permite además, por ser un ácido poliprótico, trabajar en un mayor rango de pH.

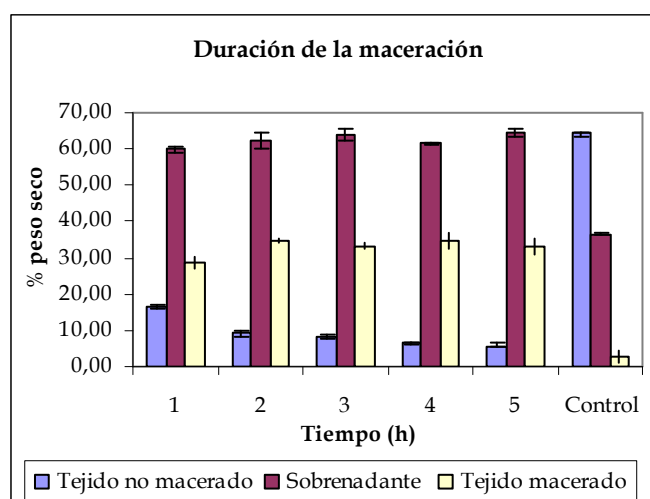
Concentración de enzima: Se utilizó la misma concentración de enzima que en los ensayos con limón. En esos ensayos se vio que por encima de 50 U en

la mezcla de reacción no se observa un incremento en el porcentaje de tejido macerado.

Las variables estudiadas en el proceso de maceración de albedo de pomelo fueron pH, fuerza iónica (FI), concentración de buffer citrato y temperatura. Estudios previos sobre maceración de albedo de limón proponen como condiciones de trabajo concentración de buffer citrato 10mM, pH 5 y temperatura de trabajo constante a 37°C.

Partiendo de estas condiciones, se estudió en primera instancia la variable tiempo de maceración y para ello se tomaron muestras duplicadas del proceso cada hora, por el lapso de cinco horas.

En la siguiente figura se observan los resultados obtenidos en el ensayo.



**Fig. 13.** Evaluación del tiempo en el proceso de maceración a 37°C.

En la figura 13 se observa que el mayor porcentaje de tejido macerado es de 35% y ocurre luego de las dos horas de proceso. En las siguientes tres horas ese porcentaje se mantuvo casi constante. El control sin enzima realizado muestra además que el efecto de la maceración es causado principalmente por la enzima y no por efectos mecánicos (shear).

Si bien a las dos horas de proceso se obtiene el máximo porcentaje de tejido macerado se utilizó un tiempo de tres horas para los siguientes ensayos

ya que se utilizó, salvo que se indique, el protocolo de trabajo usado previamente para limón (Zapata Zapata A. D., comunicación personal).

### 3.3.2. Análisis del proceso de maceración por medio de superficies de respuesta.

Primeramente se analizó el efecto conjunto de temperatura, pH y concentración de buffer citrato. Las condiciones centrales elegidas para este estudio fueron: buffer citrato 25mM, pH 4.5 a 37 °C. Se utilizó una variación de concentración, pH y temperatura de 40mM, 3 unidades y 14 °C respectivamente. En base a estos valores y los valores codificados se calcularon los valores reales de las tres variables (Tabla XI) mediante la expresión descrita en materiales y métodos. En la tabla también se observan el % de tejido macerado obtenidos en cada ensayo

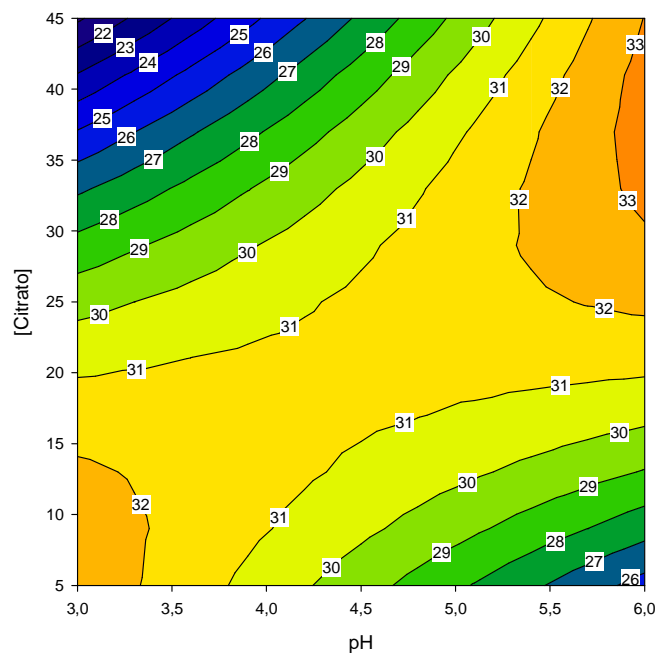
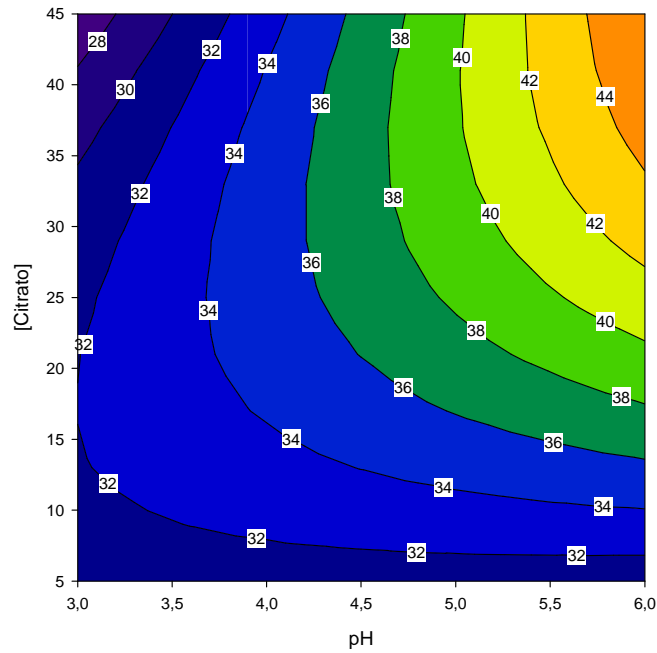
**Tabla XI.** Valores reales para las tres variables pH, temperatura, concentración de buffer citrato y valores experimentales de tejido macerado.

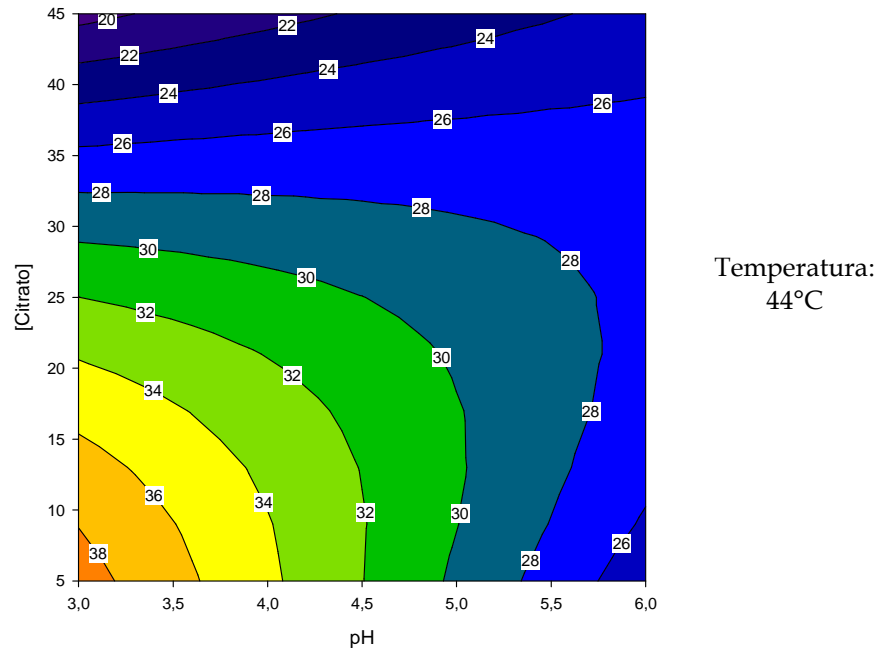
Ensayo	pH	Conc. buffer citrato (mM)	Temperatura	% de tejido macerado
1	3.75	18.33	30	32
2	4.5	38.33	30	38
3	5.25	18.33	30	38
4	3	25	37	31
5	3.75	5	37	31
6	3.75	45	37	23
7*	4.5	25	37	30
8*	4.5	25	37	32
9*	4.5	25	37	32
10	5.25	45	37	30
11	5.25	5	37	28
12	6	25	37	31
13	3.75	31.67	44	28
14	4.5	11.67	44	31
15	5.25	31.67	44	29

\* Valor central por triplicado.

El polinomio resultante del diseño estadístico aplicado es el siguiente:

$$\text{Tejido Macerado} = 31.19 - 4.09 \cdot T + 1.28 \cdot \text{pH} - 1.28 \cdot [\text{Cit.}] + 3.27 \cdot T^2 - 4.31 \cdot T \cdot \text{pH} - 5.38 \cdot T \cdot [\text{Cit.}] - 0.26 \cdot \text{pH}^2 + 5.56 \cdot \text{pH} \cdot [\text{Cit.}] - 3.85 \cdot [\text{Cit.}]^2$$





**Fig. 14.** Superficies de respuesta correspondientes a tres temperaturas distintas 44°C, 37°C y 30°C.

A partir de este polinomio se calculó la actividad resultante para tres valores de temperatura 30°C, 37°C y 44°C, y con estos valores se realizaron los gráficos de maceración en función del pH y la concentración de buffer citrato (Fig. 14).

El valor denominado lack of fit o falta de ajuste indica si el modelo de estudio seleccionado es el adecuado para describir el comportamiento de las muestras ensayadas o si es necesario un modelo más complejo para el análisis de los datos. Un valor de P mayor o igual a 0.05 para este parámetro indica que el lack of fit no es estadísticamente significativo lo que indica que el modelo aplicado es adecuado para el análisis de los datos con un nivel de confianza del 95%. El valor de P obtenido para el lack of fit para este diseño fue 0.278, indicando que el análisis de los datos es adecuado para este modelo. El  $R^2$  obtenido para este ensayo fue 0.89 lo que indica que el modelo fue capaz de explicar más del 89% de las respuestas observadas [6].

El análisis estadístico de residuos de Durbin-Watson (DW) determina si existe una correlación significativa basada en el orden en el cual aparecen los datos. Si el valor de DW es mayor a 1.4 es probable que no exista una autocorrelación significativa en los residuos. En este caso el valor arrojado por el modelo es 1.97 por lo que se puede asegurar que no existe una autocorrelación significativa.

A continuación se muestra la comparación entre los valores reales y los ajustados por el diseño estadístico (Tabla XII).

**Tabla XII.** Comparación entre valores observados y valores ajustados por el diseño.

Ensayo	Valor experimental	Valor ajustado
1	32.08	33.82
2	38.44	37.22
3	37.53	37.01
4	31.09	29.65
5	31.41	31.11
6	23.16	24.08
7*	29.62	31.19
8*	32.20	31.19
9*	31.74	31.19
10	28.49	27.57
11	29.87	30.17
12	30.77	32.21
13	27.80	28.32
14	30.79	32.01
15	29.43	27.69

\* Valor central por triplicado.

En la tabla se observa que existe una buena correlación entre el valor real y el valor estimado por el polinomio. Teniendo en cuenta esto, y los parámetros anteriormente detallados obtenidos mediante el diseño estadístico se demuestra que el modelo utilizado representa de manera satisfactoria al comportamiento de la enzima en la condición ensayada.

Se observa en la figura 14 que la tendencia de las superficies varía con la temperatura, ya que a 44°C la superficie marca el aumento del porcentaje de macerado a medida que el pH y la concentración de buffer citrato disminuyen, en cambio a 30°C ocurre a la inversa, se observa un aumento del mismo a medida que el pH y la concentración del buffer citrato aumentan; y a 37°C lo que se observa es una situación intermedia tipo silla de montar con máximos a valores altos y bajos de pH y concentración de buffer citrato y un mínimo en la condición central, además de una tendencia de máximo hacia el lateral en donde el pH y la concentración de buffer citrato aumentan. Sin embargo, se observa que a 30°C el porcentaje máximo de tejido macerado es mayor que a 37°C y a 44°C, ya que alcanza un valor de 44 en las curvas de nivel, en cambio los máximos encontrados para 37°C y 44°C se corresponden con 33 y 38 en las curvas de nivel, respectivamente. Debido a esto, se eligió una temperatura de trabajo de 30°C para continuar con los ensayos subsiguientes de búsqueda de las mejores condiciones de pH y concentración de buffer citrato para el proceso de maceración.

**Tabla XIII.** Valores reales para dos variables pH y concentración de buffer citrato y valores experimentales de % de tejido macerado.

Ensayo	pH	Conc. Buffer citrato(mM)	% de tejido macerado
1	3.00	25.00	34
2	3.75	5.00	34
3	3.75	45.00	41
4	4.50	25.00	38
5	4.50	25.00	41
6	4.50	25.00	39
7	5.25	5.00	36
8	5.25	45.00	41
9	6.00	25.00	40

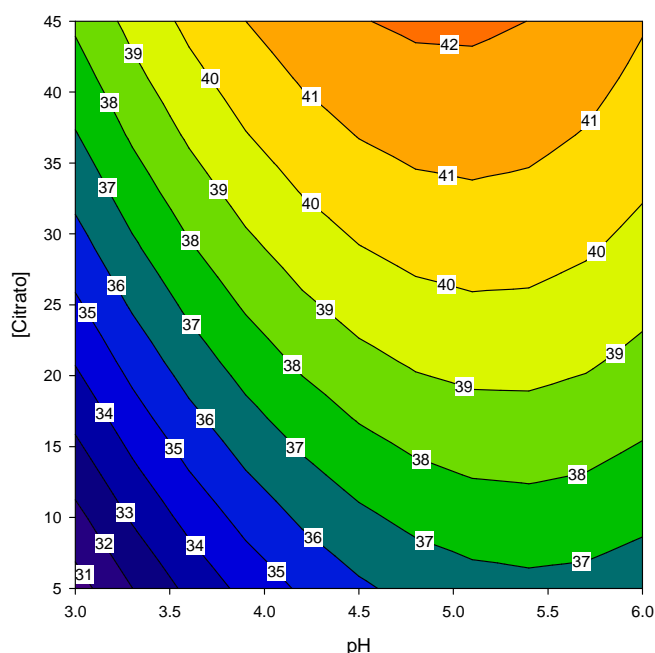
En este caso el universo muestral se centró en: concentración de buffer citrato 25mM y pH 4.50. Se utilizó una variación de concentración de buffer y pH de 40mM y 3 unidades, respectivamente.

Los valores reales correspondientes a la concentración de citrato y el pH, junto con el % de tejido macerado obtenido se observan en la siguiente tabla. La temperatura de trabajo se mantuvo constante a 30°C.

El polinomio resultante del diseño estadístico aplicado es el siguiente:

$$\text{Tejido Macerado} = 39.37 + 2.19 \cdot \text{pH} + 3.53 \cdot [\text{Cit.}] - 2.33 \cdot \text{pH}^2 - 0.63 \cdot \text{pH} \cdot [\text{Cit.}] - 0.85 \cdot [\text{Cit.}]^2$$

En base a este polinomio se realizó la superficie de respuesta correspondiente a la maceración en función del pH y la concentración de buffer citrato (Fig. 15).



**Fig. 15.** Superficie de respuesta correspondiente al ensayo de maceración a 30°C.

El valor de P obtenido para el lack of fit en esta maceración fue 0.387, el R<sup>2</sup> fue 0.86 y de DW fue 2.91.

En la siguiente tabla se muestra la comparación entre los valores reales y los ajustados por el diseño estadístico.



**Tabla XIV.** Comparación entre valores observados y valores ajustados por el diseño.

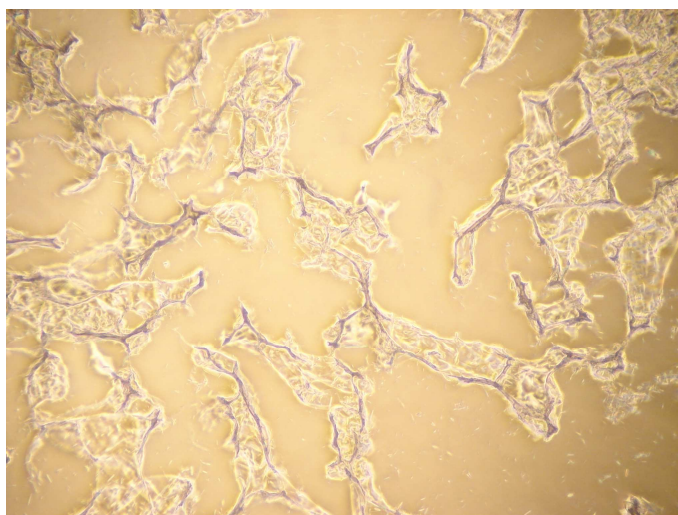
Ensayo	Valor experimental	Valor ajustado
1	39.98	39.23
2	41.29	42.04
3	41.14	40.39
4	34.09	34.84
5	34.46	33.72
6	35.72	36.46
7	37.71	39.37
8	41.04	39.37
9	39.36	39.37

En la tabla se observa que existe una buena correlación entre el valor real y el valor estimado por el polinomio. Teniendo en cuenta esto, y los parámetros anteriormente detallados que arrojó el modelo estadístico se observa que el modelo utilizado representa en forma satisfactoria al comportamiento de la enzima en la condición ensayada.

En la superficie de respuesta obtenida se observa que a concentraciones de buffer citrato en aumento y pHs entre 4.5 y 5.5 se observa un porcentaje máximo de tejido macerado que alcanza un valor de 42 en las curvas de nivel. Las diferencias encontradas entre los máximos porcentajes de tejido macerado obtenidos en este ensayo y el anterior realizado a 30°C en donde se evaluaron las tres variables juntas, con valores de 42 y 44 en las curvas de nivel respectivamente, se consideran despreciables ya que se trata de una experiencia realizada con un tejido vegetal que esta sujeto a modificaciones naturales imposibles de estandarizar.

A pesar de obtener un porcentaje máximo de tejido macerado a un pH de 5.5, se eligieron como condiciones de trabajo para la maceración de albedo de pomelo: concentración de buffer citrato 45mM y pH 3.5. Se eligió de ésta manera ya que la diferencia en el porcentaje de tejido macerado es muy pequeña disminuyendo a 3.5 el pH y manteniendo constante la concentración

de buffer citrato; y además pensando en su posible aplicación a nivel industrial es aconsejable trabajar a pHs lo más bajos posibles dado que de esta forma se minimiza considerablemente el riesgo de contaminación microbiana. En la figura 16 se observan las células libres obtenidas en las muestras de tejido macerado bajo las condiciones anteriormente detalladas.



**Fig. 16.** Muestra de tejido macerado utilizando como variables concentración de buffer citrato y pH.

### 3.3.3. Estudio del efecto de la FI y el pH sobre el proceso de maceración.

El objetivo del ensayo anteriormente detallado fue estudiar el efecto que causan las variables pH y concentración de buffer citrato en el proceso de maceración. Si bien los pares de puntos (C; D), (A; B; E) y (F; G) correspondientes del hexágono (Fig. 17) poseen igual concentración analítica de buffer citrato, no poseen igual FI ya que en cada caso, al llevar al pH correspondiente, se gasta diferente volumen de solución de NaOH 10M. Esta diferencia genera una ambigüedad en los resultados ya que las diferencias encontradas en la maceración pueden deberse a la variación de pH o a la FI.

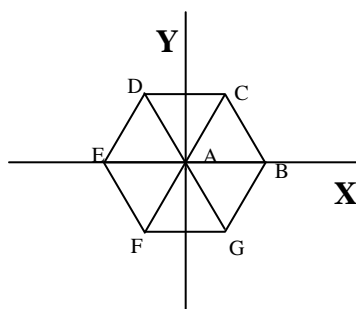


Fig. 17. Hexágono de Doehlert

Para verificar cual es la variable real se decidió trabajar a concentración analítica constante (50 mM) de buffer citrato para todos los puntos del hexágono y FI constante para cada uno de los tres niveles del eje de ordenadas (valores codificados -0.866, 0 y 0.866). Para tal fin se calculó mediante la ecuación de Debye-Huckel y balances de materia y electroneutralidad la FI real de las soluciones buffer de cada punto y se agregó a cada una de ellas un volumen de solución 5M de NaCl tal que los puntos (C; D), (A; B; E) y (F; G) posean iguales valores de FI (se repite la figura del hexágono de Doehlert como guía de los puntos utilizados). En la tabla XV se observan los valores de FI para cada uno de los puntos del hexágono en ambos experimentos.

**Tabla XV.** Valores de FI de cada uno de los puntos del hexágono para las variables: concentración de buffer citrato y fuerza iónica.

Condiciones constantes	Variable fuerza iónica		Variable citrato		
	pH	(Cítrico 50mM cte.)	(Cítrico 50mM cte.)	[Cítrico] (mM)	
Puntos		FI (mM) alcanzada*	FI (mM)**1	FI (mM) alcanzada*	[Cítrico] (mM)
A	4.50	57.00	200	29.60	25
B	6.00	104.58	200	54.14	25
C	5.25	72.40	250	64.00	45
D	3.75	39.83	250	35.00	45
E	3.00	20.20	200	10.28	25
F	3.75	40.08	150	20.11	5
G	5.25	69.96	150	46.35	5

\*FI alcanzada con el agregado solamente de NaOH, para ambas variables.

\*\*FI final luego del agregado de NaOH y NaCl.

En este estudio, las condiciones centrales fueron: FI 200 mM y pH 4.50 y se utilizó una variación de FI y pH de 100 mM y 3 unidades respectivamente.

Los valores reales correspondientes a FI y pH calculados mediante la expresión descrita en materiales y métodos se observan en la siguiente tabla. La temperatura de trabajo se mantuvo constante a 30°C.

**Tabla XVI.** Valores reales para dos variables pH y concentración de buffer citrato.

Ensayo	pH	FI (mM)	% de tejido macerado
1	3.00	200	32
2	3.75	150	27
3	3.75	250	22
4	4.50	200	25
5	4.50	200	28
6	4.50	200	27
7	5.25	150	26
8	5.25	250	29
9	6.00	200	29

El polinomio resultante del diseño estadístico aplicado es el siguiente:

$$\text{Tejido Macerado} = 26.65 - 0.02 * pH - 0.68 * FI + 3.63 * pH^2 + 4.54 * pH * FI - 2.01 * FI^2$$

En base a este polinomio se realizó la superficie de respuesta correspondiente a la maceración en función del pH y FI (Fig. 18).

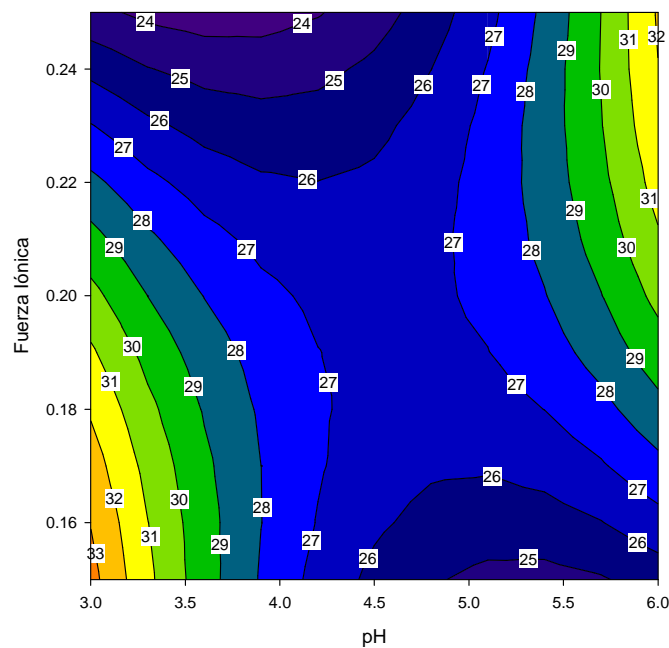
El valor de P obtenido para el lack of fit en esta maceración fue 0.117, el R<sup>2</sup> fue 0.64 y el DW fue 3.62.

En la siguiente tabla se muestra la comparación entre los valores reales y los ajustados por el diseño estadístico.

**Tabla XVII.** Comparación entre valores observados y valores ajustados por el diseño.

Ensayo	Valor experimental	Valor ajustado
1	28.52	30.27
2	29.18	27.42
3	21.76	23.51
4	32.06	30.31
5	26.87	28.63
6	26.43	24.68
7	25.02	26.66
8	28.24	26.66
9	26.72	26.66

En la tabla se observa que existe una buena correlación entre el valor real y el valor estimado por el polinomio. El valor correspondiente al  $R^2$  fue en este caso el más bajo de los encontrados en todos los experimentos de maceración a pesar de que la experiencia se repitió varias veces. Es por ello que con este análisis de datos sólo se pudo observar la tendencia que adopta el proceso de maceración en las condiciones experimentales ensayadas.



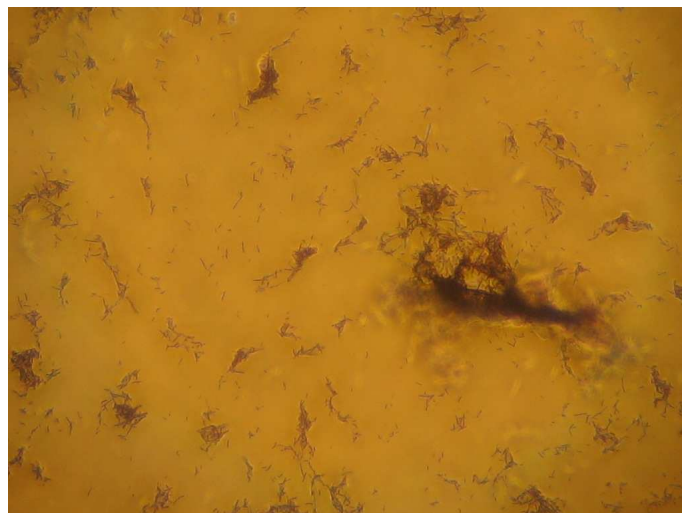
**Fig. 18.** Superficie de respuesta correspondiente al ensayo de maceración a 30°C.

La superficie de respuesta obtenida (Fig. 18) muestra una figura tipo silla de montar en la cual la tendencia hacia los máximos se encontró a valores altos y bajos de pH y FI y también se observa un mínimo en la condición central de la superficie.

El máximo porcentaje de tejido macerado para la variable FI alcanzado en las curvas de nivel fue 32, mientras que para la variable concentración de buffer citrato el máximo alcanzado en las curvas de nivel fue 42. Además de observarse que en la condición ensayada hubo un gran porcentaje de células rotas (Fig. 19).

La disminución en el porcentaje de tejido macerado obtenido para la variable FI puede deberse a la elevada fuerza iónica de las distintas soluciones buffers, que sistemáticamente fueron mayores que las correspondientes a la variable concentración de citrato, como se indica en la (Tabla XV)

La elevada concentración salina puede provocar un efecto hipotónico con en la célula, que sumado al shear al cual se la expone y a la acción macerante de la enzima hace que la misma estalle dando como resultado una menor fracción de tejido macerado y una mayor fracción en el sobrenadante.



**Fig. 19.** Muestra de tejido macerado utilizando como variables fuerza iónica y pH.

### 3.3.4. Comparación del uso de la enzima purificada o el extracto crudo para el proceso de maceración.

El objetivo de este ensayo fue determinar si existe alguna variación en el proceso de maceración y sobre todo en la fracción de tejido macerado obtenido al utilizar la enzima purificada o el extracto crudo de la enzima. El extracto crudo posee una mezcla de enzima y sales provenientes del medio de cultivo que podrían interferir en el proceso de maceración. En cambio, la enzima purificada se encuentra libre de esas sales, es decir, libre de posibles interferentes.

Para ello, se trabajó en las condiciones óptimas obtenidas en el apartado 3.3.2. Ellas son: concentración de buffer citrato 45 mM, pH 3.5 y 30°C. Concentración de enzima (extracto crudo o pura) y agitación no fueron modificados.

En la figura 20 se observan los resultados obtenidos para este ensayo.

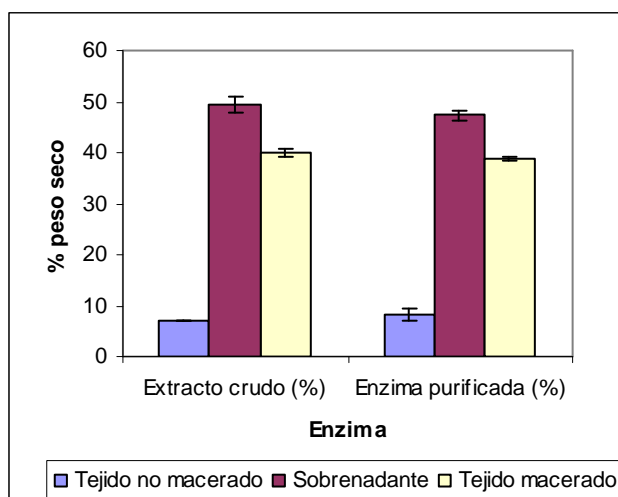


Fig. 20. Comparación del proceso de maceración al utilizar extracto crudo de enzima o enzima purificada.

El gráfico muestra un comportamiento similar para ambas condiciones en el proceso de maceración. Sin embargo, al observarse una mayor fracción de tejido macerado utilizando el extracto crudo de la enzima y dado que el proceso

de purificación de la misma implica un trabajo (y un tiempo) adicional, se decidió trabajar con el extracto crudo ya que a lo largo de la experiencia realizada en este trabajo se tuvo como objetivo poder aplicar este proceso a escala industrial en donde se prefieren los procesos más simples, rápidos y baratos siempre y cuando los resultados obtenidos sean los mismos.



### **3.4. Bibliografía.**

[1] Biekman ES. Enzymatic maceration of potatoes for the production of instant dried mashed potato: modelling of the desintegration process. *Food Biotechnology* 1992;6:19-33.

[2] Nakamura T, Hours RA, Sakai T. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science* 1995;60:468-472.

[3] Doehlert DH. Uniform shell designs. *Applied Statistics* 1970;231-239.

[4] Cavalitto SF and Mignone CF. Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Process Biochemistry* 2007;42:175-179.

[5] Carné M, Cavalitto SF, Hours RA. Maceracion de papa con protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii*. 2008;873-880.

[6] Taragano VM and Pilosof A. Application of Doehlert designs for water activity pH and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 1999;25:411-419.

## Capítulo IV

**Estudio de la liberación de azúcares, flavonoides y pectina durante la maceración de albedo de pomelo.****4.1. Introducción.**

Se sabe que *Geotrichum klebahnii* (*G.k*) posee un pool pobre de enzimas hidrolíticas extracelulares, y que sólo se ha reportado la presencia de PPasa-SE [1] la cual a sido caracterizada. Glanser y Ban [2] reportan la capacidad de degradar lignina de maíz y Pou y col [3] reportan el crecimiento de *G.k* sobre lignina extraída de caña de azúcar. Sin embargo, en medio líquido, sólo se detecta la expresión de una única proteína (PPasa-SE) [1].

A pesar de generar una enzima liberadora de pectina, *G.k* no puede crecer sobre pectina, pectatos u oligogalacturonatos. Esta característica es muy común en levaduras [4] [5] [6] [7]. A diferencia de este comportamiento, los hongos suelen tener pools enzimáticos bastante ricos, los cuales incluyen endo y exopoligalacturonasas, pectín y pectato liasas y pectinesterasas [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14]. Esta colección de enzimas les permite crecer sobre materiales pécticos más frecuentemente que a las levaduras [8] [9] [10] [15] [16].

Este comportamiento indicaría que *G.k* no utiliza a la enzima para poder consumir pectinas de los frutos sino como una forma de invadir el tejido vegetal a fin de acceder a los azucars solubles que posee. Hasta donde se conoce, estas enzimas están involucradas en la colonización de frutas causando la ruptura tisular con la concomitante liberación de azucars del tejido vegetal, las que pueden ser aprovechadas para el crecimiento de la levadura [17].

Es por ello que resulta interesante estudiar la composición principal de azúcares liberados a través del proceso de maceración, ya que estas sustancias son la fuente de carbono y energía que utilizaría *G.k* para crecer al invadir un tejido vegetal, en nuestro trabajo, el pomelo. Para ello, el método de medida elegido fue cromatografía líquida de alta eficiencia en fase normal, utilizando un detector de índice de refracción que, si bien es muy poco sensible, al ser

capaz de reconocer sustancias en muy alta concentración resulta adecuado para efectuar este análisis.

Está ampliamente aceptado que las frutas y los vegetales aportan muchas sustancias beneficiosas para la salud. En particular, se sabe que el consumo de frutas contribuye a disminuir la mortalidad por afecciones cardiovasculares y otras enfermedades. En el Health Professionals Follow-up Study se pudo demostrar que los cítricos juegan un rol muy importante disminuyendo el riesgo de padecer un shock isquémico. Esta propiedad positiva es atribuida a algunos antioxidantes naturales contenidos en los mismos [18]. Ting Wu *y col* [19] reportan que el albedo de pomelo contiene tres compuestos bioactivos naringina, hesperidina y ácido ascórbico. El alto nivel de naringina encontrado en este fruto lo convierte en una importante fuente de ese antioxidante [20] [21] [19] [22]. Resulta de gran interés el estudio de los mismos debido a que poseen propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antimutagénicas, antivirales y posee efectos antimetastásicos [20].

Existen varios métodos para analizar a este tipo de compuestos tales como espectrometría de absorción UV-visible, cromatografía líquida de alta eficiencia y electroforesis capilar utilizando como detectores el UV-visible o el electroquímico [20]. En este trabajo se realizó cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa y se utilizó un detector UV-visible dado que las propiedades químicas de los compuestos permiten detectarlos y cuantificarlos proporcionando una sensibilidad adecuada [21].

Otra de las sustancias presentes en el albedo de pomelo es la pectina. En el proceso de maceración al utilizar una PPasa que hidroliza la protopectina es posible: por un lado separar las células y conservar sus componentes dentro de ella (esto constituye en el principal objetivo del trabajo) y por otro lado se logra extraer una cantidad importante de pectina soluble y separarla del tejido macerado. Es por ello que a través de un método colorimétrico, en particular el método de Blumenkrantz, se cuantifica la pectina extraída en el proceso de maceración.

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Reactivos químicos.**

El ácido galacturónico (AGA) y el metahidroxidifenilo (mhdf) se obtuvieron de Sigma Química Co., St. Louis, Mo. Los patrones utilizados para las determinaciones cromatográficas fueron de grado HPLC. Los demás reactivos químicos fueron todos de grado analítico.

### **4.2.2. Determinación de pectina.**

Se realizó la determinación de pectina en el sobrenadante, de cada muestra proveniente de un ensayo de maceración.

Se utilizó el método de Blumenkrantz basado en la reacción de los ácidos urónicos con metahidroxidifenilo (mhdf) en medio ácido fuerte [23] utilizando ácido galacturónico (AGA) como estándar.

Los reactivos utilizados son:

Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / tetraborato: 1.2676 g de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> disueltos en 500 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Concentrado. La solución debe ser almacenada bajo refrigeración.

Solución de m-hidroxidifenilo: mhdf 0.15 % p/v en NaOH al 0.5 %. Debe ser almacenada en recipientes color caramelo con papel aluminio y mantenido a 4 grados centígrados. La solución se puede emplear por un mes.

Protocolo:

Se colocan 200 µL de muestra (que contengan 5 - 75 µg de ácidos urónicos) en tubos de ensayo de vidrio borosilicato y se dejan en un baño de agua con hielo por 5 minutos. Se adicionan 1200 µL de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/tetraborato y se agita vigorosamente en vortex. Se calientan los tubos a ebullición durante 5 minutos y se enfrían por 5 minutos en baño de agua hielo. Se agregan 35 µL de solución m-hidroxidifenilo y se mezcla vigorosamente en vortex. Se deja desarrollar color durante 20 minutos a temperatura ambiente y se mide a 520 nm. Para las determinaciones se utiliza un blanco de reactivo que se prepara con 200 µL de agua en lugar de 200 µL de muestra.

La curva patrón se realiza con soluciones de AGA desde 25 ppm hasta

150 ppm, y se trata de igual manera que las muestras.

#### **4.2.3. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).**

##### Pretratamiento de muestras.

Las muestras correspondientes al tejido macerado fueron tratadas de la siguiente manera: se agregaron iguales volúmenes de etanol y suspensión de tejido macerado, se agitaron mediante vortex (asegurando la destrucción total de la célula y por consiguiente la liberación de los flavonoides) para lograr la desproteinización de la muestra y se centrifugaron a 4°C. El sobrenadante fue separado del pellet y conservado en frío hasta la determinación. Previo al momento de inyección las muestras correspondientes al tejido macerado y el sobrenadante fueron filtradas por membranas de acetato de celulosa de 0.22 µm de poro y 47 mm de diámetro.

##### **4.2.3.1. Determinación cuantitativa de azúcares.**

En el tejido vegetal se encuentran presentes no sólo los heteropolisacáridos como la pectina, sino también varios azúcares, principalmente glucosa, sacarosa y fructosa. Dichos azúcares fueron cuantificados cromatográficamente. Se utilizó un equipo de HPLC compuesto por un detector de Índice de Refracción (IR) 2414 Waters, una columna Shodex modelo SC1011 de 4.6mm x 150 mm y una bomba Binaria Waters 2996. Se utilizó agua bidestilada como fase móvil con un caudal de trabajo de 0,8 ml/min. Durante el análisis la temperatura de la columna fue de 80°C y la temperatura del detector fue de 45°C. Los solventes utilizados fueron filtrados por membrana de acetato de celulosa (0.45 µm de poro y 47 mm de diámetro) y desgasificado mediante agitación en vacío. Para la identificación de cada uno de los picos se utilizaron patrones. El volumen inyectado en cada determinación fue de 20 µl y el tiempo total de análisis fue de 18 minutos.

#### 4.2.3.2. Determinación cuantitativa de naringina.

Dado que la naringina es el flavonoide mayoritario en el pomelo [21] se realizó la cuantificación cromatográfica de la misma en dos de las fracciones del proceso de maceración de albedo de pomelo, sobrenadante y tejido macerado. Para ello se utilizó un equipo de HPLC compuesto de: un detector de Arreglo de Fotodiodos Waters 2996, Auto inyector Waters 717 plus, Bomba Binaria Waters 2996, Columna Symmetry C18 3.9 mm x 150 mm. Se utilizó una mezcla acetonitrilo (ACN)/agua (68/32 v/v) como fase móvil a un caudal de 1 ml/min. Durante el análisis la temperatura de la columna del detector fue de 25°C. Para la identificación del pico se utilizó como patrón naringina Sigma de 90% de pureza. Los solventes utilizados fueron filtrados por membrana de nylon (0.45 µm de poro y 47 mm de diámetro) y desgasificado mediante agitación en vacío. El volumen inyectado en cada determinación fue de 10 µl. y el tiempo de análisis fue de 10 minutos.

### 4.3. Resultados y discusión.

#### 4.3.1. Determinación de pectina.

Se determinó la pectina presente en las muestras de sobrenadante provenientes de procesos de maceración según Blumenkrantz. Para ello, se utilizaron muestras de sobrenadante (S) correspondientes a un ensayo de maceración en el cual se evaluaron tres condiciones de proceso distintas (las muestras se analizaron por duplicado). Las condiciones ensayadas se detallan a continuación:

**Tabla XVIII.** Nomenclatura y condiciones de ensayadas para la determinación de pectina.

Condición	Fuerza buffer citrato (mM)	pH
S1	200	5.5
S2	45	3.75
S3	10	4.8

La muestra S1 coincide con una condición de maceración ensayada en

3.3.3. y la muestra S2 es la mejor condición de maceración encontrada para pomelo 3.3.2. Las condiciones de la muestra S3 se escogieron porque son las reportadas como óptimas para la maceración de limón (Zapata Zapata A. D., comunicación personal). Se estudiaron diferentes condiciones de maceración para determinar si existe alguna relación entre la liberación de pectina y las condiciones ensayadas.

**Tabla XIX.** Determinación de pectina en el sobrenadante de los procesos de maceración (como AGA).

Muestra	Concentración pectina (ppm)
1S	3535 ± 265
2S	3348 ± 28
3S	3266 ± 282

Si bien los resultados obtenidos en la determinación de pectina son distintos entre si, ésta diferencia no es significativa debido a que es menor que la variación encontrada para el método. Puede suponerse, en base a estos resultados, que a pesar de que estas muestras fueron sometidas a distintas condiciones en el proceso de maceración, la liberación de pectina no es afectada de forma significativa.

#### 4.3.2. Cuantificación de azúcares.

Se realizó una cromatografía líquida de alta eficiencia para determinar de manera cualitativa y cuantitativa la presencia de azúcares como glucosa, sacarosa y fructosa en muestras de tejido macerado y de sobrenadante proveniente de la maceración realizada en la siguiente condición: concentración de buffer citrato 45mM, pH 3,5 y 30°C.

**Tabla XX.** Determinación cuantitativa de azúcares en muestras de tejido macerado y sobrenadante.

Muestra	Sacarosa (g/L)	Fructosa (g/L)
Sobrenadante	6.31 ± 1.02	2.15 ± 0.42
Tejido Macerado	6.53 ± 0.73	3.25 ± 0.35

Se determinó, tanto en el tejido macerado como en el sobrenadante, la presencia de glucosa, fructosa y sacarosa. La glucosa no pudo ser determinada cuantitativamente ya que el pico de la misma sale solapado con el buffer citrato. En la tabla XX se indican las concentraciones de sacarosa y fructosa. A partir de los resultados obtenidos se puede observar que una vez finalizado el proceso de maceración, los azúcares, sacarosa y fructosa, fueron distribuidos de manera equitativa en el tejido macerado y el sobrenadante. Este resultado esta de acuerdo con que estos azúcares solubles, presentes naturalmente en la cáscara de los cítricos, son liberados por PPasa-SE durante la maceración del tejido [17].

La determinación de azúcares como glucosa y fructosa en pomelo es muy importante dado que Rojas *y col* [17] encontraron que *Geotrichum klebahnii* excreta la enzima y la utiliza como herramienta para lograr invadir los tejidos vegetales y así poder alcanzar la glucosa y la fructosa disponibles y alimentarse de ellas y no para hidrolizar la pectina para consumirla. Tal como se indicó en la introducción, *G. klebahnii* no puede utilizar disacáridos o azucares mayores como fuente de carbono y energía.

#### 4.3.3. Cuantificación de naringina.

Para realizar la determinación cuantitativa de naringina mediante HPLC, se utilizaron muestras duplicadas correspondientes a un ensayo de maceración en el cual se evaluaron tres condiciones de proceso distintas. Se utilizaron para ello muestras de tejido macerado (M) y muestras de sobrenadante (S). Los subíndices utilizados (1, 2 y 3) corresponden a la nomenclatura utilizada previamente para la determinación de pectina. En la siguiente tabla se detallan las condiciones:

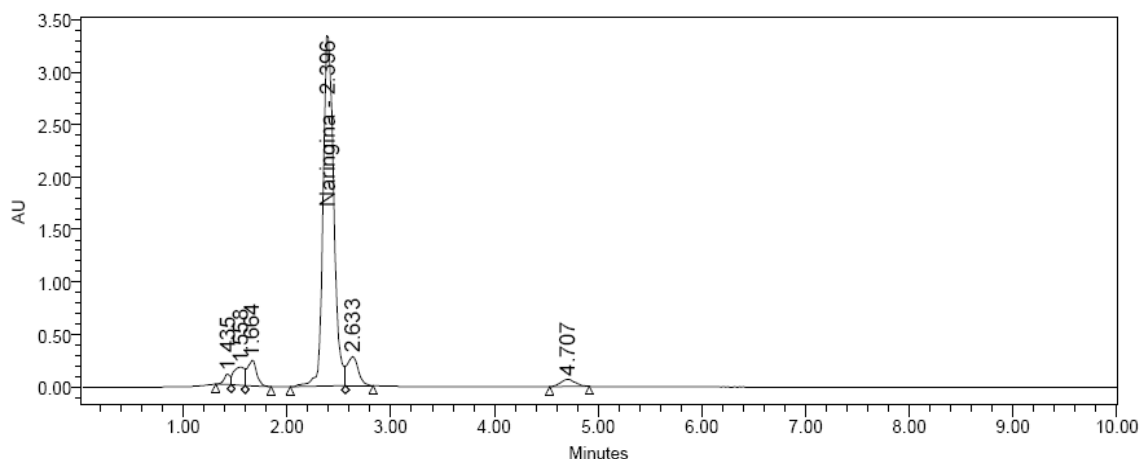


**Tabla XXI.** Nomenclatura utilizada para las muestras en la cuantificación de flavonoides.

Condición	Fuerza buffer citrato (mM)	pH
M1 y S1	200	5.5
M2 y S2	45	3.75
M3 y S3	10	4.8

Se ensayaron diferentes condiciones para determinar si existe alguna relación entre la localización final de la naringina y las condiciones de maceración.

En la figura 21 se observa el cromatograma correspondiente a la muestra M1.



**Fig. 21.** Cromatograma correspondiente a la muestra M1, FI 200mM y pH 5.5.

En el cromatograma correspondiente a la muestra M1 se observa un pico mayoritario que corresponde a la naringina y cuyo  $t_R$  es 2.396 minutos, y cinco picos minoritarios no determinados. Para la identificación del pico correspondiente a la naringina se utilizó un patrón de la misma. No se determinó la naturaleza de los otros picos ya que no se dispone en el laboratorio de patrones adecuados.

En la figura 22 se observa el cromatograma correspondiente a la muestra S1.

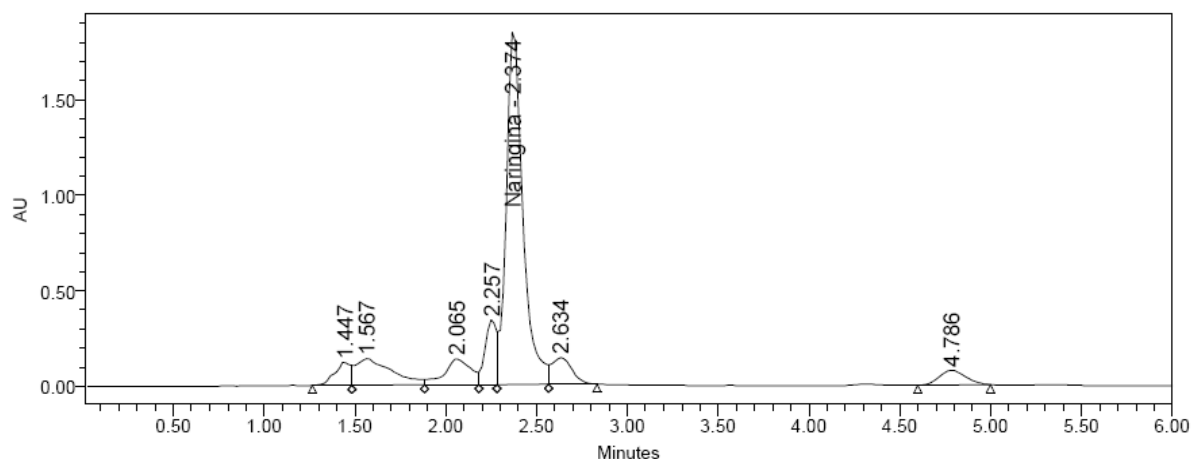


Fig. 22. Cromatograma correspondiente a la muestra S1, FI 200mM y pH 5,5.

Se observa un pico mayoritario correspondiente a la naringina, el  $t_R$  del mismo fue 2.374. En la tabla XXII se observan los resultados correspondientes a la cuantificación de naringina mediante HPLC.

**Tabla XXII.** Resultados de las muestras correspondientes al tejido macerado (M) y al sobrenadante (S) obtenidos a partir del cromatograma.

Muestra	Tiempo de retención ( $t_R$ )	Naringina (g/L)	Desvío estándar
M1	2.396	4.56	0.10
M2	2.400	4.84	0.13
M3	2.522	4.42	0.15
S1	2.374	0.94	0.04
S2	2.370	0.87	0.01
S3	2.373	0.91	0.06

Los resultados obtenidos muestran que existe una distribución asimétrica de los flavonoides. Dado que los mismos poseen una localización intracelular y que la maceración enzimática de tejidos se supone que produce poca lisis celular, es esperable que la mayor parte de los mismos se encuentre en el tejido macerado. El hecho de que aproximadamente un 20% de los mismos se encuentre en el sobrenadante indica que parte del tejido ha sufrido daño celular. Si bien la mayor parte de las células se mantienen intactas (Fig. 16) la liberación de flavonoides indica que las condiciones de maceración deben ser aun mejoradas para maximizar la integridad celular.

Al igual que en la determinación de pectina en el sobrenadante, se observa que no hay mayores diferencias en las concentraciones de naringina entre las tres condiciones estudiadas.

Para lograr conservar la mayor cantidad de células y la integridad de las mismas es necesario realizar la maceración bajo condiciones estrictas de pH, concentración de buffer y temperatura. En cambio, no es necesario mantener condiciones tan estrictas para la obtención de flavonoides ya que al estar protegidos dentro de las células, mientras éstas no se rompan, la obtención de estos nutrientes va a mantenerse constante.

#### 4.4. Bibliografía.

[1] Sakai T and Okushima M. Purification and crystallization of protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agriculture, Biology and Chemistry* 1982;46:667-676.

[2] Glanser M and Ban SN. Degradation of lignin of corn stover by means of yeast: *Trichosporon*. *Process Biotechnology* 1983;19:105-110.

[3] Pou J, Fernandez MJ, Garrido J. Obtencion de proteínas de bagacillo de caña. II Estudio de la multiplicación de *Trichosporon penicillatum* en cultivo semi-sólido en bandejas. *Microbiol.Españ.* 1985;38:89-95.

[4] Luh BS and Phaff HJ. Studies on polygalacturonases of certain yeasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1951;33:213-227.

[5] Blanco P, Sierio C, Días A, Villa TG. Differences between pectic enzymes produced by laboratory and wild-type strain os *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1997;13:711-712.

[6] Donaghy JJ and McKay AM. Pectin extraction from citrus peel by polygalacturonase produced on whey. *Biorresource Technology* 1994;47:25-28.

[7] Schwam RF and Rose AH. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *J.Appl.Bacteriol.* 1994;76:62-67.

[8] Solis-Pereira S, Favela-Torres E, Viniestra-González G, Gutierrez-Rojas M. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 1993;39:36-41.

[9] Mikhailova RV, Sapunova LI, Lobanok AG. Biosynthesis of pectinlyases in *Penicillium adametzii*, *P. citrinum* and *P. janthinellum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 1994;10:457-461.

[10] Rexova-Benková L and Tibensky V. Selective Purification os *Aspergillus niger* endopolygalacturonase by affinity chromatography on cross-linked pectic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* 1972;268:187-193.

[11] Cavalitto SF, Hours RA, Arcas JA. Pectinase production profile of *Aspergillus foetidus* in solid state cultures at different acidities. *Biotechnology Letters* 1996;18:251-256.

[12] Aguilar G, Trejo BA, García JM, Huitrón C. Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Can.J.Microbiol.* 1991;37:912-917.

[13] Taragano VM and Pilosof A. Application of Doehlert designs for water activity pH and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme Microb.Technol.* 1999;25:411-419.

[14] Urbanek H and Zalewska-Sobczar J. Polygalacturonase of *Botrytis cinerea* e-200 pers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1974;377:402-409.

[15] Aguilar G and Huitrón C. Constitutive exo - pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon source. *Biotechnology Letters* 1990;12:655-660.

[16] Takahashi n and Koshijima T. Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Sc.Technol.* 1988;22:231-241.

[17] Rojas NL, Cavalitto SF, Mignone CF, Hours RA. Role of PPase-SE in *Geotrichum klebahnii*, a yeast-like fungus able to solubilize pectin. *Electronic Journal of Biotechnology* 2008;11:1-8.

[18] Gorinstein S, Zachwieja Z, Katrich E, Pawelzik E, Haruenkit R, Trakhtenberg S, Martin-Belloso O. Comparison of the contents of the main antioxidant compounds and the antioxidant activity of white grapefruit and his new hibrid. *Lebensm.Wiss U.Technol* 2004;37:337-343.

[19] Wu T, Guan Y, Ye J. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry* 2007;100:1573-1579.

[20] Reichart E and Obendorf D. Determination of naringin in grapefruit juice by cathodic stripping defferential pulse voltammetry at the hanging mercury drop electrode. *Analytica Chimica Acta* 1998;360:179-187.

[21] Peterson J, Beecher G, Bhagwat S, Dwyer J, Gebhardt S, Haytowitz D, Holden J. Flavonones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006;19:S74-S80.

[22] Vila Real H, Alfaia A, Calado A, Ribeiro M. High pressure-temperature effects on enzymatic activity: Naringin biocconversion. *Food Chemistry* 2007;102:565-570.

[23] Blumenkrantz N and Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 1973;54:484-489.

## Capítulo V

### 5.1. Conclusiones.

- Para asegurar una alta producción de PPasa-SE a partir de cultivos en sistema batch, es necesario asegurar una buena transferencia de oxígeno para evitar la limitación del cultivo y consecuentemente la disminución en la producción de la misma.
- Realizando la maceración enzimática de albedo de pomelo bajo condiciones estrictas de pH (3.5), concentración de buffer citrato (45 mM) y temperatura (30°C) se logra un porcentaje máximo de tejido macerado (42%) y se consigue la separación entre sí de las células vegetales preservando la integridad de las mismas.
- La maceración enzimática no sólo permite la separación de las células vegetales entre sí, sino también la conservación de los componentes bioactivos que posee en su interior, en particular los flavonoides. Como estos compuestos son de gran interés para la industria alimenticia, ya que proporcionan propiedades beneficiosas para la salud humana, es muy importante lograr preservarlos dentro de la célula y poder lograr utilizarlos como aditivos en los alimentos para bebés y ancianos.
- La maceración enzimática también permitió la extracción de pectina y de azúcares mediante la utilización de PPasa-SE. La pectina extraída podría utilizarse como agente gelificante en la industria alimenticia. También, la pectina y los azúcares, podrían ser utilizados como FCE para ciertos microorganismos capaces de metabolizarlas y que a su vez sean productores de algún otro compuesto de interés industrial otorgándole valor agregado a los residuos cítricos.