

Universidad Nacional de la Plata

Facultad de Ciencias Exactas



**Protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii*: Producción, purificación
y aplicación en procesos de maceración de tejidos vegetales y
extracción enzimática de pectina**

TESIS
Nº 1188

Arley David Zapata Zapata

Tesis Doctoral

2008

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1º subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/79 int. 129



DEX-58750

**Protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii*: Producción,
purificación y aplicación en procesos de maceración de tejidos
vegetales y extracción enzimática de pectina**



**Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.**

El presente trabajo de tesis, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata.

Tesista: Ing. Arley David Zapata Zapata

Director: Dr. Roque Alberto Hours

Co-director: Dr. Sebastián Fernando Cavalitto

Parte de los resultados obtenidos con el presente trabajo de tesis han sido publicados o aceptados para su publicación:

En Revistas Científicas:

Zapata Zapata, A.D., Escobar Guerra,C.A., Cavalitto,S.F. & Hours,R.A. Solubilización enzimática de pectina de cáscara de limón con Protopectinasa-SE. *Vitae*. (en presa).

En Capítulo de Libro:

Zapata Zapata, A.D., Cavalitto, S.F. & Hours, R.A. (2008) Protopectinase production by *Geotrichum klebahnii* in fed-batch culture in syntetic médium. *Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries*. Ed. Mexican Association of Food Science (AMECA). ISBN: 978-968-9406-00-6.

*A mi Mamá, Elvia Inés y a mi Papá, Darío,
Por su ejemplo, apoyo incondicional y confianza*

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de tesis Dr. Roque Alberto Hours, por haber aceptado dirigirme y por la confianza que me brindó durante todo el trabajo.

A mi Co-director Dr. Sebastián Fernando Cavalitto (Tato), de quien aprendí tanto y quien siempre estuvo presente para guiarme y ayudarme a resolver problemas.

Al Dr. Claudio Enrique Voget, quien me dirigió en el Capítulo 3, por su constante apoyo y por su permanente interés.

Al Dr. Edgardo Donati, Director del CINDEFI, a quien le debo el haber podido trabajar en el Centro de investigación, además de sus muchas palabras de aliento en todo momento, especialmente durante la etapa de adaptación.

A la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, por haberme otorgado la comisión de estudio.

Al Dr. Benjamín Alberto Rojano por ser quien me permitió conocer el CINDEFI, además por haberme permitido realizar los ensayos de actividad antioxidante en el laboratorio de Ciencia de los Alimentos, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, por su asesoría constante y por su amistad.

A Carlos Andrés Gaviria M., un amigo con el que compartí largas horas de trabajo y de quien aprendí las técnicas de medición de la actividad antioxidante.

A Carlos Andrés Escobar G., por su gran apoyo en desarrollo del Capítulo 4 y por su amistad, pese a los momentos duros.

A Lorena Rojas, por enseñarme tantas técnicas, pero principalmente por brindarme su amistad.

A todos mis compañeros del grupo: Ceci T, Caro, Romina S., Ceci G. y en general todos los compañeros del CINDEFI (becarios, técnicos e investigadores). Todos ellos quedaron marcados por siempre en mi vida.

A mis Padres, Hermanos y Sobrinas, quienes en todo me apoyan y a quien les debo todo lo que he podido hacer en mi vida.

A Laura mi novia, por su apoyo y compañía, pero principalmente por su amor.

Al Padre Hernán y todos mis amigos de la Catedral de la Plata, por su amistad, apoyo y compañía.

A Angélica, Isa y Marco, mis amigos Colombianos en la Plata, por todos esos bellos momentos que compartimos.

A Mario Arias, por su amistad y por ser quien me permitió, hace ya bastante tiempo, dar los primeros pasos en mi formación en biotecnología.

A todas aquellas personas que de alguna manera, en Argentina o Colombia, me ayudaron en el desarrollo de mi tesis.

A aquellos que me apoyaron y que muchas veces se desvelaron conmigo.

Pero principalmente a Dios, que me guía en todos mis proyectos.

Valor es lo que se necesita para pararse y hablar; valor es también lo que se necesita para sentarse y escuchar.

Winston Churchill

INDICE

RESUMEN GENERAL	1
CAPÍTULO 1. Introducción General	
1.1. Componentes de la pared celular vegetal	5
1.2. Pectina	6
1.2.1. Características generales	6
1.2.2. Aplicaciones industriales	9
1.3. Enzimas pécticas	10
1.3.1. Generalidades	10
1.3.2. Protopectinasa-SE de <i>Geotrichum klebahnii</i>	10
1.3.3. Aplicación de las enzimas pécticas	13
1.4. Recuperación de enzimas por adsorción a materiales porosos	14
1.5. Procesos de extracción de pectina	16
1.5.1. Técnicas de extracción	16
1.5.2. Extracción enzimática de pectina: un ejemplo de catálisis heterogénea	17
1.6. Maceración de tejidos vegetales	19
1.7. Actividad antioxidante de productos de origen vegetal	21
1.7.1. El fenómeno de oxidación en los organismos vivos	21
1.7.2. Compuestos antioxidantes	22
1.7.3. Medidas de actividad antioxidante	23
1.7.3.1. Actividad con el radical catiónico ABTS ^{•+} (2,2'-azino-bis-3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio)	23
1.7.3.2. Actividad con el radical libre DPPH [•] (1,1-difenil-1-picrilhidrazilo)	24
1.7.3.3. Ensayo FRAP (ferric reducing/antioxidant power)	24
1.8. Objetivos	25
1.9. Plan de trabajo	25
1.10. Referencias bibliográficas	27

CAPÍTULO 2. Crecimiento de *Geotrichum klebahnii* y producción de Protopectinasa-SE en sistemas de cultivo por lotes y lotes alimentados

Resumen	33
2.1. Introducción	35
2.2. Materiales y métodos	36
2.2.1. Reactivos químicos	36
2.2.2. Cepa	36
2.2.3. Mantenimiento de la cepa	36
2.2.4. Composición de los medios de cultivo	37
2.2.5. Cultivos en frascos agitados	38
2.2.6. Cultivo en biorreactor: sistema en lote	39
2.2.7. Cultivo en biorreactor: sistema tipo lote alimentado	40
2.2.8. Determinación del K_{La}	44
2.2.9. Medida de actividad enzimática PGasa	44
2.2.10. Determinación de la fuente de carbono	44
2.2.11. Determinación de biomasa	45
2.3. Resultados y discusión	45
2.3.1. Cinética de crecimiento de <i>G. klebahnii</i>	45
2.3.2. Efecto de la concentración de inóculo sobre la producción de PPasa-SE	47
2.3.3. Efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de PPasa-SE	49
2.3.4. Producción de PPasa-SE en sistema de cultivo tipo lote alimentado	51
2.4. Conclusiones	53
2.5. Referencias bibliográficas	55

CAPÍTULO 3. Recuperación primaria de Protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii* por adsorción a microfiltros de fibra de vidrio

Resumen	57
3.1. Introducción	59
3.2. Materiales y métodos	60
3.2.1. Reactivos químicos	60
3.2.2. Fuentes de enzima	60

3.2.2.1. Enzima sólida purificada	60
3.2.2.2. Enzima obtenida por fermentación de <i>G. klebahnii</i>	61
3.2.3. Caracterización de los MFV	61
3.2.4. Procedimiento de filtración y cálculo de la actividad adsorbida	62
3.2.5. Experimentos de adsorción y desorción	63
3.2.5.1. Cinética de adsorción de PGS	63
3.2.5.2. Isotermas de adsorción	63
3.2.5.3. Elución	64
3.2.5.4. Regeneración de MFV	65
3.2.6. Medida de actividad enzimática (PGasa)	65
3.2.7. Determinación de proteínas solubles	65
3.2.8. Técnicas bioquímicas	65
3.3. Resultados y discusión	65
3.3.1. Adsorción de PGS a diferentes filtros y membranas	65
3.3.2. Caracterización de los MFV	66
3.3.2.1. Microscopía electrónica de barrido	66
3.3.2.2. Adsorción de N ₂	67
3.3.2.3. Porosimetría de Hg	68
3.3.3. Experimentos de adsorción con PGS	69
3.3.3.1. Cinética de adsorción	69
3.3.3.2. Efecto del pH y composición del buffer	69
3.3.4. Experimentos de adsorción con PGF	72
3.3.5. Isotermas de adsorción	74
3.3.6. Efecto de la temperatura sobre la adsorción	77
3.3.7. Experimentos de elución de PGF	77
3.3.8. Proceso de adsorción a mayor escala	79
3.3.8.1. Adsorción de la PGF diluida a partir de SC	79
3.3.8.2. Adsorción de la PGF obtenida de cultivos en sistema <i>batch</i>	80
3.3.8.3. Adsorción de la PGF de cultivos en sistema <i>batch</i> con células de <i>G. klebahnii</i>	81
3.4. Conclusiones	82
3.5. Referencias bibliográficas	83

CAPÍTULO 4. Acción de Protopectinasa–SE de *Geotrichum klebahnii* sobre protopectina de cítricos: Estudio de adsorción y capacidad de solubilización de pectina

Resumen	85
4.1. Introducción	87
4.2. Materiales y métodos	88
4.2.1. Reactivos químicos	88
4.2.2. Fuente de enzima	88
4.2.3. Obtención de protopectina de limón y de naranja amarga. Tratamiento con etanol frío	88
4.2.4. Isotermas de adsorción de PPasa-SE a protopectina de limón	89
4.2.5. Solubilización de pectina a partir de protopectina de limón y de naranja amarga	90
4.2.6. Solubilización de pectina a partir de albedo de limón y naranja amarga	91
4.2.7. Estudio cinético de la acción de PPasa-SE a protopectina de limón	92
4.2.8. Medida de actividad enzimática (PGasa)	92
4.2.9. Determinación de ácidos urónicos	92
4.2.10. Determinación de la porosidad de las partículas de protopectina	92
4.2.11. Microscopía electrónica de barrido	93
4.2.12. Determinación del grado de esterificación de la pectina. Método titulométrico	93
4.2.13. Determinación del grado de esterificación de la pectina. Método espectrofotométrico	93
4.3. Resultados y discusión	94
4.3.1. Isotermas de adsorción de PPasa–SE sobre protopectina de limón	94
4.3.1.1. Isotermas de adsorción usando AcB (20 mM, pH 5,0)	94
4.3.1.2. Isotermas de adsorción usando CitB (10 mM, pH 5,0)	97
4.3.1.3. Isotermas de adsorción usando BCP 1/4 (pH 5,0)	99
4.3.2. Solubilización de pectina de tejidos de limón y naranja amarga usando PPasa-SE	100
4.3.2.1. Efecto del tamaño de partícula de protopectina y composición del medio	100

4.3.2.2. Efecto del pH, concentración de CitB y temperatura sobre el proceso de solubilización de pectina	101
4.3.2.2.1. Experimentos con protopectina de limón	101
4.3.2.2.2. Experimentos con protopectina de naranja amarga	103
4.3.2.3. Cálculo de rendimientos de extracción de pectina a partir de tejidos de limón y de naranja amarga	105
4.3.3. Estudio cinético de solubilización de pectina en el sistema protopectina-PPasa-SE	107
4.3.3.1. Efecto de la concentración de protopectina sobre la solubilización de pectina	107
4.3.3.2. Modelo cinético de reacción: efecto de la concentración inicial de protopectina sobre la velocidad inicial de reacción	109
4.3.3.3. Efecto de la concentración de PPasa-SE sobre la solubilización de pectina	111
4.4. Conclusiones	111
4.5. Referencias bibliográficas	112

CAPÍTULO 5. Maceración enzimática de albedo de cítricos usando Protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii*. Determinación de la actividad antioxidante de los productos

Resumen	115
5.1. Introducción	117
5.2. Materiales y métodos	118
5.2.1. Reactivos químicos	118
5.2.2. Fuente de enzima	119
5.2.3. Características de los frutos utilizados	119
5.2.4. Procedimiento de maceración	119
5.2.5. Determinación de la actividad enzimática PGasa	120
5.2.6. Determinación de la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa	120
5.2.7. Determinación de ácidos urónicos	121
5.2.8. Evaluación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH [•]	121

5.2.9. Evaluación de la actividad antioxidante por el método del radical ABTS ^{•+}	121
5.2.10. Evaluación de la capacidad reductora FRAP	121
5.2.11. Determinación de Fenoles Totales	122
5.2.12. Determinación de Acidez total	122
5.2.13. Determinación de Flavononas Totales	122
5.2.14. Determinación de Naringina	122
5.2.15. Determinación de Vitamina C	123
5.2.16. Determinación de Azúcares reductores	123
5.3. Resultados y discusión	123
5.3.1. Efecto de las condiciones de agitación sobre el proceso de maceración	123
5.3.2. Efecto de la cantidad de enzima sobre el proceso de maceración	128
5.3.3. Efecto de la composición del medio sobre el proceso de maceración	129
5.3.4. Efecto del tiempo de reacción sobre el proceso de maceración	130
5.3.5. Composición de azúcares en la fracción S	132
5.3.6. Efecto del pH, concentración de CitB y temperatura sobre la maceración de albedo de limón	133
5.3.7. Determinación de actividad antioxidante en los productos de la maceración de Naranja amarga	136
5.3.8. Concentración de compuestos fitoquímicos en los productos de la maceración de Naranja agria	137
5.4 Conclusiones	140
5.5. Referencias bibliográficas	141
Conclusiones generales	145
Anexo 1. Descripción del diseño estadístico Doehlert	147
Anexo 2. Medidas de pectina solubilizada (como ácidos urónicos) para las isotermas de adsorción de PPasa-SE a protopectina de limón	151
Anexo 3. Análisis estadístico del proceso de solubilización de Pectina	153
Anexo 4. Análisis estadístico del proceso de maceración	155

LISTA DE ABREVIATURAS

A ₆₆₀	Absorbancia medida a 660 nm
ABTS	2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio
AcB	Buffer ácido acético – acetato de Na
AEAC	Actividad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico
AGA	Ácido D-galacturónico
AO	Agitación orbital
AR	Agitación recíprocante
B _γ	Balance de energía
BAC	Buffer ácido acético (12,5 mM) – citrato de Na (6,25 mM)
BAP	Buffer ácido acético (12,5 mM) – fosfato di-básico de Na (6,25 mM)
BC	Balance de carbono
BCP 1/4	BCP dilución 1/4
BCP	Buffer ácido cítrico (50 mM) – fosfato di-básico de Na (25 mM)
CitB	Buffer ácido cítrico – citrato de Na
DO	Densidad óptica
DPPH	1,1-difenil-1-picrilhidrazilo
FC	Factor de concentración
FCE	Fuente de carbono y energía
FN	Fuente de N ₂
FRAP	Poder antioxidante reductor de ferrico
GE	Grado de esterificación
HG	Homogalacturonano
HM	Pectina de alto metoxilo
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50 %
LM	Pectina de bajo metoxilo
MFV	Microfiltros de fibra de vidrio
MIE	Material insoluble en etanol
MR	Medio de referencia

OTR	Velocidad de transferencia de O ₂
PGA	Ácido poligalacturónico
PGasa	Poligalacturonasa
PGF	PGasa de <i>G. klebahnii</i> del medio de fermentación
PGS	PGasa de <i>G. klebahnii</i> purificada por el Dr. Takuo Sakai
PPasa	Protopectinasa
RG	Ramnogalacturonano
S	Sobrenadante
SC	Solución concentrada de PPasa-SE
TEAC	Actividad antioxidante en equivalentes de Trolox
TM	Tejido macerado
TNM	Tejido no macerado
YPD	Medio de cultivo (extracto de levadura, peptona de carne y glucosa)

RESUMEN GENERAL

Geotrichum klebahnii es un hongo levaduriforme que produce una única endopoligalacturonasa (EC 3.2.1.15) denominada Protopectinasa-SE (PPasa-SE), la cual posee actividad solubilizadora de pectina. En la presente tesis se estudió la producción, purificación y aplicación de la PPasa-SE para la extracción enzimática de pectina y la maceración de tejidos vegetales.

Se determinaron los parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de *G. klebahnii*, así como la influencia sobre la expresión de PPasa-SE de la concentración de inóculo y la velocidad de agitación en biorreactores agitados operados en sistema por lotes. Se demostró que la expresión de la enzima está influenciada positivamente por el aumento en la velocidad de agitación con el consecuente incremento en la concentración de oxígeno disuelto en el medio. Además, se observó un aumento significativo en la producción enzimática en cultivos por lotes alimentados a velocidad de alimentación constante en comparación con los cultivos en sistema por lotes.

Se estudió un proceso de adsorción de la enzima a microfiltros de fibra de vidrio (MFV) con el fin de separarla y concentrarla en un solo paso a partir del sobrenadante de cultivos obtenidos mediante los sistemas previamente descritos. Para ello se realizó una previa caracterización de los MFV por medio de diferentes técnicas fisicoquímicas las cuales revelaron la predominancia de macroporosidad en su estructura y un área superficial $\sim 165 \text{ m}^2/\text{g}$. Se evaluó el efecto del pH y la composición del medio sobre la capacidad de adsorción de PPasa-SE, encontrando que un pH de 3,0 favorece el proceso de adsorción de la enzima. La presencia de fosfato en el medio mostró un efecto inhibitorio sobre el proceso de adsorción, el cual es contrarrestado por la presencia de citrato. Con base en los resultados anteriores se construyeron isoterms de adsorción bajo diferentes condiciones de operación, las cuales permitieron definir que una relación entre el volumen filtrado y el área de filtración $(V/A) \geq 0,29$ permite un buen ajuste de los datos de equilibrio al modelo de Langmuir, siendo los parámetros de adsorción $q_m = 98,6 \pm 7,5 \text{ U}/\text{cm}^2$ y $K_d = 6,1 \pm 3,4 \text{ U}/\text{mL}$. La elución de la enzima no fue afectada por el tipo de buffer de elución utilizado, pero sí por la conductividad del mismo. El proceso de adsorción y elución de la PPasa-SE a mayor escala permitió definir que a partir de un sistema de MFV es posible el tratamiento de 4 L de sobrenadante de medio de cultivo,

sin deterioro mayor de la capacidad de adsorción, alcanzando un nivel de concentración entre 5× y 7×. Además, se observó que este sistema permite separar directamente las células del medio.

PPasa-SE fue utilizada para la extracción de pectina a partir de cáscaras de cítricos. Se estudiaron algunas características, tales como la estructura del material y las interacciones moleculares con el medio, que afectan los fenómenos de adsorción de la enzima a la protopectina de limón. La solubilización de pectina con PPasa-SE a partir de albedo de limón y de naranja amarga, a 37 °C, usando buffer ácido cítrico-citrato de Na (CitB), 25 mM y pH 5,0, fue altamente eficiente, permitiendo obtener pectinas de alto grado de esterificación con un contenido de ácidos urónicos (como ácido galacturónico, AGA) del 65 %. Estudios cinéticos mostraron que la velocidad inicial de reacción responde adecuadamente al modelo de Michaelis-Menten, y que la concentración de enzima no muestra efecto alguno sobre la velocidad inicial de reacción.

Finalmente, PPasa-SE fue utilizada para la maceración de tejidos vegetales. Este proceso no sólo fue influenciado por la concentración de enzima y la composición del medio de reacción, sino por las condiciones de agitación. Se encontró que una potencia volumétrica (P/V_L) $\sim 1 \text{ KW/m}^3$ es adecuada para la obtención de células disgregadas que conservan en gran proporción su integridad. Las condiciones que permitieron un mayor rendimiento en la fracción de tejido macerado (TM) fueron: 37 °C, CitB (25 mM) y pH 5,0. Los sólidos solubles presentes en la fracción de sobrenadante (S) del proceso (fracción obtenida luego de la separación del TM) están compuestos principalmente por glucosa, fructosa, sacarosa y ácidos urónicos. Por su parte, la fracción de TM mostró mayor actividad antioxidante que la fracción de S, así como un mayor contenido de compuestos como vitamina C, ácidos totales y naringina. Esto demuestra la bondad del proceso enzimático para la conservación de compuestos fitoquímicos intracelulares, con características benéficas para la salud.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. COMPONENTES DE LA PARED CELULAR VEGETAL

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

La celulosa constituye cuantitativamente la mayor fracción en la pared celular, y consta de cadenas lineales (no ramificadas) de glucosa, con uniones β -1,4. Las cadenas de celulosa están ordenadas en fibras y son las responsables de mantener la rigidez estructural de la pared celular. La hemicelulosa es un grupo más heterogéneo de polisacáridos y como grupo es el segundo en cantidad. Los componentes principales de la hemicelulosa varían dependiendo del tipo de vegetal al que pertenezcan (Timell 1967; Wilkie & Woo 1977). El tercer grupo de polisacáridos de la pared celular está constituido por las sustancias pécticas, las cuales están formadas por un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (AGA) unidos en enlaces α -1,4. Esta cadena de ácido poligalacturónico (PGA) está interrumpida por residuos de ramnosa unidos por enlaces α -1,2. Estos residuos de ramnosa suelen tener unidas largas cadenas laterales de azúcares neutros. En algunas pectinas (provenientes de remolacha y manzana) las cadenas laterales suelen terminar en ácido ferúlico (Aspinall 1980; Van Buren 1991; Sakai *et al.* 1993).

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

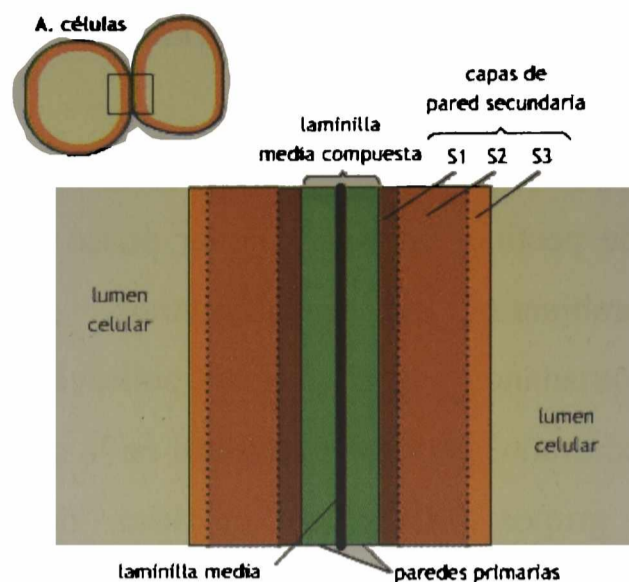


Figura 1.1. Estructura esquemática de la pared celular de vegetales superiores y las partes que la conforman.

Entre las diferentes cadenas de polisacáridos de la pared celular se pueden formar entrecruzamientos de naturaleza covalente o no, para generar una estructura rígida. Entre los entrecruzamientos no covalentes se cuentan los enlaces puente de hidrógeno, presentes principalmente entre la celulosa y la hemicelulosa, los enlaces iónicos entre las cuales se encuentran las uniones en las que participan cationes divalentes, normalmente Ca^{2+} , las cuales se presentan entre cadenas de pectina (Fry 1986). De los entrecruzamientos de naturaleza covalente, el que ha sido estudiado con más detalle es el formado por puentes entre los ácidos ferúlicos de las cadenas laterales (Ishii 1991; Bach Tuyet Lam & Stone 1992; Oosterveldt *et al.* 1997).

1.2. PECTINA

1.2.1. Características generales

Las pectinas son heteropolisacáridos complejos que contienen dos regiones bien definidas (de Vries *et al.* 1982). La primera es la región denominada “lisa” o también homogalacturonano (HG), está compuesta principalmente por los esqueletos de restos de AGA. Los grupos carboxilos del AGA pueden estar parcialmente esterificados con metanol, y parcial o completamente neutralizados por una ó más bases. La Fig. 1.2 muestra una porción de la región del esqueleto del HG.

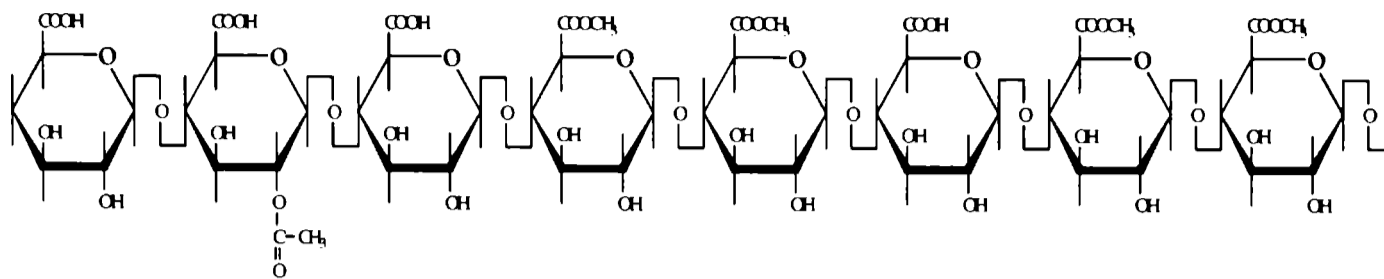


Figura 1.2. Estructura normal del homogalacturonano encontrado en las regiones lisas de la pectina. El número de restos metilados y/o acetilados depende de la fuente de la cual se obtuvo la pectina.

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

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

Como parámetro de la cantidad de grupos esterificados con metanol se usan alternativamente dos criterios distintos, a saber: el grado de esterificación (GE) y el contenido de metoxilos. El GE se define como la cantidad de grupos carboxilos pertenecientes a los restos de AGA esterificados, en relación a su número total. El contenido de metoxilos se calcula relacionando la masa total de grupos metoxilos con la masa total de restos de AGA (esterificados o no). Un GE de 100 % (todos los grupos carboxilos neutralizados con metanol) corresponde a un contenido de metoxilo de 16,32 % (Walter 1991). En relación a esta propiedad se diferencian dos categorías de pectinas: las que poseen un contenido de metoxilos mayor del 8 % (GE > 50 %) son denominadas pectina de alto metoxilo (HM), y las que presentan un contenido de metoxilos menor que 8 % (GE < 50 %), son llamadas pectinas de bajo metoxilo (LM) (Sakai *et al.* 1993). Las pectinas HM sólo gelifican en presencia de concentraciones relativamente altas de

azúcar y en medio ácido. Por el contrario las pectinas LM la gelificación se produce en ausencia de azúcar pero en presencia de concentraciones de iones, particularmente divalentes (*i.e.* Ca^{+2}).

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

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

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

En la Fig. 1.3 se muestra la estructura esquemática de la pectina, y se identifican claramente las regiones principales que la conforman.

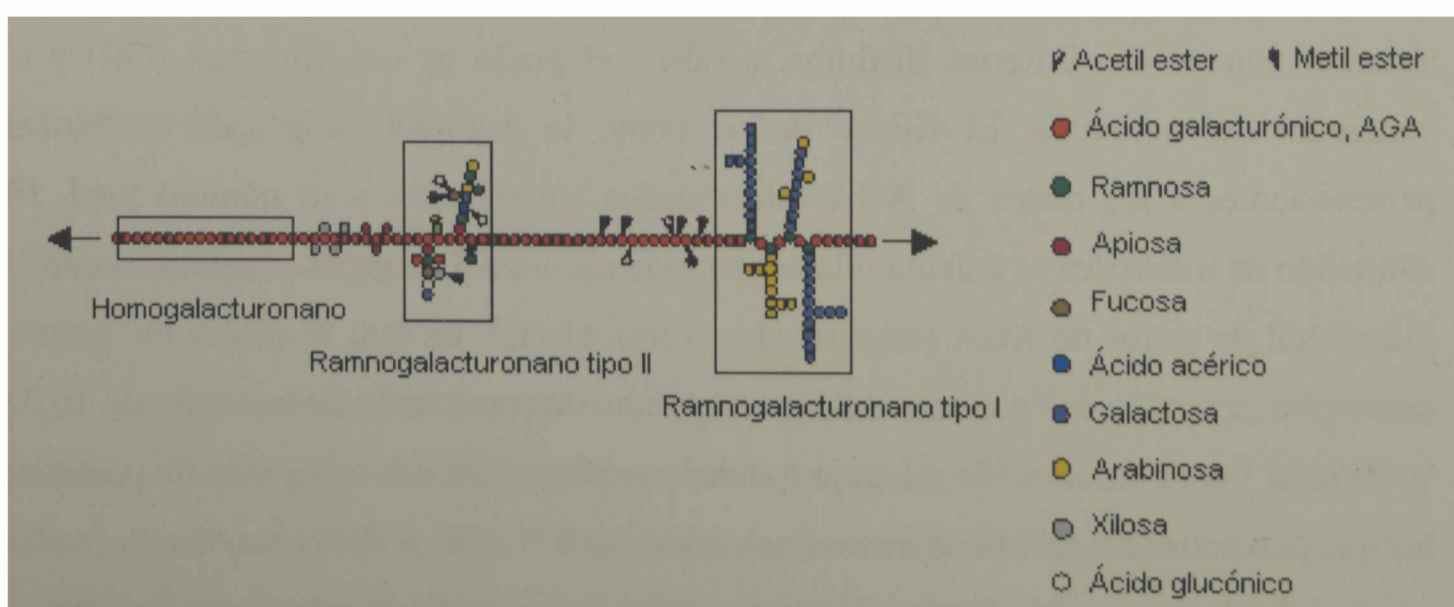


Figura 1.3. Estructura esquemática de la pectina (Willats *et al.* 2006).

1.2.2. Aplicaciones industriales

En el sector alimentario, la principal utilidad que se da a la pectina es como agente gelificante, aunque en la actualidad también es considerada una fuente importante de fibra nutricional (Alkorta *et al.* 1998; Jayani *et al.* 2005). El gel de pectina se forma cuando las porciones de HG están unidas y entrecruzadas formando una red cristalina tridimensional en donde el agua y los solutos quedan atrapados. Son varios los factores que determinan las propiedades de los geles de pectina formados, entre los que se incluyen el tipo y el grado de esterificación con metanol y de acetilación de la pectina, el pH y la temperatura del medio, presencia, tipo y concentración de azúcares y otros solutos y, finalmente, la presencia de iones divalentes, particularmente, de Ca^{+2} (Willats *et al.* 2006). Se han hecho muchos estudios con el propósito de mejorar la propiedad de gelificación de las pectinas y de esta forma aumentar sus posibilidades de aplicación (Bernhard Wehr *et al.* 2004). Alrededor del 80 % de la producción mundial de pectina altamente metoxilada es utilizada en la manufactura de mermeladas y jaleas, con el fin de corregir la deficiencia natural de pectina de algunas frutas (Sakai 1992; Sakai *et al.* 1993; Voragen *et al.* 1995; Alkorta *et al.* 1998; Willats *et al.* 2006). Además por su gran capacidad de estabilizar emulsiones, suspensiones y espumas, la pectina resulta ser de gran utilidad en la producción de bebidas frutales concentradas (Sakai *et al.* 1993).

En el sector farmacéutico, se utiliza la pectina debido a la capacidad que presenta para aumentar la viscosidad y estabilizar diversas emulsiones y suspensiones. Además, es importante por su acción detoxificante en metales, la cual probablemente pueda ser atribuida a su capacidad como agente quelante. También puede ser utilizado como transportador de fármacos, disminuyendo así la toxicidad de los mismos y prolongando su actividad sin la disminución de su efecto terapéutico (Sakai *et al.* 1993). Recientemente, se han desarrollado micro-glóbulos de pectina con potencial uso en quimioterapia de algunos tipos de cáncer, como sistema biodegradable de liberación intravascular de drogas.

En el sector de cosmética, la pectina se utiliza debido a su propiedad de gelificar. A partir de estos geles se elaboran productos comerciales, *i.e.* cremas y emulsiones para cabellos (Sakai & Okushima 1978).

1.3. ENZIMAS PÉCTICAS

1.3.1. Generalidades

Debido a la gran complejidad química de la pectina y a su abundancia en la naturaleza, los microorganismos poseen una gran variedad de enzimas capaces de degradarla de alguna forma a fin de metabolizarla. En general, estas enzimas son de tipo inducible y su síntesis responde a la presencia extracelular del sustrato. La degradación enzimática total de la pectina origina primordialmente AGA y ramnosa, junto a cantidades menores de galactosa, arabinosa, metanol, acetatos y trazas de otros azúcares tales como xilosa, fucosa, apiosa, etc. Estos productos de degradación pueden ser metabolizados durante el crecimiento microbiano dependiendo del microorganismo en cuestión.

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

1.3.2. Protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii*

El termino protopectinasa (PPasa) se aplica a las enzimas que hidrolizan o disuelven protopectina liberando así pectina soluble, y ocasionando de forma paralela la separación de las células vegetales. Este tipo de enzimas son catalogadas como un grupo heterogéneo de enzimas que poseen diferentes actividades catalíticas, liasas e hidrolasas, todas con actividad tipo endo.

Hace algunos años, el grupo de investigadores liderados por Sakai, en la Universidad Prefectural de Osaka (Japón) iniciaron la búsqueda de microorganismos productores de protopectinasas con el fin de poder utilizar dichas enzimas en la extracción enzimática de pectina (Sakai & Okushima 1978). La primera PPasa fue aislada a partir del hongo levaduriforme *Trichosporon penicillatum* SNO-3, el cual posteriormente fue reclasificado como *Geotrichum klebahnii* ATCC 42397. Los miembros de este género son hongos levaduriformes caracterizados por hifas estrechas con ramificaciones escasas y cortas. La Fig. 1.4 muestra una microfotografía donde se aprecia la morfología característica del *G. klebahnii* creciendo en medio líquido.

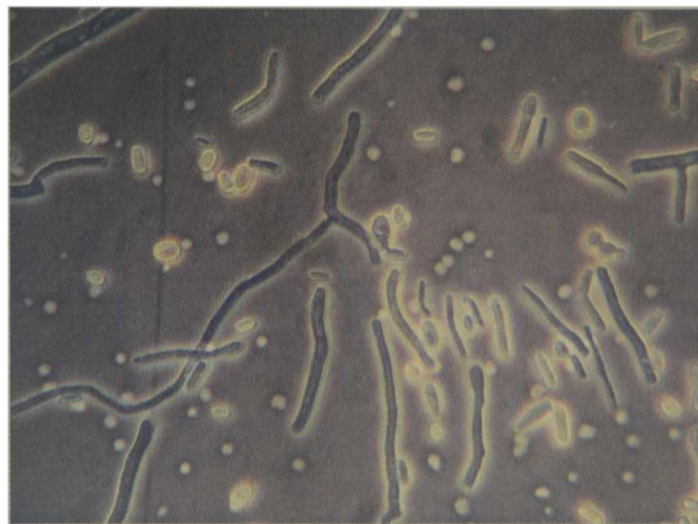


Figura 1.4. Microfotografía de *Geotrichum klebahnii* (400×).

Geotrichum klebahnii es un microorganismo que posee un pool pobre de enzimas hidrolíticas extracelulares. Sólo se ha reportado y caracterizado la presencia de PPasa-SE (Sakai & Okushima 1982). A pesar de generar una enzima liberadora de pectina, no puede crecer en medios de cultivo conteniendo pectina, pectatos u oligogalacturonanos. Esta característica es muy común en levaduras (Rexova-Benková & Markovic 1976), e indica que *G. klebahnii* no utiliza a la enzima para consumir pectinas de los frutos sino como una herramienta biológica para colonizar el tejido vegetal a fin de acceder a los azúcares solubles que éste posee (Rojas *et al.* 2008). Este microorganismo presenta un crecimiento rápido en medio YPD sólido, con la formación de colonias blancas, secas, con aspecto algodonoso. En medios ricos, al final de la fase de crecimiento, genera un fuerte aroma a fruta (Sutton *et al.* 1988; Larone 1995).

Las endo-PGasas (EC 3.2.1.15) son hidrolasas que actúan sobre PGA o ácidos pécticos, produciendo en primera instancia cadenas de menor peso molecular. Si la reacción se continúa, finalmente se puede obtener una mezcla formada por monómeros de AGA y oligómeros de dos, tres o hasta cuatro restos, dependiendo de la enzima en estudio. Estas enzimas actúan específicamente sobre ácidos pécticos o pectatos. Tanto el grado de polimerización como el de esterificación afecta marcadamente la velocidad e intensidad de hidrólisis. Las PGasas son producidas por una gran variedad de hongos filamentosos, levaduras y bacterias, así como por varias plantas superiores y algunos nematodos parásitos de plantas (Rexova-Benková & Markovic 1976; Jayani *et al.* 2005).

Desde el punto de vista químico, PPasa-SE es una glicoproteína con un peso molecular de 40 kDa (determinado por SDS-PAGE) que el microorganismo secreta directamente al medio de cultivo. La misma fue purificada, parcialmente caracterizada e identificada como una endo-PGasa. Resulta interesante mencionar que PPasa-SE presenta mayor afinidad (menor K_M) sobre sustratos en forma insoluble (protopectina) que sobre los sustratos equivalentes en forma soluble (PGA, pectina) (Sakai & Okushima 1978; Sakai & Okushima 1982). Comercialmente, la PPasa-SE producida por *G. klebahnii* fue denominada Pectinase-SE (Shikibo Ltd., Japan). Su uso está recomendado para facilitar la filtración y clarificación de jugos de frutas, manufactura de alimentos a base de macerados de vegetales, extracción de pectina a partir de cáscaras de cítricos, aislamiento de protoplastos vegetales, etc.

Diferentes autores han encontrado varias enzimas con actividad PPasa, las cuales han sido aisladas, purificadas y clasificadas en dos tipos, dependiendo de su mecanismo de acción. Las PPasas del tipo A son aquellas que reaccionan sobre una región específica del homogalacturonano (región lisa) de la protopectina, liberando pectina de alto peso molecular por depolimerización restringida. Las PPasas del tipo B son las que actúan sobre las cadenas de azúcares neutros que conectan la región del ramnogalacturonano (región ramificada) con los demás constituyentes de la pared celular, liberándose por lo tanto pectina con un mayor peso molecular que en el caso particular de las PPasas tipo A (Contreras Esquivel *et al.* 1997). En la Fig. 1.5 se muestra un esquema de la estructura de la protopectina, y se representan los productos de las diferentes formas de acción de las PPasas.

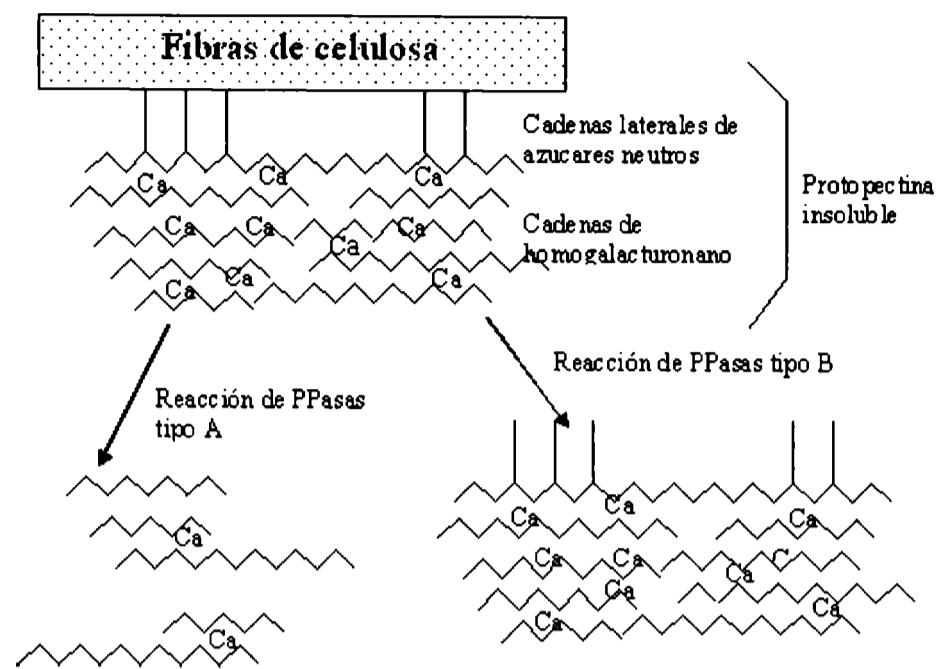


Figura 1.5. Estructura esquemática de la protopectina y acción de las diferentes protopectinasas.

1.3.3. Aplicación de las enzimas pécticas

Las enzimas pécticas han sido utilizadas en diversas industrias desde hace más de medio siglo. La industria que más se ha beneficiado de ellas es la industria alimentaria, aunque también han sido utilizadas por la industria textil, papelera, maderera, extracción de aceites, procesamiento de café y de té, el tratamiento de aguas residuales, entre otras (Sarioglu *et al.* 2001; Hoondal *et al.* 2002; Jayani *et al.* 2005). La mayor aplicación industrial de las pectinasas se encuentra en la industria procesadora de jugos de frutas, ayudando, junto con otro tipo de enzimas *i.e.* las amilasas, a optimizar los procesos de filtración y clarificación (Pilnik & Rombouts 1979; Kashyap *et al.* 2001; Da Silva *et al.* 2005; Jayani *et al.* 2005; Landbo *et al.* 2007). El mecanismo consiste en que luego de la obtención del zumo de frutas por prensado, el mismo presenta cierta turbiedad debido a la presencia de restos de tejidos y de “nubes” de proteínas positivas rodeadas de moléculas de pectina cargadas negativamente. Estos complejos proteína-pectina no precipitan debido a repulsiones de tipo electrostáticas y le confieren al jugo un aspecto poco atractivo. El agregado de enzimas pécticas, bien pectin liasa, bien un a mezcla de pectín esterasa y pectato liasas, promueve la degradación de la capa externa de pectina permitiendo la exposición sobre la superficie de las partículas de las proteínas contenidas en su interior. Esto genera zonas de carga

positivas y zonas de carga negativa sobre las partículas promoviendo la interacción y precipitación de las mismas.

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

1.4. RECUPERACIÓN DE ENZIMAS POR ADSORCIÓN A MATERIALES POROSOS

La adsorción es una de las operaciones más utilizadas para la concentración y purificación de biomoléculas (Ghosh 2002; Saiful *et al.* 2006; Boi 2007). Mediante la adsorción las moléculas, inicialmente en solución, se concentran en la superficie de un sólido por la acción de fuerzas entre los grupos químicos superficiales y los del adsorbato. La interacción puede involucrar fuerzas de van der Waals, uniones iónicas, hidrofóbicas, puentes de H, atracción entre dipolos, etc.

La adsorción es esencialmente un fenómeno de superficie y, debido a ello, es generalmente reversible. Al poner en contacto una solución del adsorbato con una superficie activa se establece luego de un tiempo determinado un equilibrio entre la cantidad de moléculas adsorbidas por unidad de área y la concentración de estas moléculas en solución. El equilibrio suele no ser instantáneo y la cinética de adsorción depende tanto de las condiciones operacionales, como de la configuración y tamaño del equipo. Debido a que la adsorción es un fenómeno superficial, la misma es obviamente influenciada por las características de las superficies del adsorbente y adsorbato. Las características electrostáticas, iónicas o hidrofóbicas de los grupos químicos superficiales son marcadamente afectadas por el pH, conductividad y la composición de la solución, por lo que estos parámetros son optimizados para promover una eficiente adsorción y posteriormente modificados para favorecer la elución del adsorbato (Nakamura & Matsumoto 1998; Jurado *et al.* 2004). La adsorción puede ser

inespecífica, *i.e.* por interacción iónica, o altamente específica llamada también adsorción por afinidad. En esta última las interacciones químicas son las mismas que en la adsorción inespecífica, pero existe una alta complementariedad entre las estructuras del adsorbente/adsorbato lo que hace la adsorción altamente selectiva, *i.e.* interacción antígeno/anticuerpo.

En los procesos de adsorción se emplean materiales porosos como adsorbentes con el objetivo de disponer de una gran área de adsorción por unidad de volumen. Estos materiales pueden ser de tipo orgánico o inorgánico y con grupos funcionales específicamente ligados a su superficie, lo que permite disponer de numerosos tipos de adsorbentes que pueden ser seleccionados en función de los objetivos del proceso de aislamiento/purificación (Boi 2007).

En los métodos cromatográficos de separación de proteínas, el sistema comúnmente empleado para las operaciones de adsorción son las columnas rellenas con matrices porosas. En estos sistemas el adsorbato debe transportarse desde el seno de la solución al sitio de adsorción en el poro. Esto significa que existen varias resistencias posibles en el camino antes de unirse a la superficie. Estas resistencias incluyen la del film líquido que circunda al adsorbente, a la difusión en el seno del adsorbente, a la difusión en el poro y a la reacción en la superficie. Los modelos cinéticos toman en cuenta estas resistencias, cuyo predominio depende de los factores antes mencionados. Como alternativa a las columnas rellenas, se están empleando membranas adsorbentes cuya geometría es totalmente opuesta, son planas, es decir tienen gran área y poco volumen. A este sistema se lo denomina cromatografía de membrana. Las ventajas de las membranas respecto a los sistemas convencionales de columna están relacionadas con el mecanismo de transporte del adsorbato al sitio de adsorción. En las membranas, el transporte se lleva a cabo fundamentalmente por el mecanismo de convección, por lo que se reduce de una forma significativa las limitaciones difusionales en el proceso global de adsorción, aunque dichas limitaciones no están ausentes en su totalidad (Thömmes & Kula 1995; Nakamura & Matsumoto 1998; Ghosh 2002; Charcosset 2006; Saiful *et al.* 2006; Boi 2007; Chen *et al.* 2007). Por otra parte, el reducido efecto de la transferencia de materia en la cinética de adsorción y la baja resistencia de las membranas al flujo, permite que el sistema pueda funcionar con altos caudales de alimentación a baja presión sin perder eficiencia y con un tiempo de proceso mucho menor al empleado en las columnas (Nakamura & Matsumoto 1998; Boi 2007). En

relación a la configuración y tamaño de los equipos, en la cromatografía de membrana los equipos de adsorción son pequeños y de diseño simple, características que disminuyen la necesidad de mano de obra y los requerimientos de soluciones buffer, lo cual lleva consigo beneficios en la economía del proceso (Boi 2007). Por otra parte, los principales problemas inherentes a las membranas adsorbentes son la distribución desigual que se presenta en el flujo y la heterogeneidad en los tamaños de los poros de la matriz, lo cual limita la superficie interna (menor capacidad de adsorción de la matriz por unidad de volumen en comparación con los sistemas de columnas) (Ghosh 2002; Charcosset 2006; Boi 2007).

Existen actualmente en el mercado membranas adsorbentes de intercambio iónico y de afinidad, que se han empleado para la purificación de diferentes biomoléculas y partículas virales (Phillips *et al.* 2005; Suck *et al.* 2006; Boi 2007).

La microfiltración es una operación ampliamente utilizada en la industria y en escala de laboratorio en los procesos de separación de biomasa, purificación de biomoléculas o en el tratamiento de soluciones de proteína. En este proceso se emplean membranas o microfiltros de profundidad, con tamaños de poro en el rango de 0,1 a 1,0 μm y porosidad 30-70 %. Las presiones típicas varían entre 100 y 500 kPa y los caudales entre 50 y 1000 $\text{L}/\text{m}^2\cdot\text{h}$ (Fane & Radovich 1990; Tejeda *et al.* 1995). Los materiales más comunes de las membranas de microfiltración son acetato de celulosa, polipropileno, PTFE (politetrafluoretileno), PVDF (Polivinilidenofluoruro).

1.5. PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE PECTINA

1.5.1. Técnicas de extracción

Las pectinas pueden ser extraídas de los tejidos vegetales por procedimientos fisicoquímicos, microbiológicos o enzimáticos. En todos los casos el proceso consta básicamente de dos fases, la primera es la depolimerización restringida de la protopectina y la segunda consiste en la difusión de la pectina solubilizada desde la matriz del tejido hacia la solución extractante (Contreras Esquivel *et al.* 1997).

Los procesos fisicoquímicos consisten en el uso de ácidos (*i.e.* HCl, HNO₃) a altas temperaturas (80-90 °C) para lograr la extracción de la pectina, pero normalmente

una fracción de la pectina solubilizada se degrada simultáneamente en componentes de menor peso molecular, cuya presencia hace que tanto el rendimiento como las propiedades del producto obtenido sean negativamente afectadas (Contreras Esquivel *et al.* 1997; Marry *et al.* 2000; Canteri-Schemin *et al.* 2005; Zhongdong *et al.* 2006).

La extracción microbiológica de pectina se basa en el cultivo de microorganismos productores de PPasas en medios conteniendo la materia prima. Tradicionalmente se usan hongos y levaduras (*G. klebahnii*, *Kluyveromices marxyanus* y *Endomicopsis capsulares*). Aunque con este método se pueden obtener pectinas de mejor calidad, se genera un aumento en el consumo de energía del biorreactor ya que se requiere mantener las condiciones de agitación y aireación adecuadas para el microorganismo (Sakai & Okushima 1980). La Fig. 1.6 muestra un esquema de un proceso de extracción de pectina a escala industrial usando el método microbiológico.

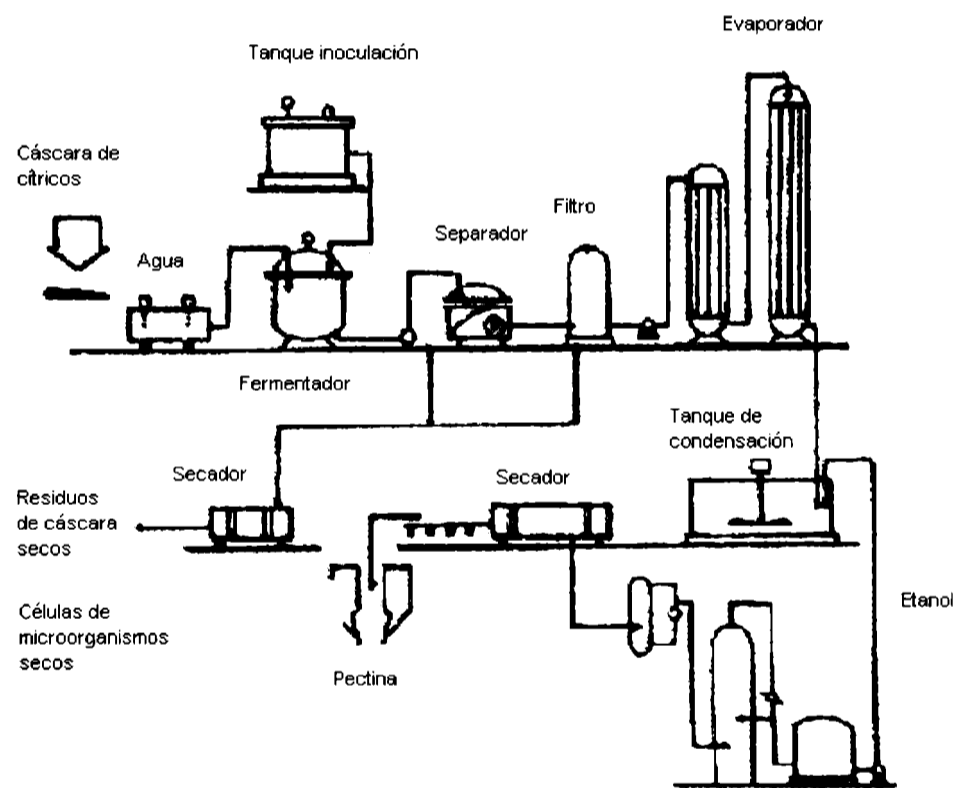


Figura 1.6. Esquema de producción de pectina a escala industrial usando el método microbiológico (Sakai and Okushima, 1980).

1.5.2. Extracción enzimática de pectina: un ejemplo de catálisis heterogénea

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 diseñar mezclas de enzimas óptimas para cada uno de los procesos en los que se vea involucrado su uso (Cavalitto *et al.* 2000).

La extracción enzimática de pectina utiliza algún tipo de enzima (PPasa) producida por los microorganismos, pero sin la presencia de ellos. Esta enzima, cuando proviene de hongos filamentosos productores de complejos enzimáticos, suele usarse en forma pura para evitar la presencia de otro tipo de enzimas que puedan dañar de alguna manera la estructura de la pectina. No obstante, cuando se utilizan extractos provenientes de bacterias o levaduras, no siempre es necesario un proceso de purificación, ya que algunos de estos microorganismos no producen enzimas que puedan afectar la estructura de la pectina extraída. Lo anterior puede llevar consigo mayor eficiencia en el proceso de extracción, aunque ésta depende en gran medida del tipo específico de enzima utilizada (Sakamoto *et al.* 1995; Shkodina *et al.* 1998; Contreras Esquivel 2003). Las propiedades de la PPasa-SE, así como su alta capacidad de expresión por parte de *G. klebahnii* y la capacidad de no requerir procesos de purificación ya que se presenta en el medio como una única enzima, la convierten en una enzima con alto potencial de aplicación industrial en la extracción de pectina, cuyo proceso puede representarse de manera similar al mostrado en la Fig. 1.7, reemplazando la inoculación del microorganismo por un proceso simple de adición de enzima en cantidades adecuadas (Sakai & Okushima 1980).

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

Los principales estudios acerca de los procesos de catálisis enzimática heterogénea han sido realizados sobre el sistema formado por celulosa – celulasa (Sun

Bok Lee & Dewey 1982; Movagarnejad *et al.* 2000; Gan *et al.* 2003; Al-Zuhair 2007). En este sistema se ha detectado que la adsorción de las moléculas de enzima a la partícula sólida depende de factores estructurales como el área superficial y la porosidad de la partícula (Sun Bok Lee & Dewey 1982; Tanaka *et al.* 1988; Gama *et al.* 1994; Missang 1999; Boussaid & Saddler 1999; Al-Zuhair 2007). De igual manera estos estudios han permitido encontrar que las enzimas son más afines a la región amorfa de la partícula y menos a la región cristalina (Tatsumi *et al.* 2006). Hasta el presente, no existen reportes similares para el caso protopectina – PPasa.

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

1.6. MACERACIÓN DE TEJIDOS VEGETALES

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

En general los preparados enzimáticos encargados de separar los tejidos vegetales pueden clasificarse en dos tipos. El primer grupo es capaz de degradar las cadenas de PGA y lograr la desintegración total del tejido vegetal. Ellos son utilizados mayoritariamente en la elaboración de alimentos con una alta proporción de sólidos solubles, *i.e.* puré de tomate, y para mejorar el rendimiento en la obtención de jugos de frutas. Generalmente, son utilizadas una combinación de enzimas celulolíticas y pectinolíticas para lograr una completa degradación (Nakamura *et al.* 1995). El segundo

grupo actúa preferentemente sobre la laminilla media del tejido vegetal y algunas porciones de la pared celular primaria, sin dañar la pared celular secundaria. Por esta razón, las celulasas son indeseables en esta mezcla enzimática (Nakamura *et al.* 1995). Dado que generan suspensiones de células libres y/o pequeños acúmulos celulares, estos procesos son utilizados en la elaboración de bases de néctares, puré de vegetales y alimentos para bebés y ancianos (Rombouts & Pilnik 1978).

Diferentes trabajos se han realizado con el propósito de evaluar el efecto de diversos preparados enzimáticos sobre la maceración de tejidos vegetales. De la misma manera, el estudio de las condiciones de operación (pH, temperatura, composición del medio, agitación, etc.) que promuevan mejores resultados, han sido estudiadas (Bateman 1968; Sato 1968; Ishii 1984; Nakamura *et al.* 1995; De Bruijn & Biekman 1998; Salvador *et al.* 2002). Si bien los resultados han permitido obtener información para mejorar los procesos a escala de laboratorio, los estudios realizados hasta el momento no agrupan todas aquellas variables de interés que permitan optimizar el proceso, así como tampoco han seguido ningún tipo de procedimiento estadístico para el análisis de los resultados. Tampoco se han realizado estudios acerca de las diferentes condiciones de agitación asociadas con el proceso de maceración, lo cual, así como la acción enzimática, está directamente relacionado con la eficiencia del proceso. Los estudios de las condiciones de agitación son necesarios a los efectos de evaluar un incremento en la escala del proceso.

Las PPasas pueden ser utilizadas para degradar la laminilla media, actuando específicamente sobre la protopectina (Nakamura *et al.* 1995). Como resultado se pueden obtener preparados formados por cúmulos de células simples (hasta 3-4) y, de esta forma, proveer una nueva clase de ingrediente de uso en la formulación de alimentos (Voragen & Pilnik 1989; Sakai *et al.* 1993; Biely & Kremmicky 1998).

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

componentes de las células simples son más estables que aquellos preparados obtenidos por ruptura mecánica de tejidos.

1.7. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PRODUCTOS DE ORIGEN VEGETAL

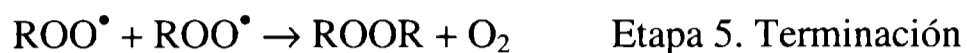
1.7.1. El fenómeno de oxidación en los organismos vivos

En los seres vivos aerobios se generan continuamente radicales libres y especies reactivas de oxígeno tales como anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^\bullet) y oxígeno singlete (1O_2), derivados de procesos fisiológicos normales, como la fosforilación oxidativa, y por resultado de la exposición diaria a la radiación ionizante, la contaminación atmosférica, el humo del cigarrillo, entre otros (Halliwell 2000).

Los radicales libres son especies muy reactivas que pueden dañar biomoléculas como carbohidratos, proteínas, lípidos, y ADN y, por consiguiente, afectar la membrana plasmática y organelas como la mitocondria y el núcleo celular (Choksi *et al.* 2004). La célula se protege de los radicales libres mediante la acción de sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), lactoferrina, catalasa y la glutatión peroxidasa, y de sistemas no enzimáticos donde se incluyen antioxidantes como las vitaminas C y E, flavonoides y carotenoides dietarios (Szeto *et al.* 2002; Yilmaz *et al.* 2003). Sin embargo, cuando los radicales libres producidos en el organismo sobrepasan la capacidad de la célula para protegerse o repararse por sí misma, conducen al estrés oxidativo, el cual está asociado a enfermedades degenerativas o crónicas (Mark & McCalland 1999; Dinçer *et al.* 2003). Es muy frecuente que en los alimentos se presente un fenómeno de auto-oxidación, principalmente en los lípidos, donde la inestabilidad es causada por ataque de radicales, luz, calor, radiaciones o por trazas de metales (Burton & Ingold 1986).

La reacción de oxidación presenta las fases de iniciación, propagación y terminación (Ingold 1961), las cuales se muestran a continuación, donde R representa un grupo funcional:





1.7.2. Compuestos antioxidantes

La acción oxidativa causada por los radicales libres puede ser neutralizada mediante el uso de antioxidantes naturales o sintetizados químicamente, aunque ellos nunca mejoran ni regeneran la calidad de un producto altamente oxidado. Algunos antioxidantes como la quercetina, el α -tocoferol, el β -caroteno y el ácido ascórbico han demostrado efecto protector contra gran variedad de enfermedades (Sierens *et al.* 2002; Da silva *et al.* 2002; Wilms *et al.* 2005). No obstante, algunos antioxidantes han mostrado efectos pro-oxidantes a altas concentraciones, limitando su uso en terapias de enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Fuchs 1998).

Los compuestos antioxidantes mencionados previamente, y muchos otros, tienen su principal origen en los vegetales. Sin embargo, en muchos casos por deficiencia dietaria, no están presentes en cantidades adecuadas o simplemente al consumirlos en forma de pulpas de frutas o jugos, ya se ha inhibido su acción debido a procesos preparativos inadecuados. Por lo anterior, la búsqueda de alimentos nutraceuticos a partir de procesos de elaboración que permitan conservar los compuestos antioxidantes naturales, tiene gran interés en la industria alimentaria y farmacéutica.

Los antioxidantes se clasifican de acuerdo a su modo de acción en primarios y secundarios. Los antioxidantes primarios son interruptores de la reacción de propagación, atrapando radicales libres. Los antioxidantes secundarios reducen la velocidad de iniciación de diferentes formas (Shahidi *et al.* 1992), siendo además desactivadores de $^1\text{O}_2$, *i.e.* carotenoides tipo β -caroteno o licopeno, los agentes quelantes de metales, *i.e.* EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o los agentes reductores, *i.e.* ácido ascórbico (Madhavi *et al.* 1995).

Un antioxidante primario es un compuesto fenólico, fenilamina o cualquier sustancia que contiene al menos un grupo hidroxilo, tiol o amino unido a un anillo

bencénico (Wright *et al.* 2001), el cual es capaz de reaccionar con el radical transfiriendo átomos de H o electrones, con la resultante formación de otro radical fenoxilo, el cual debe ser más estable que el radical inicial (Leopoldini *et al.* 2004).

1.7.3. Medidas de actividad antioxidante

Un buen antioxidante debe cumplir con requisitos tales como: alta solubilidad en el medio, correcta orientación para interactuar con los radicales libres, orientarse adecuadamente en un sistema emulsificado (alimento) para proteger los lípidos oxidables, ser un buen reductor y funcionar con alta reactividad y efectividad a pH fisiológico (7,4) o en medios ácidos propios de los alimentos. Ninguno de los ensayos para medir la actividad antioxidante mide todas las características anteriores y por eso se utilizan diferentes técnicas. A continuación se describen tres de ellas.

1.7.3.1. Actividad con el radical catiónico ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio)

Este ensayo se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+}, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo que absorbe a $\lambda = 415$ ó 734 nm, y se genera por una reacción de oxidación del ABTS con persulfato de potasio (Re *et al.* 1999). La estructura del radical y la reacción que describe el proceso se muestra en la Fig. 1.7.

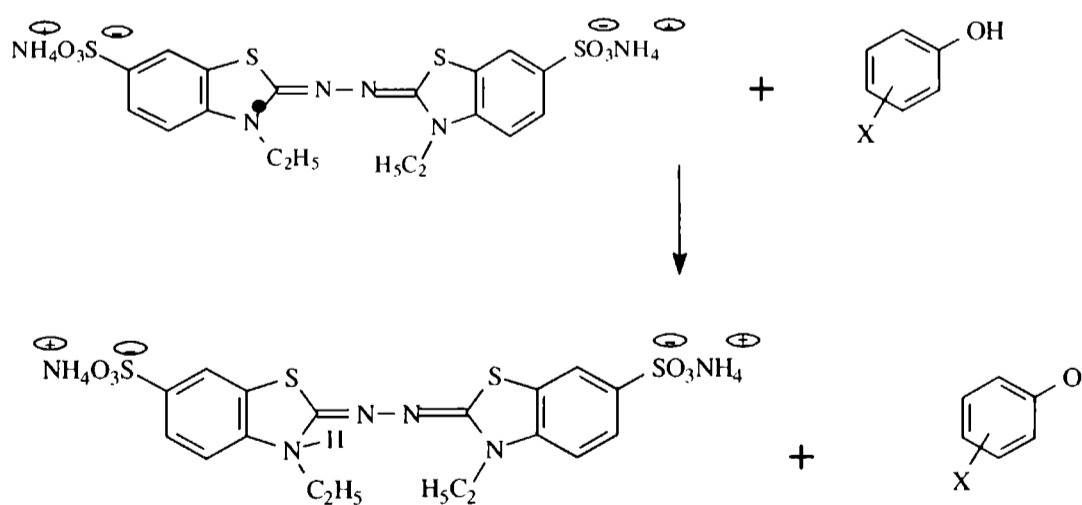


Figura 1.7. Estructura del radical ABTS^{•+} y acción antioxidante.

1.7.3.2. Actividad con el radical libre DPPH[•] (1,1-difenil-1-picrilhidrazilo)

El DPPH[•] es un radical estable de color violeta, cuya absorbancia ($\lambda = 515-517$ nm) disminuye al ser reducido por un antioxidante. Esta es la base para la medición de la capacidad antioxidante de las muestras, la cual es ampliamente usada (Brand-Williams *et al.* 1995; Choi *et al.* 2000). En la Fig. 1.8 se muestra la estructura del radical y la reacción que describe el proceso.

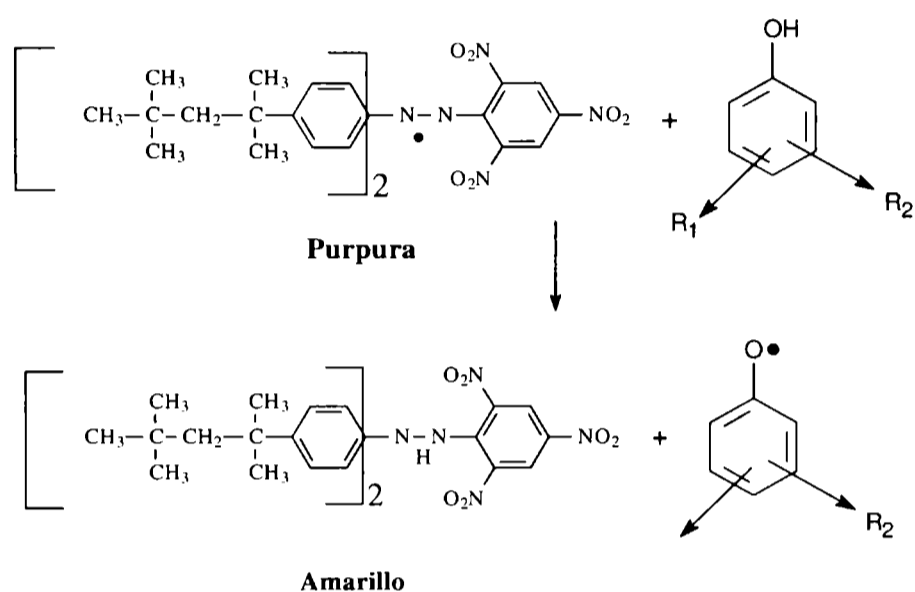


Figura 1.8. Estructura del radical libre DPPH[•] y acción antioxidante.

1.7.3.3. Ensayo FRAP (ferric reducin/antioxidant power)

Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el Fe⁺³ presente en un complejo con el 2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), hasta la forma ferrosa (Fe⁺²), la cual presenta un máximo de absorbancia a $\lambda = 590-595$ nm (Benzie & Strain 1996). La Fig. 1.9 muestra las estructuras involucradas en la reacción.

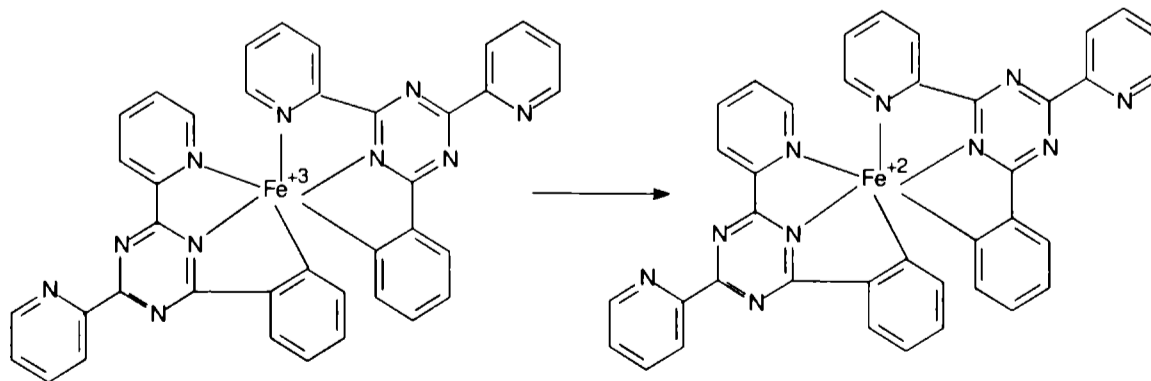


Figura 1.9. Reacción método FRAP.

1.8. OBJETIVOS

La enzima PPasa-SE de *G. klebahnii* ha sido objeto de diferentes tipos de estudio desde hace varios años, tanto por Sakai y cols. de la Universidad Prefectural de Osaka (Japón), como por Hours y cols. del CINDEFI. Estos trabajos se han centrado en la caracterización y algunos aspectos de producción de la misma, siendo escasos los estudios relacionados con su aplicación.

Por lo expresado anteriormente se estudiaron algunas condiciones de operación de biorreactores, no analizadas en trabajos previos, tales como agitación, concentración de inóculo y empleo del sistema de cultivo por lotes alimentados, las cuales han sugerido que presentan un efecto benéfico sobre la expresión de la enzima. La evaluación de estas condiciones se ha hecho con un enfoque netamente de productividad.

Luego se estudió el fenómeno de adsorción de la enzima a microfiltros de fibra de vidrio, evaluando algunos factores que influyen en el proceso y construyendo isothermas de adsorción bajo diferentes condiciones. De igual manera se estudiaron las condiciones de elución y se hizo un acercamiento al proceso de escalado.

A continuación se realizaron estudios de aplicación de la enzima en dos áreas: solubilización de pectina y maceración de tejidos vegetales. Para tal fin, se evaluaron con rigurosidad las condiciones de operación que favorezcan la acción de la enzima.

Finalmente, se hizo un estudio de actividad antioxidante y concentración de algunos compuestos fitoquímicos de los productos de maceración de tejidos vegetales, buscando evaluar su capacidad nutracéutica.

1.9. PLAN DE TRABAJO

1. Búsqueda bibliográfica. Estudio y análisis del estado del arte sobre los diferentes aspectos a desarrollar.

2. Cinética y estequiometría del proceso de producción de protopectinasa-SE (PPasa-SE) de *Geotrichum klebahnii*, en un medio sintético optimizado reportado en bibliografía. Estudio del efecto de la velocidad de agitación y la concentración de

inóculo sobre el crecimiento microbiano y expresión de PPasa-SE. Estudio de la expresión de la enzima en sistema de cultivo por lotes alimentados, bajo diferentes condiciones de alimentación; flujo constante y exponencial.

3. Purificación de la PPasa-SE del medio de cultivo por adsorción a microfiltros de fibra de vidrio. Análisis de las condiciones de pH y composición del medio que favorezcan la adsorción usando tanto la enzima purificada comercial como la enzima obtenida en el punto anterior. Construcción de isothermas de adsorción y determinación de los parámetros físicos que explican el fenómeno. Estudio del efecto de la temperatura sobre la adsorción. Análisis de las condiciones que favorecen el proceso de elución por medio de estudios de pH, fuerza iónica y composición del medio. Escalado del proceso usando balances de materia.

4. Aplicación de la PPasa-SE para la extracción de pectina a partir de tejidos de limón y naranja agria. Estudio del efecto del tamaño de partícula y la composición del medio sobre la adsorción de la enzima a protopectina de limón. Optimización de las condiciones de operación (temperatura, pH y concentración de buffer), por medio de un diseño experimental Doehlert con superficie de respuesta. Cálculo de rendimientos en la extracción de pectina a partir de protopectina y albedo de limón y naranja agria. Caracterización parcial de la pectina extraída (grado de esterificación y contenido de ácido galacturónico). Estudio cinético del proceso de adsorción de la enzima a protopectina de limón. Efecto de la concentración inicial de sustrato y de enzima sobre la velocidad inicial de reacción.

5. Aplicación de la PPasa-SE para la maceración de albedo de limón y naranja agria. Estudio del efecto de las condiciones de agitación, concentración de enzima, composición del medio y tiempo de operación, sobre el rendimiento del proceso. Cuantificación de azúcares en los sobrenadantes del proceso de maceración. Optimización de las condiciones de operación (temperatura, pH y concentración de buffer), por medio de un diseño experimental Doehlert con superficie de respuesta.

6. Cuantificación de compuestos bioactivos y determinación de la actividad antioxidante de los productos de la maceración de albedo de naranja agria.

1.10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Al-Zuhair, S. (2007) The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, **99**, 4078-4085.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J. & Serra, J. L. (1998) Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, **33**, 21-28.
- Aspinall, G. O. (1980) Chemistry of cell wall polysaccharides. *The Biochemistry of Plants*pp. 473-500.
- Bach Tuyet Lam, T. K. & Stone, B. A. (1992) Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and phalaris internodes. *Phytochemistry*, **31**, 1179-1183.
- Bateman, D. F. (1968) The enzymatic maceration of plant tissue. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **74**, 67-80.
- Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76.
- Bernhard Wehr, J., Menzies, N. W. & Blamey, F. P. C. (2004) Alkali hydroxide-Induced gelation of pectin. *Food Hydrocolloids*, **18**, 375-378.
- Biely, P. & Kremmicky, L. (1998) Yeast and their enzymes system degrading cellulose, hemicellulose and pectin. *Food technology and biotechnology*, **36**, 305-312.
- Boi, C. (2007) Membrane adsorbers as purification tools for monoclonal antibody purification. *Journal of Chromatography B*, **848**, 19-27.
- Boussaid, A. & Saddler, J. (1999) Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 138-143.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, **28**, 25-30.
- Burton, G. W. & Ingold, K. U. (1986) Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Account Chemical Research*, **19**, 194-201.
- Canteri-Schemin, M. H., Ramos, H. C., Waszczyński, N. & Wosiacki, G. (2005) Extraction of pectin from apple pomace. Brazilian archives of biology and technology. *Brazilian archives of biology and technology*, **48**, 259-266.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Mignone, C. F. (1999) Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnology Techniques*, **13**, 385-390.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Mignone, C. F. (2000) Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **25**, 260-265.
- Charcosset, C. (2006) Membrane processes in biotechnology: An overview. *Biotechnology Advances*, **24**, 482-492.
- Chen, Y. S., Chang, C. S. & Suen, S. Y. (2007) Protein adsorption separation using glass fiber membranes modified with short-chain organosilicon derivatives. *Journal of Membrane Science*, **305**, 125-135.

- Choi, H. S., Song, H. S., Ukeda, H. & Sawamura, M. (2000) Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**, 4156-4161.
- Choksi, R. B., Boylston, W. H., Rabek, J. P., Widger, W. R. & Papaconstantinou, J. (2004) Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2**, 95-101.
- Contreras Esquivel, J. C. (2003) *Purificación y caracterización de enzimas solubilizadoras de pectina de Aspergillus kawachii*. Universidad Nacional de la Plata.
- Contreras Esquivel, J. C., Hours, R. A., Aguilar, C., Reyes Vega, M. L. & Romero, J. (1997) Revisión: Extracción microbiológica y enzimática de pectina. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **47**, 208-216.
- Da Silva, E. G., Borges, M., Medina, C., Piccoli, R. H. & Schwan, R. F. (2005) Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, **5**, 859-865.
- Da silva, J., Herrmann, S. M., Heuser, V., Peres, W., Possa Marrón, N., Gonzalez-Gallego, J. & Erdtmann, B. (2002) Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, **40**, 941-947.
- Darvill, A. G., McNeil, M. & Albersheim, P. (1978) Structure of plant cell walls VIII: a new pectic polysaccharide. *Plant Physiology*, **62**, 418.
- Darvill, A. G., McNeil, M., Albersheim, P. & Delmer, D. P. (1980) The primary cell walls of flowering plants, the biochemistry of plants. Academic press, New York.
- De Bruijn, J. & Biekman, E. (1998) Enzymatic maceration of potatoes: influence of reaction conditions. *Agro-Ciencia*, **14**, 245-250.
- de Vries, J. A., Rombouts, F. M., Voragen, A. G. & Pilnik, W. (1982) Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydrate Polymers*, **2**, 25-33.
- Dinçer, Y., Akçay, T., Ilkova, H., Alademir, Z. & Özbay, G. (2003) DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with Type I diabetes mellitus. *Mutation Research*, **527**, 49-55.
- Fane, A. G. & Radovich, J. M. (1990) Membrane systems. *Separation Processes in Biotechnology* (ed J. A. Asenjo), pp. 209-262. Marcel Dekker. Inc. and Basel, New York.
- Fry, S. C. (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **37**, 165-186.
- Fuchs, J. (1998) Potentials and limitations of the natural antioxidants alpha-Tocopherol, L-Ascorbic Acid and Beta-Caroteno in cutaneous photoprotection. *Free Radical Biology and Medicine*, **25**, 848-873.
- Gama, F. M., Teixeira, J. A. & Mota, M. (1994) Cellulose Morphology and Enzymatic Reactivity: A Modified Solute Exclusion Technique. *Biotechnology and Bioengineering*, **43**, 381-387.
- Gan, Q., Allen, S. J. & Taylor, G. (2003) kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulase: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*, **38**, 1003-1018.
- Ghosh, R. (2002) Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. *Journal of Chromatography A*, **952**, 13-27.
- Halliwell, B. (2000) The antioxidant paradox. *Lancet*, **355**, 1179-1180.

- Hoondal, G. S., Tiwari, R. P., Tewari, R., Dahiya, N. & Beg, Q. K. (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**, 409-418.
- Iglesias, M. T. & Lozano, J. E. (2004) Extraction and characterization of sunflower pectin. *Journal of Food Engineering*, **62**, 215-223.
- Ingold, K. U. (1961) Inhibition of the autoxidation of organic substances in the liquid phase. *Chemical Reviews*, **61**, 563-589.
- Ishii, S. (1976) Enzymatic maceration of plant tissues by endo-pectin lyase and endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicum*. *Phytopathology*, **66**, 281.
- Ishii, S. (1984) Cell wall cementing materials of grass leaves. *Plant Physiology*, **76**, 959-961.
- Ishii, T. (1991) Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls. *Carbohydrate Research*, **219**, 15-22.
- Jayani, R. S., Saxena, S. & Gupta, R. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, **40**, 2931-2944.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G. & Vicaria, J. M. (2004) Kinetic model for lactose hydrolysis in a recirculation hollow-fibre bioreactor. *Chemical Engineering Science*, **59**, 397-405.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S. & Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, **77**, 215-227.
- Keijbets, M. J. H., Pilnik, W. & Vaal, J. F. A. (1976) Model studies on behaviour of pectic substances in the potato cell during boiling. *Potato Research*, **19**, 289.
- Landbo, A., Kaack, K. & Meyer, A. S. (2007) Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **8**, 135-142.
- Larone, D. H. (1995) *Medically Important Fungi - A guide to Identification*. Washington D.C.
- Leopoldini, M. M. T., Russo, N. & Toscano, M. (2004) "Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism". *Journal of Physical Chemistry A*, **108**, 4916-4922.
- Madhavi, D., Deshpande, S. & Salunkhe, D. (1995) *Food antioxidants. Technological and health perspectives*. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Mark, R. & McCalland, B. (1999) Can antioxidants vitamins materially reduce oxidative damage in humans?. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1034-1053.
- Marry, M., McCann, M. C., Kolpak, F., White, A. R., Stacey, N. J. & Roberts, K. (2000) Extraction of pectic polysaccharides from sugar-beet cell walls. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **80**, 17-28.
- McLaren, D. & Packer, L. (1970) Some aspects of enzyme reactions in heterogeneous systems. *Advances in Enzymology* (ed F. F. Nord), pp. 245-308. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C. & Albersheim, P. (1984) Structure and function of the primary cell wall of plants. *Annual Review of Biochemistry*, **53**, 625-631.
- Missang, C. E. (1999) Study of diffusion and adsorption processes during the maceration apple tissue by polygalacturonases. *Food Biotechnology*, **13**, 67-91.

- Movagarnejad, K., Sohrabi, M., Kaghazchi, T. & Vahabzadeh, F. (2000) A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid-liquid systems. *Biochemical Engineering Journal*, **4**, 197-206.
- Nakamura, K. & Matsumoto, K. (1998) Adsorption behavior of BSA in microfiltration with porous glass membrane. *Journal of Membrane Science*, **145**, 128.
- Nakamura, T., Hours, R. A. & Sakai, T. (1995) Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science*, **60**, 468-472.
- Northcote, D. H. (1986) Control of pectin synthesis and deposition during plant cell wall growth. *Chemistry and function of pectin*. ACS (eds M. L. Fishman & J. J. Jen), pp. 0-134. Symposium Series 310, Washington DC.
- Oosterveldt, A., Grabber, J. H., Beldman, G., Ralph, J. & Voragen, A. G. (1997) Formation of ferulic acid dehydrodimers through oxidative cross-linking of sugar beet pectin. *Carbohydrate Research*, **300**, 179-189.
- Phillips, M., Cormier, J., Ferrence, J., Dowdb, C., Kiss, R., Lutz, H. & Carter, K. (2005) Performance of a membrane adsorber for trace impurity removal in biotechnology manufacturing. *Journal of Chromatography A*, **1078**, 74-82.
- Pilnik, W. & Rombouts, F. M. (1979) Utilization of pectic enzymes in food production, Food Science and Technology. Elsevier, Amsterdam.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231-1237.
- Rexova-Benková, L. & Markovic, O. (1976) Pectic enzymes. *Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.* (eds Tipson & D.Horton).
- Rojas, N. L., Cavalitto, S. F., Mignone, C. F. & Hours, R. A. (2008) Role of PPase-SE in *Geotrichum klebahnii*, a yeast-like fungus able to solubilize pectin. *Electronic Journal of Biotechnology*, **11**, 1-8.
- Rombouts, F. M. & Pilnik, W. (1978) Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochemistry*, **13**, 9-13.
- Saiful, Borneman, S. & Wessling, M. (2006) Enzyme capturing and concentration with mixed matrix membrane adsorbers. *Journal of Membrane Science*, **280**, 406-417.
- Sakai, T. (1992) Degradation of pectins. *Microbial degradation of natural products* (ed G. Winkelmann), pp. 57-81. Weinheim.
- Sakai, T. & Okushima, M. (1978) Protopectin solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agriculture and Biological Chemistry*, **42**, 2427-2429.
- Sakai, T. & Okushima, M. (1980) Microbial production of pectin from citrus peel. *Applied and Environmental Microbiology*, **39**, 908-912.
- Sakai, T. & Okushima, M. (1982) Purification and crystallization of protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agriculture and Biological Chemistry*, **46**, 667-676.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. & Vandamme, J. (1993) Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, **39**, 213-294.

- Sakamoto, T., Hours, R. A. & Sakai, T. (1995) Enzymatic pectin extraction from protopectins using microbial protopectinases. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **58**, 353-358.
- Salvador, L. D., Suganuma, T., Kitahara, K., Fukushige, Y. & Tanoue, H. (2002) Degradation of cell wall materials from sweetpotato, cassava, and potato by a bacterial protopectinase and terminal sugar analysis of the resulting solubilized products. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **93**, 64-71.
- Sarioglu, K., Demir, N., Acar, J. & Mutlu, M. (2001) The use of commercial pectinase in the fruit juice industry, part 2: Determination of the kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase. *Journal of Food Engineering*.
- Sato, S. (1968) Enzymatic maceration of plant tissue. *Physiologia Plantarum*, **21**, 1067-1075.
- Selvendran, R. R. (1985) Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. *Journal of Cell Science*, 1985.
- Selvendran, R. R. & O'Neil, M. A. (1987) Isolation and analysis of cell walls from plant materials. *Methods in Biochemistry*, **32**, 153.
- Shahidi, F., Janitha, P. K. & Wanasundara, P. D. (1992) Phenolic Antioxidants. Critical Reviews. *Food Science and Nutrition*, **32**, 67-103.
- Shkodina, O. G., Zeltser, O. A., Selivanov, N. Y. & Ignatov, V. V. (1998) Enzymatic extraction of pectin preparations from pumpkin. *Food Hydrocolloids*, **12**, 313-316.
- Sierens, J., Hartley, J. A., Campbell, M. J. & Leatherm, A. J. C. (2002) In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide induced DNA damage in sperm. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, **22**, 227-234.
- Suck, K., Walter, J., Menzel, F., Tappe, A., Kasper, C., Naumann, C., Zeidler, R. & Scheper, T. (2006) Fast and efficient protein purification using membrane adsorber systems. *Journal of Biotechnology*, **121**, 361-367.
- Sun Bok Lee, H. S. S. & Dewey, D. Y. R. (1982) Adsorption of cellulose on cellulose: effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 2137-2153.
- Sutton, D. A., Fothergill, A. W. & Rinaldi, M. (1988) Guide to Clinically Significant Fungi. Baltimore.
- Szeto, Y. T., Collins, A. R. & Benzie, I. F. F. (2002) Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. *Mutation Research*, **500**, 31-38.
- Tanaka, M., Ikeseke, M. & Matsuno, R. (1988) Effect of pore size in substrate and diffusion of enzyme on hydrolysis of cellulosic materials with cellulases. *Biotechnology and Bioengineering*, **32**, 698-706.
- Tatsumi, H., Katano, H. & Ikeda, T. (2006) Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose by cellobiohydrolase using an amperometric biosensor. *Analytical Biochemistry*, **357**, 257-261.
- Tejeda, A., Montesinos, R. M. & Guzmán, R. Z. (1995) Bioseparaciones. INISON, Sonora, México.
- Thömmes, J. & Kula, M. R. (1995) Membrane chromatography- an integrative concept in downstream processing of proteins. *Biotechnology Progress*, **11**, 357-367.
- Timell, T. E. (1967) Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Science and Technology*, **1**, 45-70.

- Van Buren, J. P. (1991) The Chemistry and Technology of Pectin. (ed R. H. Walter), pp. 1-22. Academic Press, San Diego.
- Voragen, A. G. & Pilnik, W. (1989) pectin-degrading enzymes in fruit and vegetable processing. *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, 93-115.
- Voragen, A. G., Pilnik, W., Thibault, J., Axelos, M. A. & Renard, C. (1995) Pectins. *Food polysaccharide and their applications* (ed A. M. Stephen), pp. 287-339. Marcel Dekker, New York.
- Walter, R. H. (1991) The chemistry and technology of pectin. Academic Press, San Diego.
- Wilkie, K. & Woo, S. (1977) A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, **57**, 145-162.
- Willats, W. G. T., Knox, J. P. & Mikkelsen, J. D. (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 97-104.
- Wilms, L. C., Hollman, P. C. H., Boots, A. W. & Kleinjans, J. C. S. (2005) Protection by quercetin and quercetin-rich juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutation Research*, **582**, 155-162.
- Wright, J. S., Johnson, E. R. & Dilabio, G. A. (2001) Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *Journal of American Chemical Society*, **123**, 1173-1183.
- Yilmaz, S., Ozan, S., Benzer, F. & Canatan, H. (2003) Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism. *Cell biochemistry and function*, **21**, 325-340.
- Zapata Zapata, A. D., Escobar Guerra, C. A., Cavalitto, S. F. & Hours, R. A. Solubilización enzimática de pectina de cáscara de limón con Protopectinasa-SE. *VITAE* . 2008.
Ref Type: In Press
- Zapata Zapata, A. D., Sainz, R. B., Cavalitto, S. F. & Hours, R. A. (2007) Maceración de Albedo de Limón con Protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii*. *Congreso Argentino de Microbiología*.
- Zhongdong, L., Guohual, W., Yunchang, G. & Kennedy, J. F. (2006) Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. *Carbohydrate Polymers*, **64**, 548-552.

CAPITULO 2

CRECIMIENTO DE *Geotrichum klebahnii* Y PRODUCCIÓN DE PROTOPECTINASA-SE EN SISTEMAS DE CULTIVO TIPO LOTE Y LOTE ALIMENTADO

RESUMEN

Se cultivó *Geotrichum klebahnii* en sistemas tipo lote y lote alimentado, usando un medio de cultivo conteniendo glucosa (como fuente de carbono y energía), urea (como fuente de nitrógeno), sales y micronutrientes. Inicialmente, se empleó un biorreactor de 1,5 L, observando que al cabo de 32 h de fermentación se alcanzó una concentración de biomasa de 5,2 g/L y una actividad enzimática de 80 U/mL, lo cual equivale a una productividad de 2.500 U/L.h y una actividad específica de $1,5 \times 10^4$ U/g de biomasa. Bajo estas condiciones no se observó la formación de productos diferentes de biomasa, CO₂ y la enzima, y se obtuvo una velocidad máxima de crecimiento de 0,29 h⁻¹. Estudios desarrollados en frascos agitados de 1.000 mL, con 100 mL de medio, mostraron que la concentración de inóculo no presenta efecto significativo sobre la producción de PPasa-SE. Se encontró además que un aumento en la velocidad de agitación favorece la producción de la enzima, lo cual indica un efecto importante de la concentración de oxígeno disuelto. Un sistema de cultivo en lote alimentado, en un biorreactor de 5.0 L, usando flujo constante y velocidad específica de crecimiento (μ_0) = 0,20 h⁻¹), permitió obtener una mayor productividad (7.200 U/L.h) y actividad específica ($3,1 \times 10^4$ U/g de biomasa), en comparación con las alcanzadas usando el sistema de cultivo en lote.

2.1. INTRODUCCIÓN

Geotrichum klebahnii produce una endopoligalacturonasa (EC 3.2.1.15) denominada Protopectinasa-SE (PPasa-SE), la cual posee actividad solubilizadora de pectina. El nombre PPasa otorgado a este tipo de enzimas permite diferenciarlas de las clásicas poligalacturonasas, las cuales no presentan actividad solubilizadora de pectina a partir de protopectina (Sakai 1992). No existen reportes relacionados con otra enzima extracelular producida por *G. klebahnii*, por esta razón la producción de PPasa-SE puede ser cuantificada en base a la medida de la actividad poligalacturonasa (PGasa) en el sobrenadante del cultivo (Cavalitto & Mignone 2007).

El gran potencial de aplicación industrial de PPasa-SE en procesos de extracción de pectina y maceración de tejidos vegetales, permite que todos los estudios relacionados con su producción, encaminados a aumentar su productividad, tengan gran importancia. En los últimos años, se han publicado diferentes trabajos sobre el crecimiento del hongo y la producción de PPasa-SE, tanto en sistemas de cultivo por lotes como continuos (Cavalitto *et al.* 2000; Ferreyra *et al.* 2002; Cavalitto & Mignone 2007). En ellos se describen diferentes características del metabolismo del hongo y la expresión de la enzima, *i.e.* la ausencia de represión catabólica en la producción de la enzima, el aumento de la expresión de la enzima en cultivos restringidos (continuos) y la directa relación entre el crecimiento del hongo y la expresión de PPasa-SE. Estos hechos sugieren que un sistema de cultivo en lote alimentado puede potenciar la expresión de la enzima, con el objetivo de aumentar la productividad del proceso (Boussaid & Saddler 1999; Zhou *et al.* 2004).

En este trabajo de Tesis se continuó y profundizó con las investigaciones antes mencionadas. Particularmente, en el presente Capítulo se muestran los resultados obtenidos acerca de los parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de *G. klebahnii* en un medio de cultivo sintético propuesto anteriormente (Cavalitto & Mignone 2007). De igual manera, se presentan los estudios relacionados con la influencia de factores como: concentración de inóculo y velocidad de agitación sobre la expresión de PPasa-SE. Posteriormente, se describe un estudio relacionado con el efecto que tiene el sistema de cultivo por lote alimentado (*batch* alimentado) sobre la producción de la enzima, y se compara con la obtenida en un sistema de cultivo por lote

(*batch*). Las diferentes terminologías mencionadas previamente para definir los sistemas de cultivo serán empleadas indistintamente dentro del desarrollo de esta tesis.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Reactivos químicos

Ácido poligalacturónico (PGA) y ácido galacturónico monohidrato (AGA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, EE.UU). Todos los demás reactivos empleados fueron comercialmente disponibles y 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 conservación de la cepa por periodos de tiempo mayores de 6 meses se llevó a cabo mediante dos procedimientos de diferentes: a) congelación a -70 °C en solución de glicerol (15 % v/v), y b) liofilización con leche descremada comercial (10 % p/v) e inositol trifosfato (4 % p/v) como crioprotectores. A partir de las muestras congeladas se hicieron repiques en tubos de ensayo con medio de cultivo YPD (extracto de levadura, peptona y glucosa) cuya composición se muestra en la Tabla 2.1 (Sakai & Okushima 1982). Los cultivos se incubaron a 30 °C hasta crecimiento abundante y se mantuvieron a 4 °C bajo capa de vaselina estéril, durante un máximo de 6 meses, tiempo a partir del cual se descartan. Previo a cada fermentación se hicieron repiques sobre YPD a partir de los cultivos almacenados a 4 °C, y a partir de ellos se prepararon los inóculos de los distintos ensayos realizados.

Tabla 2.1. 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

2.2.4. Composición de los medios de cultivo

El microorganismo se cultivó en un medio sintético, optimizado previamente para la producción de la enzima (Cavalitto & Mignone 2007), el cual se denominará a partir de ahora medio de referencia (MR). Este medio contiene glucosa como fuente de carbono y energía (FCE) y urea como fuente de nitrógeno (FN) y es detallado en las Tablas 2.2, 2.3 y 2.4. Tanto el YPD como el MR fueron esterilizados en autoclave (15 min, a 121 °C) a excepción de las vitaminas y la urea las cuales fueron filtradas a través de membranas de celulosa (0,22 µm, Osmonics, EE.UU) y se agregaron al resto de los componentes del medio ya esterilizados, previamente a su inoculación.

Tabla 2.2. Medio de referencia (MR).

Componentes	Concentración (g/L)
Glucosa (FCE)	10,0
K ₂ PO ₄	2,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2
Urea	1,2
Solución de vitaminas	2,0 mL/L
Solución de cationes	2,0 mL/L
pH	2,8

Tabla 2.3. Composición de la solución de vitaminas del medio de referencia.

Solución de vitaminas	
Componentes	Concentración (g/L)
Inositol	70,0
Ácido <i>p</i> -amino benzoico	1,0
Pantotenato de calcio	4,0
D-Biotina	0,06
Piridoxina	1,0
Ácido nicotínico	12,0
Tiamina	0,6

Tabla 2.4. Composición de la solución de cationes del medio de referencia.

Solución de cationes	
Componentes	Concentración
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,2 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	60,0 µg/L

2.2.5. Cultivos en frascos agitados

Se realizó un repique en un tubo conteniendo YPD en pico de flauta. Luego de incubarlo a 30 °C por un lapso de 40-44 h, los microorganismos se resuspendieron mediante agitación en vortex con el agregado de 10 mL de agua destilada estéril, alcanzando en todos los casos una DO₆₂₀ de 0,7. Esta suspensión se utilizó para sembrar frascos de 1.000 mL de capacidad, con 100 mL de MR 1/2, con el objetivo de evitar posibles limitaciones por oxígeno. Esta relación entre el volumen de medio y el volumen del frasco busca asegurar una adecuada transferencia de oxígeno al medio. Los cultivos se realizaron en un agitador rotatorio (New Brunswick), a 30 °C y 200 rpm. El crecimiento microbiano se monitoreó por medidas de DO₆₂₀, de FCE y de pH. Luego de consumida la totalidad de FCE se tomó una muestra en tubo cónico tipo Eppendorf (1,5

ml), se centrifugó (10 min, 4 °C) a 9.000 ×g, y a partir del sobrenadante se determinó la actividad PGasa. De la misma manera, se procedió cuando el pH alcanzó un valor de 6,0 ya que la enzima es inestable a pH superiores. El incremento de pH en los 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 NH₃ y CO₂. Mientras haya FCE en el medio, el NH₃ es fijado en la biomasa. Cuando la FCE se agota, el NH₃ se libera al medio de cultivo, incrementando rápidamente el valor del pH del mismo. Se ha reportado que el pico máximo de actividad PGasa ocurre luego de agotada la FCE (Cavalitto *et al.* 2000) y también que PGasa de *G. klebahnii* es inestable a partir de valores de pH superiores a 6,0 (Iguchi *et al.* 1996), propiedad compartida por PGasas de otro origen (Pardo *et al.* 1991; Blanco *et al.* 1994).

2.2.6. Cultivo en biorreactor: sistema en lote

Biorreactor. Se utilizó un biorreactor de 1,5 L de capacidad máxima (Inceltech, LH 210). El mismo cuenta con control automático de pH y monitoreo de O₂ disuelto con un volumen de MR de 1,1 L, aproximadamente. El fermentador fue esterilizado en autoclave (15 min, a 121 °C) con el medio de cultivo.

Inóculo. En algunos casos el biorreactor fue inoculado a partir de un cultivo en frascos agitados usando MR 1/2, en otros casos a partir de la resuspensión directa de los microorganismos crecidos en medio YPD a una concentración de 1 % (v/v).

Medida de oxígeno. La determinación de oxígeno disuelto se realizó con un electrodo de tipo polarográfico (Mettler Toledo).

Medida de pH. El pH fue determinado con un electrodo de vidrio (Mettler Toledo).

Medida de gases. Las medidas de O₂ y CO₂ en los gases de salida del biorreactor fueron hechas mediante un detector de tipo paramagnético (Servomex) y con un detector infrarrojo (Horiba Pir 2000), respectivamente. El coeficiente respiratorio (CR)

se calculó como la relación entre la velocidad de formación de CO₂ (r_{CO_2}) y la velocidad de consumo de O₂ (r_{O_2}).

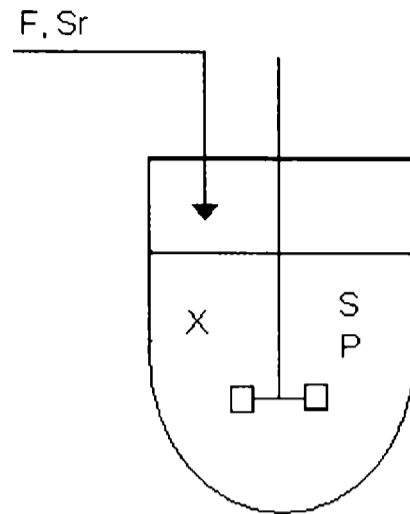
Toma de muestras líquidas. Cuando fue necesario, volúmenes de 20 mL de muestra fueron tomados del biorreactor, de los cuales 10 mL se usaron para medir biomasa, y el resto se centrifugó a $9.000 \times g$ (10 min, a 4 °C). Los sobrenadantes recuperados se guardaron en tubos tipo Eppendorf (1,5 mL) a -18 °C para la realización de las determinaciones analíticas correspondientes.

2.2.7. Cultivo en biorreactor: sistema tipo lote alimentado

Biorreactor. Se utilizó un biorreactor de 5 L de capacidad máxima (Inceltech LH 210). El mismo cuenta con control automático de pH y monitoreo de O₂ disuelto. Inicialmente *G. klebahnii* creció en sistema de cultivo por lotes usando 3 L de MR, con una agitación de 550 rpm. Después de consumida la FCE, se inició la alimentación por medio de una bomba peristáltica con 1 L de MR concentrado 3,5 veces, bajo diferentes condiciones de flujo. Cuando fue necesario la velocidad de agitación fue aumentada para evitar la limitación por oxígeno disuelto. Tanto el biorreactor como el reservorio de alimentación fueron esterilizados en autoclave (15 min, a 121 °C) con el medio de cultivo. Para la medida de pH, O₂ disuelto y gases, así como la toma de muestras líquidas, se usaron los mismos instrumentos y procedimientos descritos para el sistema de cultivo por lotes.

Inóculo. Proviene del YPD resuspendido con 10 mL de agua estéril a una concentración de 1 % (v/v).

Diseño del sistema. El diseño del cultivo en lote alimentado (concentración de FCE y velocidad de alimentación) fue realizado con base en las ecuaciones derivadas de los balances para biomasa (Ec. 2.1) y sustrato (Ec. 2.2). La nomenclatura utilizada se detalla en el diagrama que se muestra a continuación:



Balance de biomasa:

$$\frac{d(xV)}{dt} = V r_x = \mu x V \quad \text{Ec. 2.1}$$

Balance de sustrato:

$$\frac{d(sV)}{dt} = F s_r - V r_s \quad \text{Ec. 2.2}$$

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

Para el sistema de cultivo en lote alimentado se cumple que $\frac{d(sV)}{dt} = 0$

Según la ecuación de Pirt (Pirt 1975) (Ec. 2.3):

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}} + m_s x \quad \text{Ec. 2.3}$$

donde $Y_{x/s}$ es el factor másico de rendimiento de biomasa. Asumiendo que el mantenimiento celular (m_s) es despreciable, entonces: $m_s = 0$

Combinando las Ecs. 2.1, 2.2 y 2.3, y despejando F:

$$F = \frac{\mu \times V}{Y_{x/s} \text{ Sr}} \quad \text{Ec. 2.4}$$

Combinando las Ecs. 2.1 y 2.4 e integrando, para las condiciones iniciales y finales del cultivo en lote alimentado:

$$\int_{x_0 V_0}^{x_f V_f} d(xV) = Y_{x/s} \text{ Sr F} \int_0^t dt$$

$$F t = \Delta V = V_f - V_0$$

$$\text{Sr} = \frac{x_f V_f - x_0 V_0}{Y_{x/s} \Delta V} \quad \text{Ec. 2.5}$$

Las Ecs. 2.4 (cuyas condiciones corresponden a las iniciales del sistema en lote alimentado, o sea, μ_0 , x_0 y V_0) y 2.5, son denominadas ecuaciones de diseño de un sistema de cultivo en lote alimentado, donde x_0 es la concentración inicial de biomasa que corresponde a la concentración final del cultivo en la etapa *batch*, x_f es la concentración final de biomasa, V_0 es el volumen del medio de cultivo al inicio del proceso de alimentación (correspondiente al volumen trabajado en la etapa *batch*), V_f es el volumen al final del proceso de alimentación, y μ_0 es una velocidad específica de crecimiento al inicio del proceso de alimentación, la cual es definida arbitrariamente.

Usando el MR durante el cultivo *batch* es conocido que $x_0 = 5,2$ g/L, $Y_{x/s} = 0,47$. Además definiendo algunas condiciones de operación del sistema en lote alimentado: $x_f = 8,0$ g/L, $V_f = 4,0$ L y $V_0 = 3,0$ L, se pudo utilizar la ecuación de diseño 2.5 y de esta forma calcular un $\text{Sr} = 35$ g/L, equivalente a 3,5 veces la concentración de MR.

Como se aprecia en la Ec 2.4, el cálculo del flujo de alimentación depende directamente del valor de μ_0 que se defina para cada cultivo. Para el presente estudio se

usaron diferentes condiciones de flujo de alimentación: a) flujo constante ($\mu_0 = 0,25, 0,20$ y $0,15 \text{ h}^{-1}$) y b) flujo exponencial ($\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$ aprox. constante). La Tabla 2.5 muestra los diferentes flujos de alimentación calculados a partir de la Ec. 2.4 para cada una de las condiciones de alimentación a flujo constante descritas previamente. En cultivos con flujo de alimentación constantes μ disminuye progresivamente durante la fermentación.

Tabla 2.5. Flujo de alimentación para los diferentes perfiles de flujo constante.

Condición de cultivo	Flujo de alimentación (L/h)
$\mu_0 = 0,15 \text{ h}^{-1}$	0,12
$\mu_0 = 0,20 \text{ h}^{-1}$	0,16
$\mu_0 = 0,25 \text{ h}^{-1}$	0,20

La condición de alimentación exponencial fue alcanzada manualmente cambiando cada 30 min el flujo de alimentación, de tal forma que se logre mantener una velocidad de crecimiento cercana a $0,20 \text{ h}^{-1}$. La programación de los flujos de alimentación se muestra en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6. Variación de la velocidad de alimentación para la condición de flujo pseudo-exponencial.

Tiempo (h)	Velocidad de alimentación (L/h)
0	0,16
0,5	0,18
1,0	0,20
1,5	0,22
2,0	0,24
2,5	0,26
3,0	0,29
3,5	0,32
4,0	0,35

2.2.8. Determinación del K_{La}

Se realizó la determinación del K_{La} de los frascos de 1.000 ml y del biorreactor tipo tanque agitado, para poder comparar la transferencia de oxígeno que proporciona cada uno de los sistemas utilizados. Para medirlo se utilizó el clásico método del N_2SO_3 de Cooper (Cooper *et al.* 1944). En el caso de los frascos agitados, el consumo de Na_2SO_3 se determinó por el método iodométrico, mientras que en el biorreactor se determinó por el método del balance gaseoso (Cooney *et al.* 1977).

2.2.9. Medida de actividad enzimática PGasa

El método consiste en la reacción (10 min, 37 °C) de 450 μ L de PGA (20 g/L) en buffer ácido acético – acetato de Na (AcB) (20 mM, pH: 5,0) con 50 μ L de solución enzimática diluida convenientemente (Cavalitto *et al.* 2000; Ferreyra *et al.* 2002). El blanco de la reacción se realiza con enzima inactivada térmicamente (10 min, 100 °C). La reacción se detiene sumergiendo los tubos de reacción en un baño de hielo/agua por 10 min. Posteriormente, se agregan 500 μ L de reactivo Somogyi y se lleva a un baño en ebullición por 10 min. La reacción se detiene sumergiendo nuevamente en un baño de hielo/agua por 10 min. Luego se agregan 500 μ L de reactivo Nelson, se agita en vortex vigorosamente y se deja en reposo por 30 min. Finalmente se agregan 4,5 ml de agua desionizada y se lee la A_{660} . La curva de calibración se obtiene a partir de soluciones de AGA en solución de AcB (20 mM, pH: 5,0) en un intervalo de concentraciones desde 50 hasta 250 mg/L. Todas las muestras y estándares fueron tratados de igual manera a partir de la adición del reactivo Somogyi. Esta medida presentó un error promedio estadístico no mayor al 10 %. Se define una unidad de actividad PGasa se define como los μ moles de poder reductor generados por minuto en las condiciones de reacción (Cavalitto *et al.* 1999).

2.2.10. Determinación de la fuente de carbono

La concentración de glucosa se determinó por el método enzimático de glucosa oxidasa-peroxidasa (Wiener Lab., Argentina) (Bergmeyer & Bernt 1977).

2.2.11. Determinación de biomasa

La concentración de biomasa de los cultivos se determinó por medio de la medida de peso seco. Las determinaciones de peso seco se realizaron por filtración a través de membranas de celulosa (0,45 μm , Osmonics, EE.UU), luego de lo cual la biomasa retenida se lavó y se secó en estufa a 60 °C hasta a peso constante (García-Garibay *et al.* 1987).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Cinética de crecimiento de *G. klebahnii*

En la Fig. 2.1 se observa el perfil de crecimiento, concentración remanente de FCE, actividad PGasa, concentración de O₂ disuelto, r_{O_2} y r_{CO_2} durante el cultivo en biorreactor operado en sistema *batch*. Se observa que a las 32 h se consume la totalidad de la FCE, alcanzando una concentración final de biomasa de 5,2 g/L. En el momento de máximo consumo de O₂ el valor del O₂ disuelto es ~ 10 % del valor de saturación, lo cual indica que el cultivo transcurrió sin limitación en oxígeno.

En estas condiciones experimentales de cultivo se obtuvo una actividad PGasa de 80 U/mL ($1,5 \times 10^4$ U/g de biomasa). Como puede observarse, el CR fue cercano a 1 durante todo el tiempo de fermentación, valor razonable para un metabolismo completamente respiratorio usando un monosacárido como sustrato como es nuestro caso. La velocidad específica crecimiento máxima (μ_{max}) fue de 0,29 h⁻¹. Un valor de μ_{max} de 0,47 h⁻¹ fue reportado en trabajos previos para *G. klebahnii* crecido en un medio sintético similar, pero con un contenido distinto de microelementos y un pH inicial de 5,0 (Cavalitto *et al.* 2000). En esas condiciones de cultivo *G. klebahnii* crece más rápido pero produce una concentración enzimática final menor a la descrita. La productividad en la producción de PPasa-SE, reportada en unidades de actividad PGasa, fue de 2.500 U/L.h.

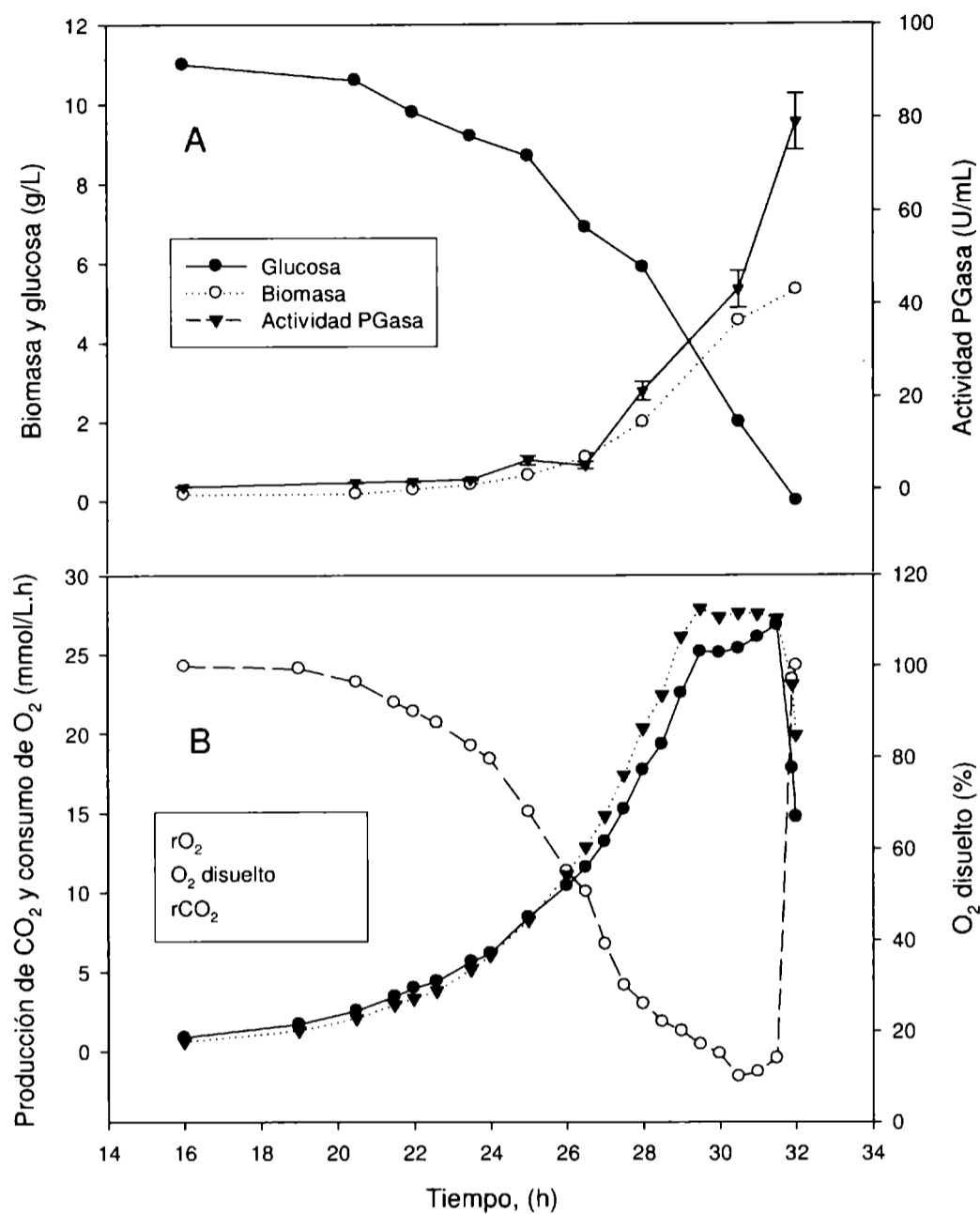
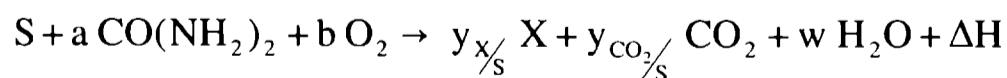


Figura 2.1. Cinética de cultivo de *G. klebahnii*. Volumen de biorreactor de 1,5 L (1,1 L volumen de medio). Condiciones de operación: 450 rpm y 30 °C.

El crecimiento de *G. klebahnii* en medio sintéticos puede ser representado mediante la siguiente ecuación estequiométrica:



donde S es la FCE, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ es urea, X es biomasa, a y b son los coeficientes estequiométricos para urea y O_2 (cantidad de urea y O_2 consumida por unidad de FCE consumida), mientras que $y_{x/s}$ e $y_{\text{CO}_2/s}$ son los factores de rendimiento para biomasa y

CO₂ (cantidad de biomasa y CO₂ producida por unidad de FCE consumida). En la Tabla 2.7 se resumen los parámetros estequiométricos del cultivo, y se muestran los resultados de los balances de carbono (BC) y energía (Bγ), calculados mediante las Ecs. 2.6 y 2.7 (Erickson *et al.* 1978)

$$BC = y_{x/s} + y_{CO_2/s} = 1 + a \quad \text{Ec. 2.6}$$

$$B\gamma = \frac{y_{x/s} \gamma_x}{\gamma_s} + \frac{4b}{\gamma_s} = 1 \quad \text{Ec. 2.7}$$

γ_x y γ_s representan los grados de reducción de biomasa y sustrato respectivamente, los cuales son definidos como el número de electrones disponibles para ser transferidos al O₂ durante la combustión de un mol de biomasa y FCE. Para el proceso los dos balances dieron cercanos a 1, lo cual indica que no hubo generación de otros productos diferentes de biomasa y CO₂ durante el proceso y que el modelo planteado representa correctamente al crecimiento de *G. klebahnii*.

Tabla 2.7. Parámetros estequiométricos del cultivo de *G. klebahnii* en sistema *batch*.

ΔS (g/L)	ΔX (g/L)	O ₂ total (mmoles)	CO ₂ total (mmoles)	$y_{x/s}$ (cmol/cmol)	$y_{CO_2/s}$	b	BC	Bγ
11,00	5,16	159,12	169,14	0,564	0,462	0,434	1,025	1,026

2.3.2. Efecto de la concentración de inóculo sobre la producción de PPasa-SE

Para estudiar el efecto de la concentración de inóculo sobre la producción de PPasa-SE, se realizaron cultivos en frascos de 1.000 mL con 100 mL de MR 1/2. Los inóculos correspondientes se obtuvieron en frascos agitados usando también MR 1/2, hasta llegar a una DO₆₂₀ de 2,1. En la Fig. 2.2 se muestran los resultados de actividad enzimática para cada una de las condiciones evaluadas. Se observa que no existen diferencias significativas entre los resultados, a excepción del obtenido a 2 % (v/v)

donde se presenta un ligero incremento en la actividad enzimática, lo cual fue confirmado mediante un test de Student a un $\alpha = 0.05$. No obstante dicha diferencia no responde a ninguna tendencia definida claramente por la concentración de inóculo, lo cual sugiere que dicha variación en la actividad puede ser atribuida a desviaciones propias del experimento.

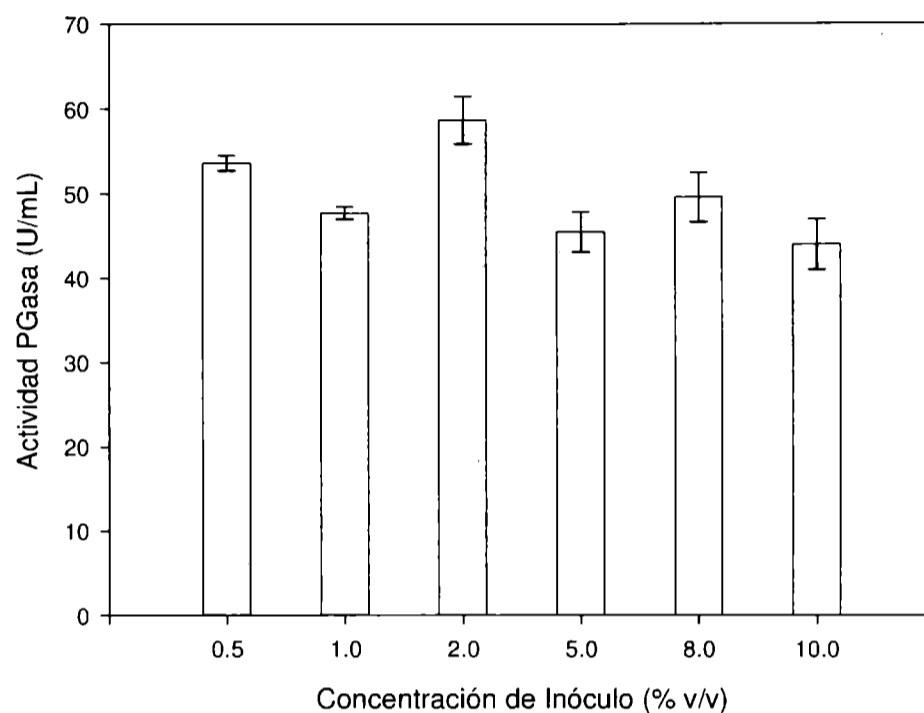


Figura 2.2. Efecto de la concentración de inóculo sobre la actividad final (PGasa) en cultivos de *G. klebahnii* realizados en frascos agitados.

Teniendo en cuenta que si existe una marcada diferencia entre los tiempos de fermentación para cada condición de concentración de inóculo (a mayor concentración de inóculo, menor tiempo de fermentación), *i.e.* 21,5 h (0,5 % v/v), 14 h (10 % v/v), la productividad, parámetro importante en procesos a mayor escala, puede variar de ~ 2.200 U/L.h hasta ~ 3.400 U/L.h. Por tal razón la selección de la concentración de inóculo durante procesos a mayor escala dependerá principalmente de la capacidad operativa de preparación de inóculo.

La diferencia presentada en la actividad PGasa obtenida entre los cultivos en frasco (~ 50 U/mL) y en biorreactor de 1,5 L (80 U/mL) se explica por la diferencia en la concentración de MR utilizada (a mayor concentración de MR, mayor actividad enzimática). Con base en ese resultado se concluye que la limitación por oxígeno que se presenta en el cultivo en frasco al final del proceso, como se demostrará posteriormente, no afecta en gran medida la actividad final de PGasa.

2.3.3. Efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de PPasa-SE

El efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de PPasa-SE se evaluó en cultivos en biorreactor de 1,5 L, usando MR y una concentración de inóculo de 2 % (v/v), crecido en MR 1/2. Los resultados se muestran en la Tabla 2.8.

Tabla 2.8. Efecto de la velocidad de agitación sobre la actividad final (PGasa), en cultivos de *G. klebahnii* realizados en biorreactor.

Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo (h)	Concentración de enzima (U/mL)	Productividad (U/L.h)
200	24,1	50 ± 2	2.075 ± 90
400	24,0	89 ± 1	3.710 ± 50
700	28,4	128 ± 5	4.510 ± 190

El valor de actividad PGasa final a 400 rpm es similar al obtenido durante el estudio cinético el cual fue realizado a 450 rpm. Esto indica que el medio de cultivo en el cual se prepara el inóculo (MR o YPD) no ejerce una influencia apreciable sobre la actividad alcanzada. Sin embargo, cuando el inóculo se preparó en YPD se observó un aumento en el tiempo de proceso con la consiguiente disminución en la productividad del mismo. Esta característica es muy importante cuando se analiza el proceso a mayor escala.

Se observa claramente que el aumento en la velocidad de agitación promovió un incremento en la actividad final de PGasa. Teniendo en cuenta que el aumento en la velocidad de agitación genera un aumento en la concentración de O₂ disuelto en el medio, los resultados indican que dicha concentración de O₂ disuelto ejerce una importante influencia sobre la expresión de la enzima.

La Tabla 2.9 muestra los valores de K_La obtenidos a diferentes niveles de agitación lo cual, junto con los requerimientos de oxígeno por parte de *G. klebahnii* calculados mediante las Ecs. 2.8, 2.9 y 2.10, es posible determinar si existió limitación por oxígeno durante el crecimiento a diferentes condiciones de cultivo.

Tabla 2.9. Efecto de las condiciones de agitación sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

Sistema de trabajo	Velocidad de agitación (rpm)	Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, $K_L a$ (h^{-1})
Erlenmeyer 1000 mL (100 mL de medio)	200	58
Biorreactor 1,5 L (1,2 L de medio)	200	80
	300	118
	400	206
	500	378
	600	601
	700	858

A partir de un balance de oxígeno se llega a la siguiente ecuación para r_{O_2} :

$$r_{O_2} = \frac{\mu \times b}{Y_{x/s}} \quad \text{Ec. 2.8}$$

Además:

$$OTR = K_L a (C^* - C_L) \quad \text{Ec. 2.9}$$

donde OTR: velocidad de transferencia de oxígeno. $K_L a$: coeficiente volumétrico de transferencia de O_2 , C^* : Solubilidad del O_2 a la temperatura de trabajo (7,5 mg/L) y C_L : Concentración de O_2 disuelto en el medio.

Durante la fermentación en sistema *batch* se cumple que $r_{O_2} = OTR$, Por lo tanto igualando las Ecs 2.8 y 2.9:

$$\frac{\mu \times b}{Y_{x/s}} = K_L a (C^* - C_L) \quad \text{Ec. 2.10}$$

Asumiendo que las condiciones de limitación en O₂ se alcanzan cuando C_L = 0, se puede calcular el K_La mínimo requerido para que no se presente limitación en O₂.

En frasco (MR 1/2): K_La mínimo requerido = 92,8 h⁻¹

En biorreactor (MR): K_La mínimo requerido = 185,7 h⁻¹

Se concluye que en las condiciones trabajadas en frascos se presenta limitación por O₂ a partir de una concentración de biomasa de 1,6 g/L (la obtenida al final del proceso fue ~ 2,6 g/L). Cuando se trabaja a velocidades de agitación menores de 400 rpm en el biorreactor, se presenta limitación por O₂, mas aún si se tiene en cuenta que el método del sulfito para la determinación del K_La sobreestima la medida.

Algunos reportes bibliográficos muestran el efecto de la velocidad de agitación sobre la expresión de enzimas fúngicas extracelulares. La producción de una PGasa proveniente de *Aspergillus sojae* es afectada positivamente por altas velocidades de agitación (Tari *et al.* 2007). La producción de pectin-liasa a partir de *A. niger* también es influenciada positivamente por el aumento en la velocidad de agitación (Friedrich *et al.* 1989). Finalmente, la producción de inulinasa a partir de *Kluveromyces marxianus* es favorecida también por el aumento en la velocidad de agitación, aunque este aumento está limitado por la muerte celular ocasionada por los esfuerzos de corte (Yépez Silva-Santistebas & Maugeri 2005). Por el contrario, la producción de pectin-liasa de *Debaryomyces nepalensis* (Gummadi & Kumar 2008) y la producción de diferentes enzimas pécticas a partir de *A. Níger* (Fawole & Odunfa 2003) están limitadas cuando los cultivos ser llevan a cabo a altas concentraciones de O₂ disuelto con altas velocidades de agitación.

2.3.4. Producción de PPasa-SE en sistema de cultivo tipo lote alimentado

Con el propósito de aumentar la actividad enzimática y por consiguiente la productividad en la expresión de PPasa-SE, se estudió un sistema de cultivo en lote alimentado. Este sistema de cultivo tiene la ventaja de permitir el control parcial o total de μ y el aumento en el crecimiento de biomasa, características importantes en la

expresión de la enzima según los estudios metabólicos previos del *G. klebahnii* (Cavalitto *et al.* 2000).

El tiempo de la etapa *batch* previa a la alimentación fue de 28 ± 3 h, diferencia que fue causada por los cambios en la concentración de células resuspendidas a partir del YPD y utilizadas como inóculo. En la Fig. 2.3 se observa que la velocidad de formación de biomasa fue aproximadamente constante en todas las condiciones de flujo de alimentación, lo cual es acorde con el comportamiento típico de un sistema de cultivo en lote alimentado (Pirt 1975). En condiciones de elevada μ_0 se reduce sustancialmente el tiempo de alimentación, lo cual es benéfico desde el punto de vista de la productividad del proceso.

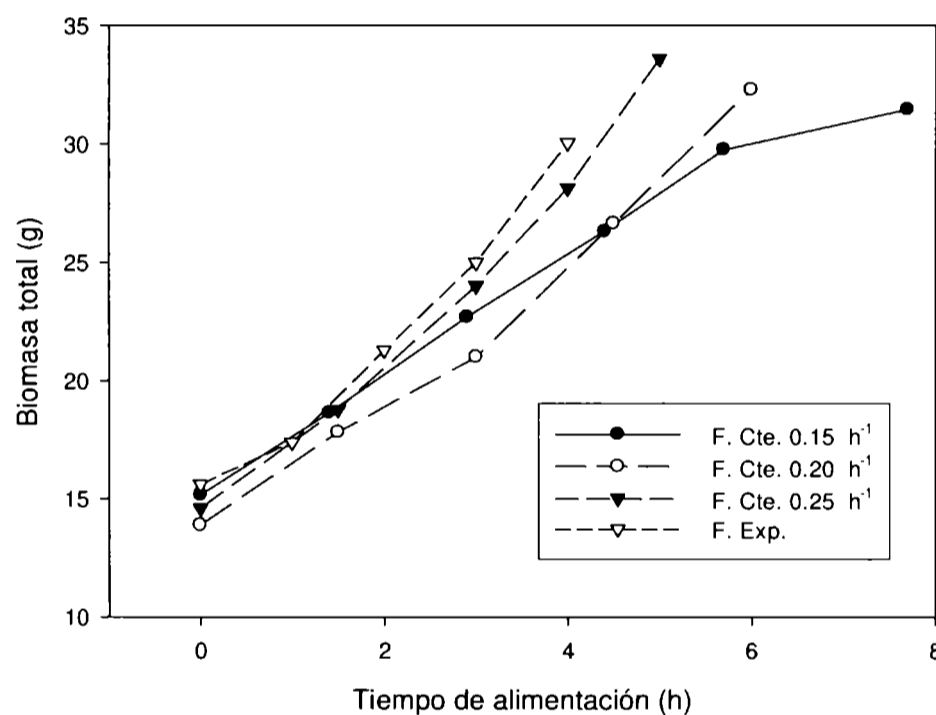


Figura 2.3. Biomasa total durante los cultivos de *G. klebahnii* en sistema tipo lote alimentado.

En la Fig. 2.4 se observa que en condiciones de flujo de alimentación constante ($\mu_0 = 0,20 \text{ h}^{-1}$), se logra la mayor actividad enzimática, la cual en términos de actividad específica ($\sim 3.1 \times 10^4 \text{ U/g}$ de biomasa) fue mayor a la obtenida en condiciones de cultivo *batch*. La Tabla 2.10 muestra los resultados de la actividad específica en cada una de las condiciones ensayadas, además de los valores de productividad calculados a partir de un tiempo de la etapa *batch* de 28 h en los cultivos tipo lote alimentado. Es importante destacar que el valor reportado de productividad puede aumentar si se reduce

el tiempo de la etapa *batch*, para lo cual se debe usar una mayor concentración de inóculo.

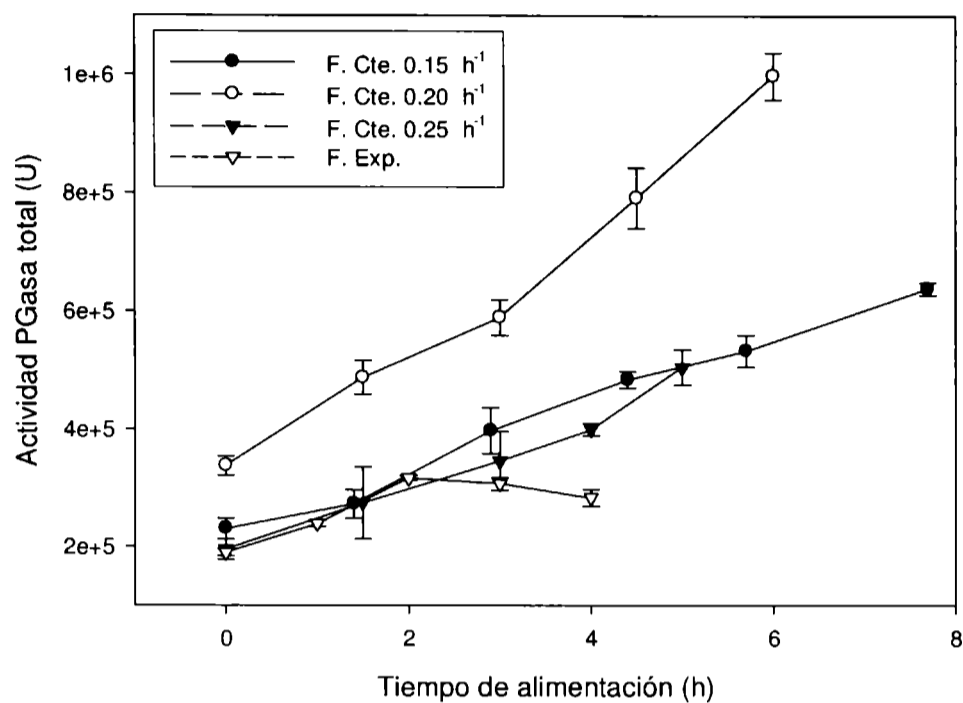


Figura 2.4. Actividad PGasa durante los cultivos de *G. klebahnii* en sistema tipo lote alimentado.

Tabla 2.10. Actividad específica y productividad en diferentes condiciones de cultivo de *G. klebahnii*

Condición de cultivo	Actividad específica (U/g de biomasa)	Productividad (U/L.h)
<i>Batch</i> , 400 rpm	15.000 ± 1.150*	2.500 ± 125*
	17.120 ± 190**	3.710 ± 50**
Lotes alimentados, $\mu_0 = 0,15 \text{ h}^{-1}$	20.300 ± 300	4.970 ± 80
Lotes alimentados, $\mu_0 = 0,20 \text{ h}^{-1}$	30.900 ± 1.260	7.940 ± 320
Lotes alimentados, $\mu_0 = 0,25 \text{ h}^{-1}$	15.020 ± 900	4.250 ± 250
Lotes alimentados, flujo pseudo-exponencial, $\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$	9.430 ± 490	2.460 ± 120

* Valor calculado con base en un tiempo de cultivo de 24 h (inoculación a partir de MR 1/2). ** Valor calculado con base en un tiempo de cultivo de 32 h (inoculación a partir de medio YPD).

En condiciones de flujo constante ($\mu_0 = 0,15 \text{ h}^{-1}$) el nivel de O_2 disuelto llegó a valores de 30 % de saturación, lo cual demuestra que no se produce limitación por O_2 .

En condiciones de flujo constante mas elevado ($\mu_o = 0,20 \text{ h}^{-1}$), la concentración de O_2 bajó drásticamente, manteniéndose en niveles cercanos al 10 % de saturación debido al aumento en la velocidad de agitación llegando a 700 rpm, aunque al final de proceso alcanzó valores de 2 %. Se observa que bajo las condiciones antes mencionadas la actividad específica y la productividad fueron mayores que las obtenidas mediante el sistema *batch*, lo cual es indicativo que la producción de PPasa-SE de *G. klebahnii* fue significativamente mayor en el sistema de cultivo restringido (lote alimentado) que en sistema de cultivo irrestricto (*batch*). En condiciones de flujo constante ($\mu_o = 0.25 \text{ h}^{-1}$) y flujo exponencial, se presentó una fuerte limitación por O_2 durante gran parte del proceso, afectando de esta manera la producción de la enzima.

Estos resultados son coherentes con estudios previos reportados (Cavalitto *et al.* 2000) donde efectivamente en los sistemas de cultivo continuo se obtuvo mayor actividad enzimática que en cultivos *batch*. Reportes bibliográficos mencionan que la productividad y la actividad específica de pectin-liasa de *D. nepalensis* cultivado en un biorreactor operado en sistema por lotes alimentados, son mayores en comparación con los valores obtenidos empleando el sistema de cultivo *batch* (Gummadi & Kumar 2008). Estos resultados son concordantes con los obtenidos en el presente estudio.

2.4. CONCLUSIONES

El crecimiento de *G. klebahnii* en un biorreactor de 1,5 L usando el medio de cultivo a base de glucosa como fuente de carbono y energía, a pH 2,8, se desarrolló con una velocidad máxima de crecimiento de $0,29 \text{ h}^{-1}$, la cual fue menor que la alcanzada con un medio de cultivo a pH 5,0, que difiere del anterior además en la composición de microelementos. Se obtuvo un rendimiento de biomasa de 0,47 g biomasa/g FCE y una actividad enzimática de $\sim 80 \text{ U/mL}$. Se obtuvo una productividad de $\sim 2.500 \text{ U/L.h}$ y una actividad específica de $\sim 15.000 \text{ U/g biomasa}$. Bajo estas condiciones de operación no se presentó limitación por oxígeno, ni formación de otros productos diferentes a biomasa, PPasa-SE y CO_2 .

No se evidenció un efecto significativo de la concentración de inóculo sobre la actividad enzimática PGasa, pero si con respecto a la productividad, siendo de $\sim 3.400 \text{ U/L.h}$, cuando se utilizó una concentración de inóculo de 10 % (v/v). Además se

observó que el aumento en la velocidad de agitación en el biorreactor genera un importante aumento en la expresión de PPasa-SE, indicando así que fuertes limitaciones de oxígeno pueden afectar la actividad enzimática alcanzada.

Durante el crecimiento de *G. klebahnii* en biorreactor, usando un sistema de cultivo tipo lote alimentado, se observó que en condiciones de flujo constante a una μ_0 0,20 h⁻¹, se obtiene un mayor rendimiento en la producción de PPasa-SE y una mayor actividad específica, en comparación de la obtenida en sistemas de cultivo *batch*.

2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bergmeyer, H. U. & Bernt, E. (1977) Methods of enzymatic analysis. Academic Press, New York.
- Blanco, P., Sierio, C., Diaz, A. & Villa, T. G. (1994) Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal and Microbiology*, **40**, 974-977.
- Boussaid, A. & Saddler, J. (1999) Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 138-143.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Mignone, C. F. (1999) Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnology Techniques*, **13**, 385-390.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Mignone, C. F. (2000) Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **25**, 260-265.
- Cavalitto, S. F. & Mignone, C. F. (2007) Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Process Biochemistry*, **42**, 175-179.
- Cooney, C. L., Wang, H. & Wand, D. (1977) Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, **19**, 55-67.
- Cooper, C. M., Fernstrom, G. A. & Miller, S. A. (1944) Performance of Agitated Gas-Liquid Contactor. *Industrial & Engineering Chemistry*, **36**, 504-509.
- Erickson, L. E., Minkevich, I. G. & Eroshin, V. K. (1978) Application of mass and energy balance regularities in fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **20**, 1595-1621.
- Fawole, O. B. & Odunfa, S. A. (2003) Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **52**, 223-227.
- Ferreya, O. A., Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Ertola, R. J. (2002) Influence of trace elements on enzyme production: Protopectinase expression by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 498-504.
- Friedrich, J., Cimermenm, A. & Stein, W. (1989) Sumerged production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: effect of different aeration/agitation regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **31**, 490-494.

- Garcia-Garibay, M., Gomez-Ruiz, L. & Bárzana, E. (1987) Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology Letters*, **9**, 411-416.
- Gummadi, S. N. & Kumar, D. S. (2008) Batch and fed batch production of pectin lyase and pectate lyase by novel strain *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor. *Bioresource Technology*, **99**, 874-881.
- Iguchi, K., Kishida, M. & Sakai, T. (1996) Purification and characterization of three extracellular protopectinases with polygalacturonase activities from *Trichosporon penicillatum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **60**, 603-607.
- Pardo, C., Lapeña, M. A. & Gacto, M. (1991) Purification and characterization of an extracellular exopolygalacturonase from *Geotrichum lactis*. *Canadian Journal and Microbiology*, **37**, 974-977.
- Pirt, S. J. (1975) Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publication, Oxford, England.
- Sakai, T. (1992) Degradation of pectins. *Microbial degradation of natural products* (ed G. Winkelmann), pp. 57-81. Weinheim.
- Sakai, T. & Okushima, M. (1982) Purification and crystallization of protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agriculture and Biological Chemistry*, **46**, 667-676.
- Tari, C., Gogus, N. & Tokatli, F. (2007) Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1108-1116.
- Yépez Silva-Santistebas, B. O. & Maugeri, F. (2005) Agitation, aeration and shear stress as key factors in pectinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **36**, 717-724.
- Zhou, X., Chen, H. & Li, Z. (2004) CMCase activity assay as a method for cellulase adsorption analysis. *Enzyme and Microbial Technology*.

CAPÍTULO 3

RECUPERACIÓN PRIMARIA DE PROTOPECTINASA-SE DE *Geotrichum klebahnii* POR ADSORCIÓN A MICROFILTROS DE FIBRA DE VIDRIO

RESUMEN

Mediante un procedimiento de filtración, se observó que PPasa-SE de *G. klebahnii* se adsorbe a microfiltros de fibra de vidrio (MFV) con un área específica de ~ 165 m²/g. La adsorción fue instantánea, por lo que las posibles limitaciones difusionales del sistema podrían ser descartadas. En presencia de citrato, la adsorción del 80-90 % en el rango de pH 2,0-5,0, aunque la presencia de fosfato a pHs > 3,0 reduce la adsorción hasta niveles del 20 %. Las isotermas de adsorción se ajustaron al modelo de Langmuir sólo cuando la relación entre el volumen de filtrado y el área efectiva del MFV fue $\geq 0,29$ mL/cm² y la conductividad de la solución es $\leq 2,5$ mS/cm (definida por el grado de dilución de la solución enzimática). Bajo estas condiciones los parámetros del modelo fueron $q_m = 98,6 \pm 7,5$ U/cm² y $K_d = 6,1 \pm 3,4$ U/mL. La temperatura no ejerció un efecto significativo sobre los parámetros de adsorción. La elución de la enzima no dependió del tipo de buffer empleado pero si de la conductividad del mismo. Se demostró que el buffer ácido cítrico – citrato de Na (10 mM, pH 5,0), con un contenido de 0,5 M de NaCl (conductividad de ~ 20 mS/cm) es adecuado para la elución. Por medio de un balance de materia y del modelo de Langmuir se diseñó un proceso a mayor escala, con el propósito de adsorber 1.000 mL de una solución PPasa-SE (80 U/mL), alcanzando un 95 % de adsorción, que disminuyó a 82 % en presencia de células de *G. klebahnii*. A esta escala se obtuvo ~ 90 % de eficiencia en la elución y un factor de concentración entre 5,1× y 6,9×.

3.1. INTRODUCCIÓN

La microfiltración es una operación empleada para clarificar soluciones de proteínas como etapa previa a la filtración esterilizante (con membranas de 0,22 μm), para separar biomasa de los medios de fermentación y otras aplicaciones menores. En un trabajo reciente (Voget *et al.* 2008) se descubrió que los microfiltros de fibra de vidrio borosilicato (MFV) tenían la capacidad de adsorber las poligalacturonasas (PGasas) no ácidas y otras enzimas extracelulares producidas por el hongo *Aspergillus kawachii*. Los antecedentes de esta técnica se pueden remontar a los trabajos realizados en vidrio borosilicato con diferentes proteínas y péptidos (Messing 1975; Slack & Horbett 1991; Duncan *et al.* 1994; Nakamura & Matsumoto 1998; Nakamura & Matsumoto 2006; Chen *et al.* 2007).

Los MFV no son estrictamente membranas sino filtros de profundidad, aunque con la geometría típica de las membranas. Los MFV están formados por microfibras de vidrio borosilicato de diámetro variable (0.2-2 μm) entrelazadas de manera que forman una matriz porosa. El tamaño nominal de poro de estos microfiltros está en el rango de 0,5-3,0 μm , y en algunos filtros las fibras están embebidas con una resina acrílica (*binder*) para mejorar su resistencia mecánica.

Aprovechando las propiedades de adsorción de los MFV, así como el hecho de que la elución de las PGasas adsorbidas puede ser lograda fácilmente con una solución buffer con pH y conductividad adecuadas, se desarrolló un método sencillo para la recuperación primaria de PPasa-SE del medio de cultivo. El mismo consistió en las tres etapas de los procesos de adsorción: a) contacto de la solución de proteínas con el adsorbente (en este caso una simple filtración a través del MFV), b) lavado con buffer para eliminar los compuestos no adsorbidos, y finalmente c) la elución.

Geotrichum klebahnii es un hongo levaduriforme que al crecer en medios de cultivo sintéticos produce una única endo-PGasa, denominada PPasa-SE por su capacidad de solubilizar pectina a partir de protopectina (Sakai *et al.* 1993). A escala de laboratorio se ha encontrado que esta enzima es altamente eficiente en la extracción de pectina a partir cáscaras de cítricos y en la maceración de tejidos de plantas (Nakamura *et al.* 1995; Zapata Zapata *et al.* 2007; Zapata Zapata *et al.* 2008b). Experimentos preliminares mostraron que la PPasa-SE puede ser adsorbida por los MFV de forma

similar a lo observado con las PGasas de *A. kawachii*. El resultado final fue una solución concentrada y parcialmente purificada de PPasa-SE de *G. klebahnii*.

Uno de los mayores desafíos en los procesos de separación y purificación de biomoléculas es su concentración, ya que originalmente suelen estar en baja concentración y grandes volúmenes de líquido. La PPasa-SE resulta ser un interesante modelo para estudiar la recuperación primaria de enzimas extracelulares de caldos de cultivo, por medio de un proceso de filtración, usando los MFV para retener la enzima activa.

En el presente Capítulo se caracterizó el MFV por medio de diferentes técnicas fisicoquímicas, y se evaluó el efecto del pH y la composición del medio sobre la capacidad de adsorción de PPasa-SE. Se realizaron isotermas de adsorción bajo diferentes condiciones de operación y se estudio el proceso de elución de la enzima. Por último se escaló el proceso, analizando las etapas de adsorción y elución, calculando además nivel de concentración obtenido.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Reactivos químicos

Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck). Ácido poligalacturónico (PGA) y ácido galacturónico monohidrato (AGA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, EE.UU). Todos los demás reactivos empleados fueron comercialmente disponibles y de grado analítico.

3.2.2. Fuentes de enzima

3.2.2.1. Enzima sólida purificada

La PPasa-SE purificada fue suministrada por el Prof. Takuo Sakai, Universidad Prefectural de Osaka, Japón), y de ahora en adelante se denominará PGS, la cual posee un contenido de proteína de 7 % y una actividad específica de 140 U/mg. En la bibliografía se reporta que el análisis por SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivos de *G. klebahnii* muestra la presencia de una única banda, con un masa molecular

estimada de $41,0 \pm 1,1$ kDa (Sakai *et al.* 1993). El pI de la enzima es 7,7, y asumiendo una geometría esférica de la proteína, su radio hidrodinámico puede estimarse en ~ 30 Å (Malvern Company 2008).

Las soluciones buffer fueron preparadas con agua desionizada y su conductividad fue determinada con conductímetro (Hanna HI 3291, Japón) y expresada en mS/cm. Esta conductividad, cuando fue necesario, fue ajustada por adición de NaCl.

3.2.2.2. Enzima obtenida por fermentación de *G. klebahnii*

Geotrichum klebahnii fue cultivado a 30 °C en un biorreactor de 5,0 L de capacidad tanto en sistema de cultivo en lote (*batch*) como lote alimentado, usando un medio a base de glucosa, urea, sales y microelementos (Cavalitto *et al.* 2000; Zapata Zapata *et al.* 2008a). La biomasa fue separada por centrifugación (10 min, 4 °C) a 16.000 $\times g$. La actividad PGasa del sobrenadante de los cultivos en lote y lote alimentado fue de 350 y 85 U/mL, respectivamente, y presentaron una actividad específica de 686 y 708 U/mg proteína, respectivamente. Esta actividad específica es 5 veces mayor que la encontrada para PGS, efecto que podría atribuirse a la inactivación parcial de PGS durante su preparación. La PGasa obtenida en nuestro laboratorio se denominará en adelante PGF. El sobrenadante obtenido a partir del cultivo en lote alimentado fue concentrado $\sim 10\times$ a presión reducida, y almacenado a -20 °C. El proceso de descongelación se llevó a cabo sumergiendo la muestra congelada en un baño termostatzado a 37 °C, sin que se haya observado pérdida de actividad. La solución concentrada de enzima se denominó SC. Su conductividad fue 7,5 mS/cm y la concentración de citrato y fosfato fueron 1,0 mM y 230 mM, respectivamente. Para los experimentos de adsorción, la SC fue diluida con agua desionizada o buffer, ajustando el pH al valor deseado mediante la adición de solución de HCl (2 M) o NaOH (2 M).

3.2.3. Caracterización de los MFV

En los ensayos fueron empleados MFV con *binder* (G15WP, 0,45 μm , Osmonics, EE.UU.), con un espesor de 450 μm y diferentes diámetros (y áreas: A): 47 mm ($A = 17,4 \text{ cm}^2$), 90 mm ($A = 63,6 \text{ cm}^2$) y 110 mm ($A = 95,0 \text{ cm}^2$) excepto que se precisen otras características. La densidad de los MFV fue estimada en $0,161 \text{ g/cm}^3$ (base seca). Los MFV fueron usados sin ningún tipo de tratamiento previo, únicamente

fueron humectados con agua desionizada antes del proceso de filtración. La capacidad de atrapamiento de agua por parte de los MFV fue de $\sim 0,049$ mL agua/cm². La caracterización parcial de los MFV fue hecha por: a) microscopía electrónica de barrido (JEOL J5M-5910LV, b) adsorción de N₂ (ASAP 2020 V3.00 H), y c) porosimetría de Hg (Porosimeter 2000, Carlo Erba).

3.2.4. Procedimiento de filtración y cálculo de la actividad adsorbida

La filtración fue realizada empleando una unidad de vacío equipada con portafiltros de polipropileno o cerámico dependiendo del diámetro del MFV utilizado. Ensayos preliminares demostraron que la enzima no se adsorbe a los materiales de los portafiltros. La filtración se llevó a cabo a 22-25 °C mediante el sistema denominado de flujo directo (o flujo normal), en el cual el líquido incide perpendicularmente sobre la superficie del filtro de acuerdo a como se observa en la Fig. 3.1.

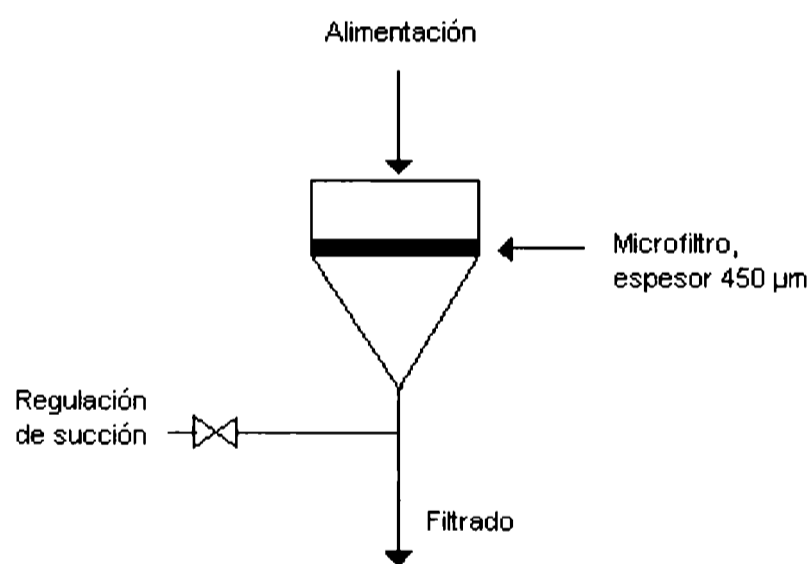


Figura 3.1 Esquema de la filtración con flujo directo.

La succión se reguló para trabajar con una velocidad de flujo de 20-25 mL/min independientemente del diámetro del MFV. Este caudal de alimentación equivale a 691-864 L/m².h para un filtro de 47 mm o de 135-169 L/m².h para un filtro de 110 mm. Ensayos previos demostraron que las condiciones de equilibrio no varían con el caudal de la alimentación. El procedimiento fue simple y consistió en volcar sobre el

microfiltro un volumen exacto de solución de enzima y luego iniciar la succión para promover la filtración al caudal deseado. Las muestras fueron filtradas tres veces por el mismo filtro para asegurar condiciones de equilibrio, excepto sean mencionadas otras condiciones experimentales. El filtrado obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su utilización. La cantidad de enzima adsorbida fue calculada mediante la Ec. 3.1:

$$\text{Enzima adsorbida} = (A_A - A_F) \times V_F \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde A_A y A_F son las actividades enzimáticas de la alimentación y el filtrado, respectivamente y, V_F es el volumen filtrado. El área total de adsorción, cuando se usó más de un microfiltro, fue calculada como la suma del área individual de cada uno de los microfiltros empleados. Por ejemplo, el área total de dos microfiltros iguales superpuestos (de $A = 17,4 \text{ cm}^2$ cada uno) fue tomada como $34,8 \text{ cm}^2$.

3.2.5. Experimentos de adsorción y desorción

3.2.5.1. Cinética de adsorción de PGS

La cinética de adsorción de PGS al MFV se estudió en un sistema convencional sumergiendo un filtro de $17,4 \text{ cm}^2$ en una solución de PGS ($\sim 20 \text{ U/mL}$) preparada en buffer ácido cítrico (50 mM) – fosfato dibásico de Na (25 mM) (BCP), pH 3,0, contenida en un frasco de 500 mL y agitando el sistema en un agitador recíproco a 250 golpes/min. A distintos tiempos se tomaron $200 \mu\text{L}$ de muestra y se determinó la actividad PGasa. Después de obtener un valor de actividad constante se filtró la solución remanente por el mismo MFV para evaluar cambios en la actividad adsorbida.

3.2.5.2. Isotermas de adsorción

El análisis de los procesos de adsorción reversibles requiere de datos de equilibrio que se expresan normalmente como isotermas de adsorción, las cuales son esenciales para modelar el proceso. A partir de ello se establece la relación óptima de adsorbente/adsorbato y se calcula la eficiencia del proceso. El procedimiento habitual para determinar isotermas de adsorción (y desorción) se basa en el contacto de una cantidad constante de adsorbente con un volumen definido de solución de distinta concentración de adsorbato, esperando que se establezca el equilibrio, el cual se dará a

una velocidad que depende de las condiciones del proceso. Una vez alcanzado el equilibrio se calcula, para cada condición, la concentración remanente de adsorbato en solución y, a partir de este dato, la cantidad adsorbida. En general la cantidad adsorbida se expresa en relación a la unidad de superficie, masa o volumen de adsorbente.

Para nuestro sistema la isoterma de adsorción fue construida de la siguiente manera: Se pasó (por tres veces) un volumen conocido de solución PGF, de actividad PGasa también conocida, a través de un MFV, buscando el estado de equilibrio. Se midió la actividad PGasa del filtrado, con lo cual se calculó la cantidad de enzima adsorbida mediante la Ec. 3.1. Este procedimiento se repitió varias veces usando el mismo volumen y el mismo MFV. Cada filtración corresponde a un punto de equilibrio. La acumulación de enzima adsorbida en cada etapa y la concentración de enzima en el filtrado permitieron la construcción de la isoterma de adsorción. Los datos fueron analizados de acuerdo al modelo de monocapa de Langmuir (Langmuir 1918) (Ec. 3.2):

$$q = \frac{q_m C}{K_d + C} \quad \text{Ec. 3.2}$$

donde q es la actividad de la enzima adsorbida por el MFV (U/cm^2), C es la actividad de la enzima en equilibrio (U/mL), q_m es la máxima capacidad de adsorción de enzima por parte del MFV (U/cm^2) y K_d es una constante de equilibrio de disociación (U/mL).

3.2.5.3. Elución

Este proceso se realizó filtrando volúmenes conocidos de un buffer de elución. El rendimiento en el proceso de elución fue calculado mediante la Ec. 3.3.

$$\% \text{ Enzima eluida} = \frac{(A_E \times V_E)}{E_{AD}} \times 100 \quad \text{Ec. 3.3}$$

donde A_E y V_E son la actividad (U/mL) y el volumen (mL) del eluyente, respectivamente, y E_{AD} es la actividad PGasa total adsorbida (U). Previo al proceso de elución se realizó un lavado del MFV con buffer ácido cítrico – citrato de Na (CitB) (10 mM, pH 3,0) (1,4 mS/cm) (buffer de lavado), para eliminar los componentes no adsorbidos que están presentes en el líquido retenido por el filtro (Voget *et al.* 2008).

3.2.5.4. Regeneración de MFV

Después de su utilización, los MFV fueron lavados con una solución NaCl (0,2 M) y abundante agua desionizada, y reutilizados solo si es indicado.

3.2.6. Medida de actividad enzimática (PGasa)

La actividad enzimática de PPasa-SE se evaluó de acuerdo a su actividad poligalacturonasa (PGasa), utilizando el método reportado en el Capítulo 2.

3.2.7. Determinación de proteínas solubles

Se utilizó el método descrito por Lowry (Lowry *et al.* 1951), utilizando una curva patrón de albúmina de suero bovino (0-250 mg/L), tratada de igual manera que las muestras.

3.2.8. Técnicas bioquímicas

Una solución PGF fue desalinizada usando una columna PD-10 equilibrada con agua. El eluato correspondiente fue posteriormente liofilizado, resuspendido y analizado por SDS-PAGE (Mighty Small II Unit, Hoefer SE 260), según el protocolo reportado previamente (Smith 1984). La concentración de citrato y de fosfato del medio de cultivo fueron determinados por HPLC (Agilent Serie 1100) con las siguientes condiciones: a) para citrato: columna C18, detector UV a 210 nm, flujo: 1 mL/min (97 % H₃PO₄, 3 % acetonitrilo) y presión: 1.388 psi. b) para fosfato: columna Shodex SC1011, detector IR, flujo: 1 mL/min H₂O y presión: 282 psi.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Adsorción de PGS a diferentes filtros y membranas

Se preparó una solución de PGS en 50 mL de CitB (10 mM) y BCP 1/4, ambas a pH 3,0 (40 ± 2 U/mL), y se evaluó la capacidad de adsorción de la enzima a MFV con y

sin *binder* (G40WP, 0,45 μm , Osmonics), así como a membranas de Nylon y Celulosa (0,45 μm , Osmonics). Los resultados obtenidos (Tabla 3.1) muestran que no hay adsorción de PGS a membranas de Nylon ni de Celulosa, pero si a los MFV con y sin *binder*. Lo anterior ratifica la capacidad que tienen los MFV de adsorber la PPasa-SE, como fue observado con la PGasa de *A. kawachii*. Se observó que la resina acrílica (*binder*) del MFV aumenta entre un 39 y 46 % aproximadamente la adsorción de la enzima, posiblemente debido a un ordenamiento en los sitios activos del MFV. Al usar MFV sin *binder* se presenta mayor adsorción (8 %) con CitB (10 mM). Por lo tanto, para futuros ensayos se emplearon MFV con *binder*.

Tabla 3.1. Adsorción de PGS a diferentes membranas y microfiltros

Buffer	% Adsorción		
	MFV <i>c/binder</i>	MFV <i>s/binder</i>	Aporte relativo del <i>binder</i>
BCP 1/4	97	52	46
CitB (10 mM)	98	60	39

3.3.2. Caracterización de los MFV

3.3.2.1. Microscopía electrónica de barrido

En la Fig. 3.2 se observan fibras cilíndricas y sin porosidad evidente, con diámetros heterogéneos (0,2-2,0 μm), y amplio espacio entre las fibras (macroporos).



Figura 3.2. Microfotografía electrónica de barrido de un MFV con *binder*. La línea en la microfotografía indica una longitud de 5 μm .

3.3.2.2. Adsorción de N₂

Con ésta técnica se puede determinar la microporosidad (aberturas < 2 nm) y mesoporosidad (aberturas entre 2 y 50 nm) de superficies sólidas. El método se basa en la inyección de N₂ al material sólido, cuya penetración a los poros depende tanto del tamaño de ellos como de la presión suministrada. Para poros pequeños se requiere de una menor presión que para poros grandes, razón por la cual éste método no es adecuado para la medición de macroporos (aberturas >50 nm). De esta forma se obtienen una isoterma de adsorción y otra de desorción de N₂ a la superficie. Estas isotermas permiten, luego de procesar los datos mediante un software especializado incluido en el equipo, obtener el área superficial del material y la distribución de volumen de poros, usando diferentes modelos de cálculo, *i.e.* Brunauer-Emmet-Teller (BET), t-plot u otros. La Fig. 3.3 muestra las isotermas de adsorción y de desorción de N₂ sobre el MFV.

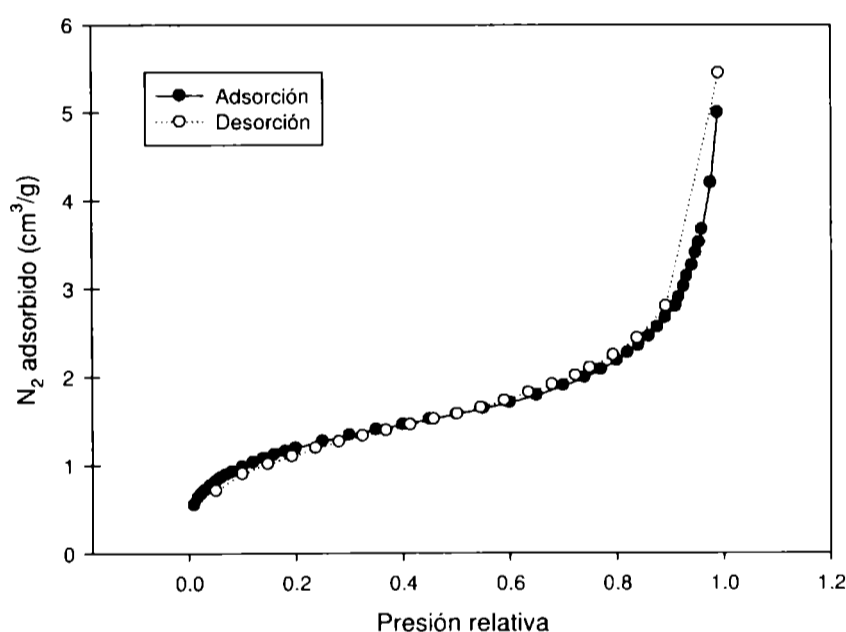


Figura 3.3. Isotermas de adsorción y de desorción de N₂ al MFV.

Ambas isotermas se superponen, lo que permite aseverar la ausencia del fenómeno de histéresis. Esto indica que no quedan moléculas de N₂ atrapadas en los poros del MFV, característica propia de superficies con baja microporosidad (Tomao *et al.* 1998). La Fig 3.3 también muestra baja adsorción de N₂ a presiones relativas menores de 0,4, lo cual, con base en el fundamento de la técnica, confirma la baja microporosidad. El área superficial calculada por el método Brunauer-Emmet-Teller

(BET) fue de $4,360 \pm 0,004 \text{ m}^2/\text{g}$. La Fig 3.4 muestra la distribución del volumen de poro en función del radio de poro.

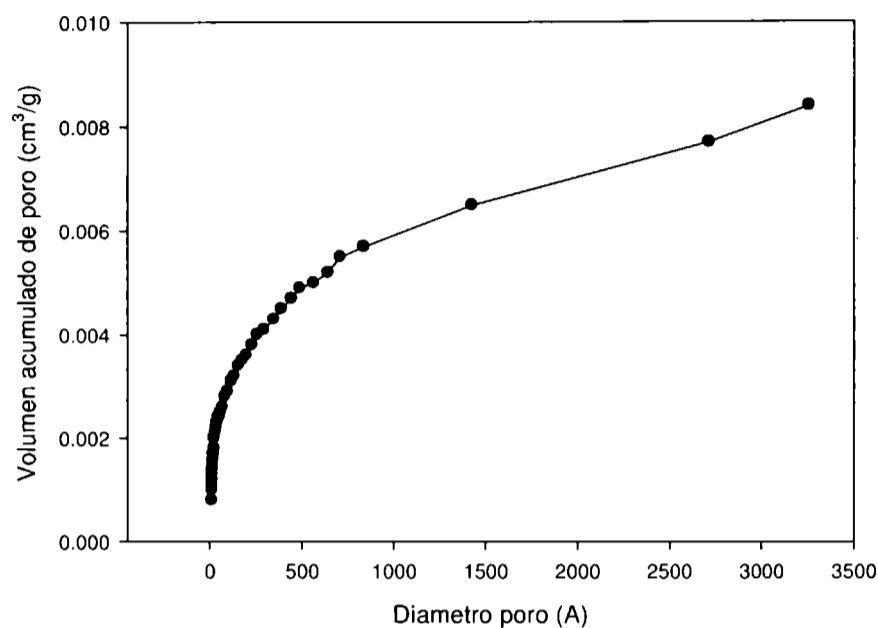


Figura 3.4. Distribución de volumen de poro del MFV. Técnica de adsorción de N_2 .

3.3.2.3. Porosimetría de Hg

La Fig. 3.2 sugiere que la macroporosidad es muy importante en la estructura de los MFV. Por tal motivo se procedió a analizar el material por medio de porosimetría de Hg, que a diferencia de la adsorción de N_2 , se aplica a tamaños de poros entre 2 y $1 \times 10^6 \text{ nm}$. La Fig. 3.5 muestra la distribución del volumen de poro, observando que solo los poros de diametro $> 700 \text{ nm}$ aportan al volumen, el cual fue de $\sim 3.400 \text{ mm}^3/\text{g}$.

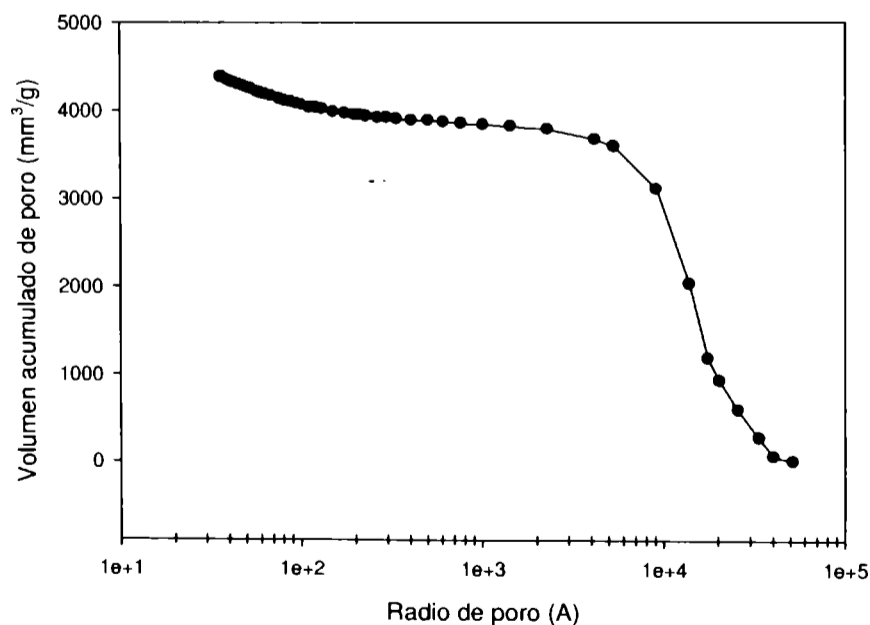


Figura 3.5. Distribución de volumen de poro del MFV. Técnica de porosimetría de Hg.

Por medio de un procedimiento matemático que relaciona la presión del sistema con el volumen de poro se logró obtener el área superficial del material, la cual fue de $163 \text{ m}^2/\text{g}$. Este valor, junto con el obtenido por la técnica de adsorción de N_2 , corrobora la observación preliminar de la microfotografía electrónica, en la cual el principal aporte al área superficial del MFV lo constituye la macroporosidad del material.

3.3.3. Experimentos de adsorción con PGS

3.3.3.1. Cinética de adsorción

Una de las principales características de la adsorción a membranas es que el transporte del soluto a los sitios de unión se realiza predominantemente por un fenómeno de convección, minimizando así las limitaciones difusionales. Este hecho fue confirmado para nuestro sistema de adsorción, ya que al filtrar 100 mL de una solución de PGS (20 U/mL) a través de un MFV de $17,4 \text{ cm}^2$, más del 95 % de la actividad fue adsorbida, luego de una sola filtración. Por el contrario, cuando la adsorción se llevó a cabo sumergiendo el MFV en el mismo volumen de solución, el equilibrio se alcanzó en 4 h y la actividad adsorbida fue del 70 %. Mas aún al filtrar la solución residual por el mismo filtro, la adsorción se incrementó al 90 % luego de una única filtración, es decir, se alcanzó la condición de equilibrio observada en la adsorción por filtración. Se concluye que bajo las condiciones de flujo empleadas durante la filtración, la adsorción de la enzima al microfiltro es prácticamente instantánea y que además el movimiento convectivo del líquido facilita el acceso de la proteína a los sitios de adsorción del microfiltro. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores para la adsorción estática y dinámica (Nakamura & Matsumoto 1998; Saiful *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007).

3.3.3.2. Efecto del pH y composición del buffer

La adsorción de proteínas a superficies es un fenómeno altamente dependiente del pH y la composición de la solución. El efecto del pH en la adsorción de PGS disuelto en BCP se muestra en la Fig. 3.6. La adsorción fue máxima a $\text{pH} \leq 3,0$ y disminuyó fuertemente a $\text{pH} 5,0$. Un experimento similar realizado con CitB (10 mM) mostró en cambio una adsorción del 80-90 % en el rango de $\text{pH} 2,0-6,0$. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para PGasa de *A. kawachii* (Voget *et al.*

2008) y sugieren que el fosfato estaría inhibiendo la adsorción a $\text{pH} > 3,0$. Para verificar esta hipótesis se realizaron nuevos ensayos con diferentes tipos de buffer a saber: buffer ácido acético – acetato de Na (AcB) (12,5 mM), CitB (12,5 mM), BCP 1/4, buffer ácido acético (12,5 mM) – fosfato di básico de Na (6,25 mM) (BAP) y buffer ácido acético (12,5 mM) – citrato de Na (6,25 mM) (BAC), todos ellos a $\text{pH} 3,0$ y $5,0$. En todos los casos la conductividad de las soluciones se ajustó a $3,0 \text{ mS/cm}$ por adición de NaCl. En la Tabla 3.2 se observan los resultados de estos experimentos. Es evidente que el fosfato inhibe la adsorción de PGS y que esta inhibición es contrarrestada por el citrato a $\text{pH} 3,0$ pero no a $\text{pH} 5,0$. Por su parte, el citrato parece promover la adsorción a $\text{pH} 3,0$ ya que la adsorción en buffer citrato o en buffer citrato/acetato fue del 90% , mientras que en el AcB fue del 60% . A $\text{pH} 5,0$ no hubo diferencias entre el citrato y acetato en la adsorción, que fue del 90% .

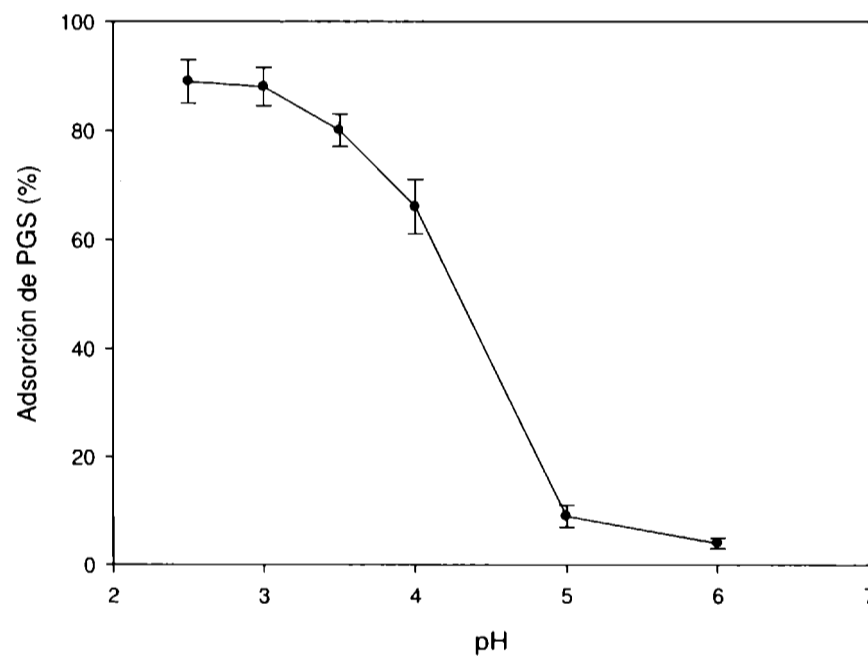


Figura 3.6. Influencia del pH sobre la adsorción de PGS a MFV. Alimentación: 20 ml de solución PGS (1,0-10 U/mL) en BCP ajustado al pH deseado.

Tabla 3.2. Efecto del pH y la composición del buffer en la adsorción de PGS a MFV.

pH	Adsorción (%)				
	AcB (12,5 mM)	CitB (12,5 mM)	BCP 1/4	BAP	BAC
3,0	59,7	89,5	95,9	25,0	90,5
5,0	89,0	90,0	18,0	33,0	83,4

El efecto citrato y fosfato en la interacción PGasa/fibras de vidrio no es simple de inferir. En la superficie del vidrio borosilicato tanto los grupos silanol (SiOH) disociados, no disociados o protonados, como los átomos electrofílicos (B, Al), y los oxígenos no formadores de puentes, son potenciales sitios de interacción con la proteína (Green & Wase 1986; Kyung *et al.* 1996; Stebbins *et al.* 2000; Parida *et al.* 2006). Se ha sugerido que las fuerzas involucradas en la adsorción entre las proteínas y la superficie del vidrio son principalmente enlaces iónicos amino-silanol o puentes de hidrógeno (Messing 1975). Esto puede explicar parcialmente el caso de la PPasa-SE trabajando en el rango de pH 3,0-6,0, ya que debido a que su pI es cercano a 7,7, en esas condiciones la proteína tiene carga neta positiva (Sakai *et al.* 1993). Sin embargo, cierta bioespecificidad parece estar involucrada en la adsorción, ya que diferentes enzimas de *A. kawachii*, inclusive una PG ácida, con pIs superiores a 5,0, no son adsorbidas por el MFV inclusive a pH 3,0 (Nakamura & Matsumoto 1998; Nakamura & Matsumoto 2006; Saiful *et al.* 2006). Por otra parte se debe considerar el aporte de la resina acrílica al proceso de adsorción de PGS, como se mostró en la Tabla 3.1. Aunque no se dispone de información sobre el contenido real de esta resina en los MFV, se sugiere, como se mencionó previamente, que ésta pudo influir en la adsorción de la enzima por efectos de mejoramiento en la disposición de los sitios activos de la fibra de vidrio.

Los componentes de las diferentes soluciones buffer utilizadas (fosfato dibásico, acetato y citrato) pueden existir bajo diferentes formas químicas dependiendo del pH. Las formas iónicas predominantes del fosfato son $H_3PO_4 / H_2PO_4^-$ a pH 3,0 o $H_2PO_4^-$ a pH 5,0. Tanto a pH 3,0 como 5,0 existe el anión monofosfato lo que sugeriría que esta especie sería la responsable del efecto inhibitorio. Por su parte, los pKs del ácido cítrico son: 3,14, 4,77 y 5,74, respectivamente. A pH 3,0 las especies AH_3 y AH_2^- representan el 57,6 y 41,7 % del total mientras que a pH 5,0, la concentración de AH_3 es prácticamente despreciable, predominando las especies AH_2^- y AH^- . Esto podría indicar que la capacidad del cítrico para contrarrestar la inhibición del fosfato a pH 3,0 y su capacidad de favorecer la adsorción a este pH, comparada con acetato, estaría relacionada con su forma no disociada (AH_3).

Se ha reportado que el fosfato puede inhibir la adsorción de diferentes proteínas a superficies minerales debido a que usualmente este ión compite con otros ligandos por los sitios de unión de las superficies (Nakamura & Matsumoto 1998). No obstante, futuras investigaciones son necesarias para comprender bien la función del fosfato y

otros ácidos orgánicos sobre la adsorción de PPasa-SE a los MFV, bajo las condiciones de operación usadas.

3.3.4. Experimentos de adsorción con PGF

La Fig 3.7 muestra un SDS-PAGE de la proteína obtenida del medio de cultivo, a diferentes niveles de concentración. En dicha figura se observa una única banda, con lo cual se corrobora el hecho de que el *G. klebahnii* libera una única enzima al medio correspondiente a la PGF.

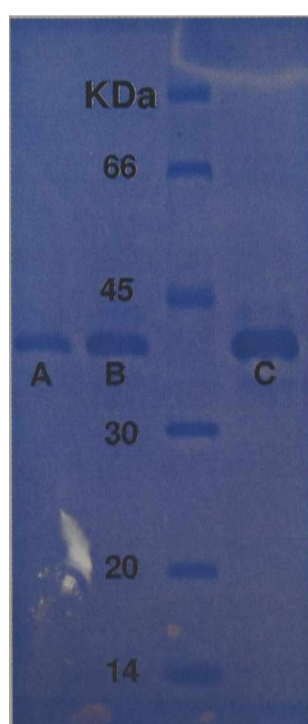


Figura 3.7. SDS-PAGE del sobrenadante del medio de cultivo. Dilución de las muestras: A) 1/4, B) 1/2 y C) 1/1.

Se realizaron experimentos iniciales de adsorción con PGF a partir de la SC a diferentes niveles de dilución (1:10, 1:30 y 1:100 realizadas con agua desionizada) y valores de pH (3,0 y 5,0), empleando un MFV de 17,4 cm² y un volumen de alimentación de 20 mL. Durante éstos ensayos la conductividad de las soluciones enzimáticas no fue ajustada, siendo los valores a pH 3,0 de 7,5, 2,5 y 0,70 mS/cm para las diluciones 1:10 (~ 320 U/mL), 1:30 (~ 110 U/mL) y 1:100 (~ 30 U/mL), respectivamente. Dichos valores fueron similares a pH 5,0. Los resultados se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Efecto del grado de dilución de SC y el pH sobre la adsorción de PGF.

pH	Actividad adsorbida (U)		
	Dilución 1:10	Dilución 1:30	Dilución 1:100
3,0	2.020	2.160	600
5,0	980	1.260	600

La cantidad de PGF adsorbida por el MFV dependió del grado de dilución de SC y el pH. Con la menor dilución (1:100) toda la actividad de la alimentación (600 U) fue adsorbida a ambos pHs, es decir la eficiencia expresada como % de PGF adsorbida fue del 100 %. A medida que se incrementó la concentración de la alimentación, mayor fue la cantidad de enzima adsorbida a pH 3,0 en comparación con la adsorbida a pH 5,0. A pH 3,0 la eficiencia se mantuvo en 100 % con la dilución intermedia y disminuyó al 31 % con la alimentación más concentrada. A pH 5,0, en cambio la eficiencia fue decreciendo conforme fue aumentando la concentración de la alimentación. Los resultados a pH 5,0 pueden ser explicados por el incremento de la concentración de compuestos interferentes al proceso de adsorción, que están presentes en la alimentación. A pH 3,0 ocurriría un fenómeno similar, sin embargo la menor eficiencia de la adsorción observada con la dilución 1:10 podría explicarse también por la saturación del microfiltro. Esta hipótesis se intentara verificar en posteriores ensayos (véase mas adelante). En cuanto a las sustancias interferentes podríamos considerarlas como inespecíficas, *i.e.*: aumento de la conductividad, o específicas, *i.e.*: el fosfato, cuya concentración en la dilución 1:10 es de 20 mM. Es de remarcar que SC también contiene citrato, el cual fue empleado durante la fermentación de *G. klebahnii* para controlar el pH del medio y como agente quelante de microelementos. Pero su concentración en la dilución 1:10 es relativamente baja (0,1 mM) con lo cual su efecto sobre la adsorción podría considerarse despreciable.

Los estudios de adsorción con PGS permiten especular que la adición de citrato, a pH 3,0, debería tener un efecto promotor de la adsorción de PGF. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, si el filtro se satura con ~ 2.000 U ($90 - 110$ U/cm²) a las diluciones 1:10 y 1:30, el beneficio de la adición de citrato no sería evidente. De hecho no se observaron cambios en la cantidad de enzima adsorbida cuando se diluyó SC con 10 mM de citrato en comparación con agua deionizada. Sin embargo cuando el volumen

de alimentación fue reducido a 5 mL, si se observó un efecto positivo del CitB en la adsorción de PGF a pH 3.0 en la dilución 1:10. Estos resultados demuestran claramente que la adsorción de PGF y el efecto del citrato dependen de la concentración de SC. En base a estos resultados, los ensayos de adsorción con PGF de aquí en adelante se realizaron con SC diluido 1:30 con agua deionizada a pH 3,0 (sin agregado de citrato). Como se indicará mas adelante, las isotermas de adsorción no mostraron diferencias entre la SC diluida con agua o con CitB.

3.3.5. Isotermas de adsorción

Para la obtención de las isotermas de adsorción se filtraron sucesivamente fracciones de 5 mL de SC diluida 1:30, a pH 3,0, a través de un MFV de 17,4 cm², hasta un volumen filtrado total de 40 mL. El volumen de 5 mL se empleó para no saturar el filtro con una sola filtración. La Fig. 3.8 muestra que los datos de equilibrio se ajustaron adecuadamente al modelo de Langmuir ($R^2 = 0,980$). La misma experiencia se repitió pero empleando dos MFV, observándose también en la Fig. 3.8 que en este caso se presentan desviaciones del modelo de Langmuir, lo que se manifiesta por una falta de ajuste. Dicha falta de ajuste puede ser parcialmente atribuida a la heterogénea distribución del flujo del líquido a través de los MFV.

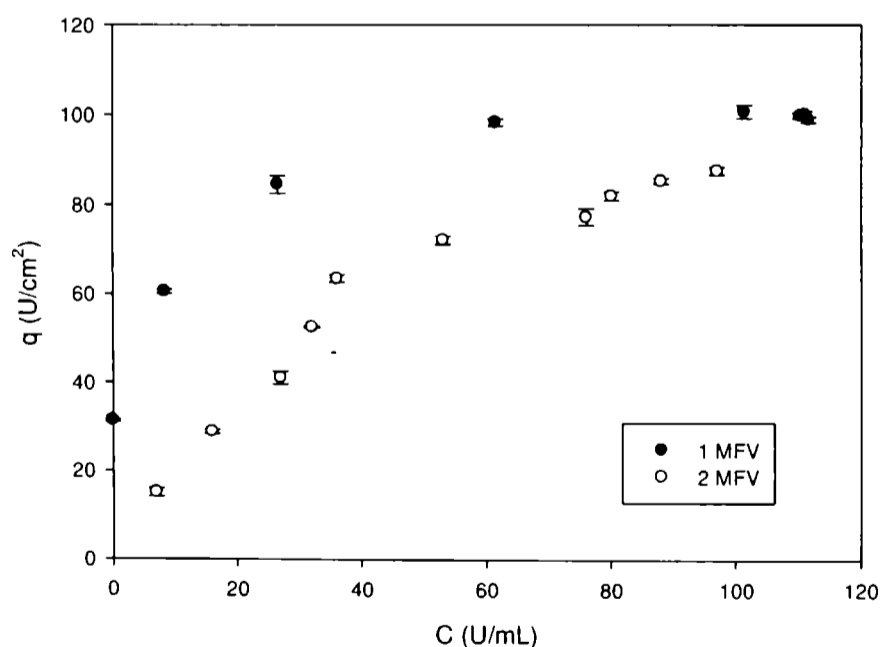


Figura 3.8. Isotermas de adsorción a 25 °C. Dilución de SC 1:30. Volumen de filtración 5 mL. Área efectiva de filtración de 17,4 cm² por cada MFV.

Para comprobar esta hipótesis se repitió el ensayo filtrando 10 mL a través de dos MFV, cada uno de 17,4 cm². Los resultados se muestran en la Fig. 3.9, observando de nuevo un buen ajuste de los datos de equilibrio al modelo de Langmuir ($R^2 = 0,99$). Sin embargo, usando el mismo volumen, pero con un MFV de 64,5 cm², nuevamente se presenta una isoterma de adsorción distorsionada.

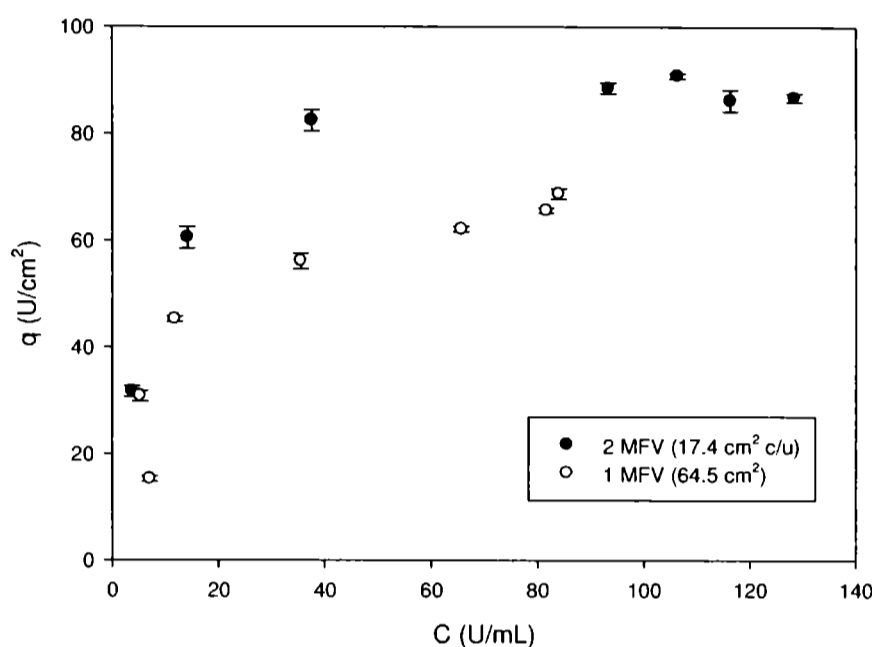


Figura 3.9. Isotermas de adsorción a 25 °C. Dilución de SC 1:30. Volumen de filtración 10 mL. Área efectiva de filtración de 34,8 y 64,5 cm².

También se obtuvieron ajustes al modelo de Langmuir con diferentes ensayos los cuales la razón del volumen filtrado en cada fracción por unidad de área de MFV fue cercana 0,29 ml/cm², independientemente del tamaño del MFV (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Diferentes parámetros del modelo de Langmuir para la adsorción de PGF a MFV.

Número de MFV (N)	Área total MFV (cm ²)	Volumen de filtración (V), (mL)	V/Á (mL/cm ²)	Parámetros de Langmuir		R ²
				q _m (U/cm ²)	K _d (U/mL)	
1	17,4	5	0,29	105,9	6,3	0,93
2	34,8	5	0,14	Isoterma distorsionada		
2	34,8	10	0,29	94,4	7,4	0,99
1	64,5	10	0,16	Isoterma distorsionada		
1	64,5	20	0,31	93,7	3,7	0,84

La aplicación del test F demostró que las isotermas de adsorción correspondientes a los ensayos que se ajustaron al modelo de Langmuir, no presentaron diferencias significativas, $F_{(4, 16)} \text{ estimado} < F_{\text{tabla}, (p=0,05)}$ (Green & Margerison 1978). Lo anterior fue corroborado a través de los intervalos de confianza calculados para cada parámetro de los diferentes modelos. La isoterma de adsorción combinada presentó un $q_m = 98,6 \pm 7,5 \text{ U/cm}^2$ ($\sim 0,11 \text{ mg proteína/cm}^2$) y un $K_d = 6,1 \pm 3,4 \text{ U/mL}$.

Diferentes autores reportan valores de adsorción máxima de proteínas a membranas, *i.e.* $0,14 \text{ mg/cm}^2$ para la adsorción de albúmina bovina (BSA) a membranas de alúmina modificadas (Chang & Suen 2006), $3 \times 10^{-4} \text{ mg/cm}^2$ para la adsorción de BSA sobre membranas de vidrio porosas (Nakamura & Matsumoto 1998), $0,08 \text{ mg/cm}^2$ para adsorción de inmunoglobulina (IgG) a membranas de nylon (Castilho *et al.* 2002) y $0,9 \text{ mg/cm}^2$ para la adsorción de lisozima sobre membranas de fibra de vidrio (Chen *et al.* 2007). La empresa Sartorius reporta valores de $0,08 \text{ mg/cm}^2$ para la adsorción de IgG usando una membrana adsorbente comercial (Sartobind Protein A 75) y de $\sim 0,8 \text{ mg/cm}^2$ para adsorción de Lisozima y BSA con membranas Sartobind S y Q, los cuales coinciden con los reportes de otros autores (Gebauer *et al.* 1997). Todos estos reportes muestran que los valores de adsorción obtenidos en este trabajo son del mismo orden que los reportados para otros sistemas. No obstante, al comparar los reportes bibliográficos presentados, se observa que las membranas modificadas, principalmente con grupos de intercambio iónico, pueden incrementar significativamente la densidad de los sitios de adsorción y por ende de la capacidad máxima de adsorción.

Es importante destacar los resultados obtenidos cuando las isotermas de adsorción se llevaron a cabo empleando la SC diluida 1:10, en los cuales, aún manteniendo la relación adecuada de volumen de alimentación/área, las curvas presentaron distorsiones al modelo de Langmuir similares a las observadas con la dilución 1:30 cuando la relación volumen filtrado/área no fue óptima. Una posible causa de este comportamiento podría ser la alta fuerza iónica de la solución concentrada que interfiere en la adsorción, como lo indican algunos reportes bibliográficos (Doran 1998; Huang *et al.* 2003; Saiful *et al.* 2006). La conductividad de la SC 1:10 fue de $7,5 \text{ mS/cm}$, valor que, como se observará más adelante en la Tabla 3.5, favorece los procesos de elución, o en otras palabras, afecta la adsorción de la enzima, confirmando los reportes mencionados previamente.

3.3.6. Efecto de la temperatura sobre la adsorción

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre el proceso de adsorción se realizó una isoterma de adsorción a 7 °C, como se muestra en la Fig. 3.10.

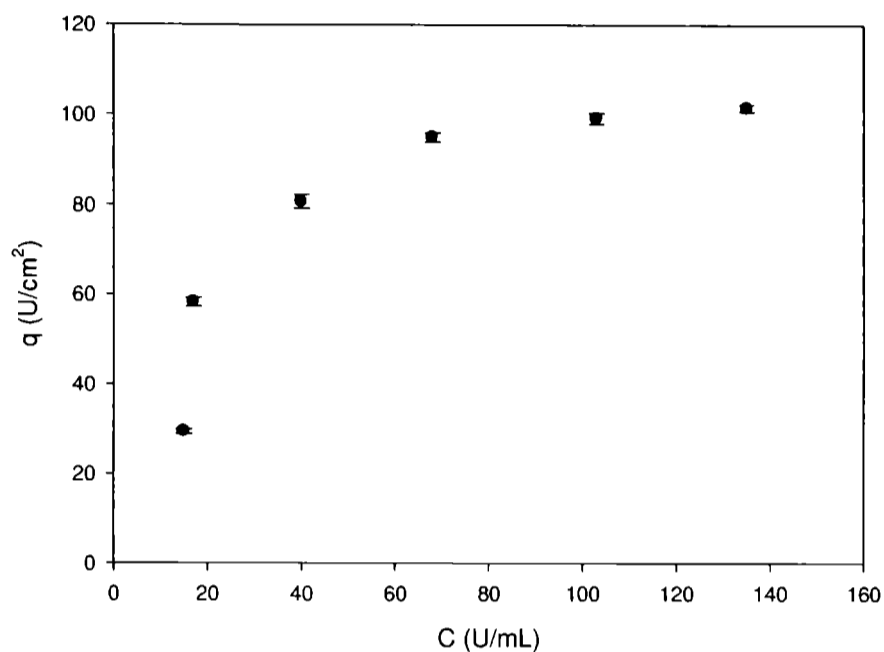


Figura 3.10. Isotermas de adsorción a 7 °C. Dilución de SC 1:30. Área efectiva de filtración de 17,4 cm², volumen de filtración 5 mL.

Esta isoterma muestra un comportamiento que responde adecuadamente al modelo Langmuir. Los parámetros del modelo son: $q_m = 126,4 \pm 30,4 \text{ U/cm}^2$ y $K_d = 27,0 \pm 20,2 \text{ U/mL}$ ($R^2 = 0,90$). Mediante el test F se demostró que la isoterma de adsorción combinada a 25 °C no presenta diferencia estadística significativa con la isoterma a 7 °C, $F_{(2, 24)} \text{ estimado} < F_{\text{tabla}, (p=0,025)}$. Este resultado indica que no existe un importante efecto de la temperatura sobre los parámetros de adsorción. No obstante es importante notar que los valores de los parámetros de equilibrio calculados a 7 °C presentan un error bastante alto.

3.3.7. Experimentos de elución de PGF

En la Tabla 3.5 se presentan los resultados de la capacidad que presentan diferentes soluciones buffer a pH 5,0, para eluir la PGF adsorbida por la MFV. En cada experimento se empleó un MFV de 17,4 cm² saturado con enzima (filtrando 20 mL de

CM diluido 1:10, a pH 3,0). Luego de la adsorción el filtro fue lavado con 10 mL de buffer de lavado y finalmente se evaluó la elución filtrando 10 mL de la solución buffer de ensayo. Experimentos preliminares mostraron que más del 90 % de la PGF adsorbida fue recuperada después de una sola pasada del buffer de elución a través de la MFV. Esto significa que las limitaciones de transferencia de masa son insignificantes en el proceso de desorción como ocurrió durante la adsorción.

Tabla 3.5. Elución de PGF de MFV con diferentes soluciones buffer a pH 5,0.

Buffer de elución	Conductividad (mS/cm)	Elución (%)
BCP	8,1	52
AcB (150 mM)	8,0	48
CitB (60 mM)	8,7	52
CitB (60 mM) + NaCl (0,1 M)	19,6	100
CitB (60 mM) + NaCl (0,25 M)	32,7	92
CitB (60 mM) + NaCl (0,5 M)	53,4	100
CitB (10 mM) + NaCl (0,2 M)	26,0	98

Se observa que la desorción de PGF de la MFV dependió de la conductividad del buffer de desorción. Diferentes búferes de elución, con igual conductividad (~ 20 mS/cm) mostraron la misma eficiencia de elución. La máxima elución (90 - 100 %) se puede obtener con 200 mM una concentración baja de CitB (10 mM) y 200 NaCl (200 mM), la cual presenta el nivel de conductividad mencionado previamente. Se determinó que 5 mL es el volumen mínimo de buffer de elución que permite una adecuada elución de la enzima, y con el cual se logra una máxima concentración final de PGF.

Los experimentos de adsorción de PGS, usando BCP 1/4 (pH 5,0), los cuales fueron reportados previamente, mostraron que la adsorción bajo estas condiciones fue mucho menor en comparación con la obtenida usando CitB o AcB (12,5 mM, pH 5,0), los tres con la misma conductividad (3,0 mS/cm) (Tabla 3.2), evidenciando el efecto adverso del ión fosfato sobre la adsorción. Esos resultados sugieren que con BCP (pH 5,0) (mayor concentración de fosfato) se lograría una mayor capacidad de elución de la enzima en comparación con los otros búferes. Este hecho, tal y como lo muestra la

Tabla 3.5, no fue observado, indicando así que el fosfato puede inhibir la adsorción de la enzima al MFV a pH 5,0, pero no ejerce un efecto favorable sobre la elución luego de que ésta ya está adsorbida, pudiendo indicar una interacción específica entre el grupo fosfato y la enzima.

3.3.8. Proceso de adsorción a mayor escala

Considerando los resultados de los parámetros de adsorción de PGF a MFV, se realizaron diferentes experimentos con el objetivo de escalar el proceso. El procedimiento consistió en calcular el área total de filtración (número de filtros) necesarios para adsorber una cantidad de enzima deseada, usando el modelo de Langmuir definidos previamente a 25 °C y un balance de materia, el cual se describe a continuación (Ec. 3.4):

$$C_A V = C_F V + q A \quad \text{Ec. 3.4}$$

donde C_A es la actividad PGasa en la solución de alimentación (U/mL), C_F es la actividad PGasa en el filtrado (U/mL), q es la enzima adsorbida por el MFV (U/cm²), V es el volumen de alimentación (mL) y A es el área total de filtración (cm²).

3.3.8.1. Adsorción de la PGF diluida a partir de la SC

Se procesaron 400 mL de la SC diluida 1:30 con H₂O desionizada (100 U/mL) a pH 3,0, usando MFV de 64,5 cm². Se buscó adsorber el 80 % de la enzima adsorbida. A partir de la Ec. 3.2 se obtiene la Ec. 3.5:

$$q = \frac{V}{A} (C_A - C_F) = \frac{32.000 U}{A} \quad \text{Ec. 3.5}$$

A partir del modelo de Langmuir, cuyos parámetros son conocidos, se obtiene que $q = 61,2$ U/cm². Reemplazando este valor en la Ec. 3.3, se obtiene un área efectiva de filtración de 522 cm², correspondiente a ~ 8 MFV.

Se realizaron dos experimentos independientes filtrando una sola vez 400 mL de la solución de alimentación a través los 8 MVF. En ambos experimentos la adsorción

fue del 80 %, tal y como el diseño del había predicho. Posteriormente se pasaron 100 mL de buffer de lavado, CitB (10 mM, pH 3,0), y por último se pasaron fracciones de 25 mL de CitB (10 mM, pH 5,0), con 0,2 M (primer experimento) o 0,5 M (segundo experimento) de NaCl. Usando 0,5 M se logró una mayor eficiencia en el proceso de elución. El factor de concentración de la PGF (FC) se calculó mediante la Ec 3.6:

$$FC = \frac{V_A \times U_A}{V_E \times U_E} \quad \text{Ec. 3.6}$$

donde V_A y V_E son los volúmenes de alimentación y elución (mL), respectivamente, y U_A y U_E son las unidades totales de actividad de alimentación y elución, respectivamente.

Con 25 mL (0,2 M de NaCl) se alcanza un FC de $\sim 6,9\times$ (43 % de recuperación de PGF). A medida que se utilizó un mayor volumen de buffer de elución, más enzima fue recuperada, aunque la solución enzimática obtenida fue más diluida. Con 50 y 75 mL de V_E , los FC (y el % de recuperación) de PGF fueron de $5,7\times$ (71 %) y $4,3\times$ (80 %), respectivamente. Con 50 mL de buffer de elución (0,5 M de NaCl) el FC (y el % de recuperación) de PGF fueron de $7,0\times$ (87 %). Concentraciones de NaCl superiores no mejoran significativamente la eficiencia del proceso de elución.

3.3.8.2. Adsorción de la PGF obtenida de cultivos en sistema *batch*

En un segundo experimento se filtraron 1.000 mL de sobrenadante de cultivo, con una actividad PGasa de 80 U/mL. A este sobrenadante, proveniente de un cultivo *batch*, se ajustó el pH a 3,0. En este caso se utilizaron MFV de mayor área superficial ($A = 95 \text{ cm}^2$). El diseño del proceso fue realizado de forma similar al anterior, pero en este caso se buscó adsorber el 97 % de la actividad PGF. Los cálculos dieron un requerimiento de área total de filtración de 2.790 cm^2 equivalente a 29 MFV. El porcentaje de adsorción alcanzado fue de 100 %. Se utilizaron 200 mL de buffer de lavado y la elución se realizó pasando repetidas veces fracciones de 100 mL de CitB (10 mM, pH 5,0) con 0,5 M NaCl. Con 200 mL de buffer de elución se obtuvo una eficiencia en la elución de 88 %, siendo el FC de $5,1\times$. Volúmenes superiores de buffer de elución permitieron alcanzar porcentajes de elución cercanos al 100 % pero con un detrimento alto en la capacidad de concentración de la enzima.

Para evaluar cómo varía la eficiencia de los procesos de adsorción y elución al reutilizar los MFV, se trabajó con los mismos 29 MFV usados anteriormente y bajo las mismas condiciones de adsorción y elución. El porcentaje de adsorción alcanzado en este caso fue de 97 %. Con 200 mL de buffer de elución se alcanzó una importante eficiencia en la elución (91 %), con lo cual se obtiene un FC de 5,4×. Un tercer ciclo de operación, bajo las mismas condiciones, mostró que la eficiencia del proceso de adsorción (99 %) no disminuye. En este caso con 200 mL de buffer de elución se obtuvo un rendimiento de 70 %, el cual aumentó a 84 % con 500 mL, indicando así una importante pérdida en la capacidad de elución. El FC usando 200 mL fue de 6,9× mientras que con 500 mL fue de 2,3×.

3.3.8.3. Adsorción de la PGF de cultivos en sistema *batch* con células de *G. klebahnii*

Nuevamente se usaron los 29 MFV para procesar 1.000 ml de medio de cultivo con una actividad de 80 U/mL. Este medio también fue proveniente de un cultivo *batch*, pero en este caso no se centrifugó trabajando de esta manera en presencia de células de *G. klebahnii* a una concentración cercana a 5,0 g/L. Bajo estas condiciones se alcanzó un porcentaje de adsorción de 82 %. La elución se realizó pasando repetidas veces fracciones de 50 mL de CitB (10 mM, pH 5.0), 0.5 M NaCl. Con 200 mL de buffer de elución la eficiencia en la elución fue de 95 % y el FC de 6,7×. En este caso se evidencia que la eficiencia en el proceso de adsorción disminuye en un 20 %, lo cual pudo ser ocasionado por el alto número de ciclos de operación o por la presencia de células. En la Tabla 3.6 se presentan los resultados obtenidos con los diferentes ciclos de utilización de los MFV, para un volumen de elución de 200 mL, con los cuales, salvo el tercer ciclo de operación, permite obtener una eficiencia en la elución de ~ 90 %.

Tabla 3.5. Resultados de adsorción, elución y concentración de diferentes ciclos de uso de MFV.

Número de ciclos	Eficiencia de adsorción (%)	Actividad adsorbida (U)	Eficiencia de elución (%)	Factor de concentración
1	100	80.000	88	5,1
2	97	77.600	91	5,4
3	99	79.200	70	6,9
4 (+ células)	82	65.600	95	6,7

3.4. CONCLUSIONES

Los MFV con *binder* presentaron mayor macroporosidad que micro y mesoporosidad, siendo el área específica de $\sim 165 \text{ m}^2/\text{g}$, calculada por medio de técnicas de porosimetría de Hg y adsorción de N_2 .

La composición salina del medio presenta una alta influencia en la capacidad de adsorción de la enzima a los MFV, siendo de particular importancia el efecto inhibitorio que muestra el fosfato sobre la adsorción a $\text{pH} > 3,0$. A su vez la presencia de citrato contrarresta dicha inhibición.

El proceso de adsorción de la PPasa-SE a los MFV se favorece a $\text{pH} 3,0$, mientras que el proceso de elución es más eficiente a $\text{pH} 5,0$.

En la adsorción de la enzima, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y $\text{pH} 3,0$, existe una relación mínima entre volumen de filtración y área efectiva de filtración (V/A) igual a $0,29 \text{ mL}/\text{cm}^2$, que permite buenos y reproducibles resultados, logrando de esta forma que la isoterma se comporte de acuerdo al modelo de Langmuir. Relaciones menores produjeron isotermas distorsionadas.

Los parámetros de Langmuir para las isotermas de adsorción a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}: 3,0$ y concentración de PPasa-SE cercana a $100 \text{ U}/\text{mL}$, fueron: $q_m = 98,6 \pm 7,5 \text{ U}/\text{cm}^2$ y $K_d = 6,1 \pm 3,4 \text{ U}/\text{mL}$. El valor de q_m , en términos de proteína adsorbida, fue de $\sim 0,11 \text{ mg}$ proteína/ cm^2 . Una mayor concentración de la enzima genera isotermas de adsorción distorsionadas. La temperatura, evaluada a 7 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$, no ejerció un efecto importante sobre el proceso de adsorción.

El tipo de buffer empleado, en condiciones de conductividad equivalente, no ejerce una influencia importante sobre el proceso de elución. Sin embargo, éste si depende marcadamente de la conductividad del buffer de elución, siendo un valor de $\sim 20 \text{ mS}/\text{cm}$ alcanzado con CitB (10 mM , $\text{pH} 5,0$, $\text{NaCl} 0,2 \text{ M}$) el mínimo necesario para lograr un 100% de elución cuando se trabajó con MFV individuales. Al trabajar a una mayor escala los requerimientos de conductividad para lograr un 100% de elución subieron a valores de $\sim 40 \text{ mS}/\text{cm}$ alcanzado con CitB (10 mM , $\text{pH} 5,0$, $0,5 \text{ M NaCl}$).

La capacidad de adsorción de la enzima por los MFV se mantuvo en niveles altos, incluso cuando los MFV fueron reutilizados repetidamente y en presencia de células de *G. klebahnii*. Lo anterior indica que el proceso de adsorción de la enzima al microfiltro, bajo las condiciones empleadas, no lo deteriora de forma significativa ya

que los mismos pueden usarse para filtrar más de 4 L manteniendo la capacidad de adsorción en niveles superiores al 80 %. Estos resultados confirman los parámetros de Langmuir obtenidos con las isotermas de adsorción.

Al trabajar a mayor escala, usando buffer de elución con conductividad de 40 mS/cm, se alcanza una recuperación de la enzima del orden de 90 %, con un nivel de concentración entre $5,0 \times$ y $7,0 \times$. Niveles superiores de elución fueron logrados, pero con detrimento en el nivel de concentración de la enzima.

3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castilho, L. R., Anspach, F. B. & Deckwer, W. D. (2002) Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins. *Journal of Membrane Science*, **207**, 253-264.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Mignone, C. F. (2000) Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **25**, 260-265.
- Chang, C. S. & Suen, S. Y. (2006) Modification of porous alumina membranes with n-alkanoic acids and their application in protein adsorption. *Journal of Membrane Science*, **275**, 70-81.
- Chen, Y. S., Chang, C. S. & Suen, S. Y. (2007) Protein adsorption separation using glass fiber membranes modified with short-chain organosilicon derivatives. *Journal of Membrane Science*, **305**, 125-135.
- Doran, P. M. (1998) Principios de Ingeniería de Bioprocesos. Acribia, Zaragoza.
- Duncan, M., Gilbert, M., Lee, J. & Warchol, M. (1994) Development and comparison of experimental assays to study protein/peptide adsorption onto surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, **165**, 341-345.
- Gebauer, K. H., Thömmes, J. & Kula, M. R. (1997) Breakthrough performance of high-capacity membrane adsorbents in protein chromatography. *Chemical Engineering Science*, **52**, 405-419.
- Green, J. R. & Margerison, D. (1978) Statistical treatment of experimental data. Elsevier, New York.
- Green, S. & Wase, J. (1986) Practical and theoretical aspects of inorganic adsorbents technology in downstream processing. *Process Biochemistry*, **21**, 200-203.
- Huang, Q., Zhao, Z. & Chen, W. (2003) Effects of several low-molecular weight organic acids and phosphate on the adsorption of acid phosphatase by soil colloids and minerals. *Chemosphere*, **52**, 571-579.
- Kyung, H. Y., Ae, J. & W. (1996) Solid-state ^1H and ^{29}Si NMR studies of silicate and borosilicate gel to glass conversion. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **17**, 696-699.
- Langmuir, I. (1918) The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of American Chemical Society*, **40**, 1361-1366.
- Lowry, O. H., Rosebrough, A. L., Farr, A. & Randall, R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1993**, 265-275.

- Malvern Company . Protein solutions in research and development.
http://www.malvern.com/LabEng/industry/protein/protein_solutions.htm Accessed March. 2008.
Ref Type: Electronic Citation
- Messing, R. (1975) Adsorption of proteins on glass surfaces and pertinent parameters for the immobilization of enzymes in the pores of inorganic carriers. *Journal of Non-crystalline solids*, **19**, 277-283.
- Nakamura, K. & Matsumoto, K. (1998) Adsorption behavior of BSA in microfiltration with porous glass membrane. *Journal of Membrane Science*, **145**, 128.
- Nakamura, K. & Matsumoto, K. (2006) Properties of protein adsorption onto pore surface during microfiltration: Effects of solution environment and membrane hydrophobicity. *Journal of Membrane Science*, **280**, 363-374.
- Nakamura, T., Hours, R. A. & Sakai, T. (1995) Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science*, **60**, 468-472.
- Parida, S. K., Dash, S., Patel, S. & Mishra, B. K. (2006) Adsorption of organic molecules on silica surface. *Advances in Colloid and Interface Science*, **121**, 77-110.
- Saiful, Borneman, S. & Wessling, M. (2006) Enzyme capturing and concentration with mixed matrix membrane adsorbers. *Journal of Membrane Science*, **280**, 406-417.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. & Vandamme, J. (1993) Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, **39**, 213-294.
- Slack, S. M. & Horbett, T. A. (1991) The effects of temperature and buffer on fibrinogen adsorption from blood plasma to glass. *Journal of Biomaterials Science-Polymers edition*, **2**, 227-237.
- Smith, B. J. (1984) SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods in Molecular Biology* (ed J. M. Walter), pp. 41-56. The Humana Press Inc: Clifton, New Jersey.
- Stebbins, J. F., Zhao, P. & Kroeker, S. (2000) Non-bridging oxygens in borate glasses: characterization by ¹¹B and ¹⁷O MAS and ³QMAS NMR. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, **16**, 9-19.
- Tomao, V., Siouffi, A. M. & Denoyel, R. (1998) Influence of time and temperature of hydrothermal treatment on glass fibers surface. *Journal of Chromatography A*, **829**, 367-376.
- Voget, C. E., Vita, C. E. & Contreras Esquivel, J. C. (2008) One-step concentration and partial purification of *Aspergillus kawachii* non-acidic polygalacturonases by adsorption to glass fiber microfilters. *Biotechnology Letters*, **28**, 233-239.
- Zapata Zapata, A. D., Cavalitto, S. F. & Hours, R. A. (2008a) Protopectinase production by *Geotrichum klebahnii* in fed-batch culture in syntetic medium (ISBN 978-968-9406-00-6).
- Zapata Zapata, A. D., Escobar Guerra, C. A., Cavalitto, S. F. & Hours, R. A. Solubilización enzimática de pectina de cáscara de limón con Protopectinasa-SE. VITAE . 2008b.
Ref Type: In Press
- Zapata Zapata, A. D., Sainz, R. B., Cavalitto, S. F. & Hours, R. A. (2007) Maceración de Albedo de Limón con Protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii*. *Congreso Argentino de Microbiología*.

CAPÍTULO 4

ACCIÓN DE PROTOPECTINASA-SE DE *Geotrichum klebahnii* SOBRE PROTOPECTINA DE CÍTRICOS: ESTUDIO DE ADSORCIÓN Y CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN DE PECTINA

RESUMEN

Se estudio el efecto de algunas variables fisicoquímicas sobre la adsorción de PPasa-SE a protopectinas de limón (*Citrus limon*) y de naranja amarga (*Citrus aurantium*), y su capacidad de solubilización de pectina. La composición del medio y el tamaño de la partícula mostraron una fuerte influencia sobre la adsorción, la cual, bajo ciertas condiciones, mostró un comportamiento ajustable al modelo de Langmuir. Se evidenció también que la estructura de la protopectina permite explicar los fenómenos de adsorción y desorción de la enzima sobre la partícula, observando que la formación de estructuras cristalinas durante la acción enzimática limita el proceso. El pH, la temperatura y la concentración de buffer ácido cítrico - citrato de Na (CitB), ejercieron un importante efecto sobre el proceso de solubilización de pectina a partir de protopectina, alcanzando un nivel óptimo de solubilización a pH 5,0, 37 °C y concentración de CitB = 25 mM. Usando protopectina y albedo, de limón y de naranja amarga, se obtuvieron pectinas de alto grado de esterificación, contenido de ácidos urónicos de 65 % y un rendimiento mayor a los reportados por otros autores. Los estudios cinéticos mostraron que el proceso de solubilización de pectina a partir de protopectina de limón, se ajusta adecuadamente al modelo de Michaelis-Menten, con parámetros cinéticos de: $v_m = 57,3 \pm 2,9$ g/L.h y $K_M = 30,2 \pm 4,0$ g/L. La concentración de enzima no mostró un importante efecto sobre la velocidad inicial de reacción.

4.1. INTRODUCCIÓN

Las pectinas constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos ácidos con propiedades de gelificación, estabilización de emulsiones y aporte de fibra nutricional, las cuales las hacen sumamente útiles en las industrias alimenticia y farmacéutica. En su elaboración industrial se utilizan subproductos de la producción de jugos de fruta, principalmente cáscaras de cítricos y orujo de manzana. Su precursor es la protopectina la cual se define como la sustancia péctica insoluble en agua que origina pectina soluble por depolimerización parcial (Van Buren 1991; Baciú & Jördening 2005).

La extracción por métodos convencionales consiste en una hidrólisis ácida y en caliente de la materia prima, llevando consigo algunos inconvenientes, *i.e.* manejo de altas temperaturas y reactivos altamente corrosivos, que deterioran los equipos y generan problemas de contaminación (Sakai *et al.* 1993). Por ello, se han planteado diversas alternativas para la extracción de pectina, las cuales incluyen métodos microbiológicos o enzimáticos, estos últimos basados en el uso de protopectinasas (Sakai 1988). Con estos métodos se logra el aprovechamiento de residuos agrícolas mediante tratamientos biotecnológicos innovadores y de bajo impacto ambiental.

La extracción enzimática de pectina es un ejemplo clásico de reacción heterogénea. No obstante, el estudio de éste tipo de reacciones enzimáticas se ha desarrollado particularmente utilizando sustratos como celulosa y hemicelulosa, sistemas en los cuales tanto las propiedades de las correspondientes enzimas como la composición y las características estructurales del material revisten particular importancia (Sun Bok Lee & Dewey 1982; Gama *et al.* 1994; Boussaid & Saddler 1999). A diferencia de las reacciones catalizadas por celulasas y hemicelulasas, muy poco se ha estudiado sobre las reacciones heterogéneas catalizadas por pectinasas (Cavalitto *et al.* 1997). El presente trabajo pretende ahondar el conocimiento sobre los fenómenos de adsorción de la PPasa-SE a protopectina de limón, y su acción en la solubilización de pectina, con el objeto de aumentar el rendimiento del proceso.

En éste capítulo, se presentan los resultados obtenidos con respecto al estudio de la acción de la PPasa-SE sobre protopectina de limón (*Citrus limon*) y de naranja amarga (*Citrus aurantium*), relacionados con las características de adsorción y el efecto de diferentes variables fisicoquímicas, *i.e.* pH, concentración de buffer, temperatura, etc., sobre la capacidad de solubilización de pectina a partir de protopectina y de albedo.

La pectina obtenida fue parcialmente caracterizada. Finalmente se estudió el efecto de la concentración de sustrato y enzima sobre la velocidad inicial de reacción, usando protopectina de limón.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Reactivos químicos

Los compuestos *m*-hidroxidifenilo, ácido poligalacturónico, ácido galacturónico monohidrato y el reactivo de Folin-Ciocalteu fueron adquiridos comercialmente a Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo); Aldrich (MI); o Merck (Dramstad). Todos los demás reactivos empleados fueron comercialmente disponibles y de grado analítico.

4.2.2. Fuente de enzima

Geotrichum klebahnii ATCC 42397 se cultivó en un biorreactor LH 210 (Inceltech, France) de 5,0 L, en la modalidad de lote alimentado alimentado, utilizando un medio constituido por glucosa, urea, sales y micronutrientes, el cual fue definido en el Capítulo 2. La biomasa se separó por centrifugación (10 min, 4 °C) a 16,000 × g, y el sobrenadante se concentró por evaporación a presión reducida en rotavapor, liofilizó y almacenándose posteriormente a -20 °C. Para su utilización la enzima fue resuspendida en agua desionizada y almacenada nuevamente a -20 °C. Esta solución se denominará de ahora en adelante Solución Concentrada (SC), la cual presentó una actividad PGasa de 1.500 U/mL (300 U/mg de proteína). La SC es diluida al momento de su utilización con una solución buffer definida en cada experimento.

4.2.3. Obtención de protopectina de limón y de naranja amarga. Tratamiento con etanol frío

Se seleccionaron frutos frescos y maduros de limón (*Citrus limon* Burm, cv. Lisbon) y de naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.), los cuales se refrigeraron 12 h antes de su utilización. Se extrajo la parte superficial coloreada de la cáscara (flavedo), la cual

fue descartada. El albedo, extraído con ayuda de una cuchilla, se trituró en una procesadora de alimentos de doméstica. Posteriormente se adicionó 1 mL de etanol 96 % (p/v) por gramo de albedo húmedo, dejando en reposo en heladera por 24 h a los efectos de provocar la inhibición de las enzimas endógenas del tejido vegetal, particularmente la pectin-esterasa. El albedo en suspensión fue tamizado, seleccionando los tamaños de partícula según la retención en las mallas 10, 16 y 20 (serie Tyler), cuyos diámetros de abertura son 1.700, 1.000 y 850 μm , respectivamente. Las partículas que atravesaron la malla 20 ($\text{Ø} < 850 \mu\text{m}$) se descartaron ya que experiencias preliminares demostraron que al secarlas se convierten en un material de difícil manejo. Las partículas retenidas por las mallas 10 ($\text{Ø} > 1.700 \mu\text{m}$) y 16 ($1.700 \mu\text{m} > \text{Ø} > 1.000 \mu\text{m}$), se volvieron a procesar para disminuir su tamaño, y nuevamente se tamizaron. Este procedimiento se repitió varias veces con el objeto de aumentar el rendimiento de partículas que pasan a través de la malla 16 y quedan retenidas en la 20 ($1.000 \mu\text{m} > \text{Ø} > 800 \mu\text{m}$). Las partículas así obtenidas se lavaron cuidadosamente con abundante agua a temperatura ambiente hasta obtener reacción negativa al *m*-hidroxidifenilo en las aguas de lavado, indicando una cantidad no detectable de sustancias pécticas espontáneamente solubles determinadas por su contenido en grupos urónicos. Luego, el tejido se escurrió por suave compresión en una tela de trama fina y al producto obtenido, todavía húmedo, se le adicionó acetona y posteriormente se secó en estufa a 30 °C. Una vez seco el tejido, fue tamizado para obtener la serie de tamaños correspondientes a la retención en los tamices 20, 35 y 50 ($\text{Ø} = 850, 425 \text{ y } 300 \mu\text{m}$, respectivamente). De esta manera, los diámetros de las partículas obtenidas, asumiendo geometría esférica, fueron: retenidas en tamiz 20 ($\text{Ø} > 850 \mu\text{m}$), retenidas en tamiz 35 ($850 \mu\text{m} > \text{Ø} > 425 \mu\text{m}$) y retenidas en tamiz 50 ($425 \mu\text{m} > \text{Ø} > 300 \mu\text{m}$). El rendimiento del proceso de extracción de protopectina fue de 35 % (350 mg de protopectina/g de albedo en base seca). El sustrato se conservó a temperatura ambiente en recipientes cerrados (Cavalitto *et al.* 1997; Ferreyra *et al.* 2002).

4.2.4. Isotermas de adsorción de PPasa-SE a protopectina de limón

Se evaluó el efecto del tamaño de partícula (tamiz 20, 35 y 50) y la composición del medio de acuerdo al buffer usado: a) buffer ácido acético – acetato de Na (AcB) 20 mM, b) buffer ácido cítrico – citrato de Na (CitB) 10 mM y c) buffer citrato de Na 12.5

mM/fosfato di-básico de Na 6.25 mM (BCP 1/4). El pH de todas las soluciones buffer fue 5,0 y su conductividad eléctrica, medida con un conductímetro (HI 3291, Hanna), fue de 1,2 mS, 1,4 mS y 1.9, respectivamente.

Las isotermas de adsorción se construyeron adicionando 10 mL de solución buffer a 200 mg de protopectina (20 mg de protopectina/mL), usando un frasco de 50 mL en baño de hielo/agua. Esta mezcla se agitó en un sistema rotatorio (150 rpm, 5 min.) (Centricol Co., Colombia). Luego se retiró el líquido con una pipeta provista de una tela plástica filtrante en su extremo para evitar el paso del material particulado. Esta operación se repitió 9 veces, adicionando a la protopectina, ya hidratada, 10 mL de una solución PPasa-SE (actividad PGasa: 25 U/mL), la cual fue preparada a partir de la SC diluida con el buffer correspondiente a cada experimento. Las muestras se almacenaron a -20 °C para las determinaciones analíticas respectivas. La cantidad de enzima adsorbida por la protopectina, expresada en U/mg de protopectina, fue calculada por medio de la diferencia entre la actividad de la alimentación y la del permeado, de acuerdo a la siguiente expresión: $(A_A - A_P) \times V_A / 200$ mg donde A_A y A_P son las actividades PGasa de la alimentación y el permeado, respectivamente, V_A es el volumen de la solución y 200 mg es la cantidad de protopectina utilizada en los ensayos.

4.2.5. Solubilización de pectina a partir de protopectina de limón y de naranja amarga

Se evaluó el efecto del pH, la concentración de buffer y la temperatura sobre la capacidad de solubilización de pectina (expresada como ácidos urónicos) a partir de protopectina de limón y de naranja amarga, a una concentración de 20 mg/mL (30 mg de protopectina + 1,5 mL de buffer). Se usó una concentración de enzima de ~ 1,7 U/mg de protopectina (equivalente a 35 U/mL), valor correspondiente a la máxima adsorción de la enzima que fue obtenido a partir de los resultados de la isoterma de adsorción que se describe posteriormente, y que según diferentes reportes sería que realmente actúa en el proceso de catálisis heterogénea (McLaren & Packer 1970; Cavalitto *et al.* 1999). Ensayos preliminares usando la enzima purificada por adsorción a microfiltros de fibra de vidrio (ver Capítulo 3) no mostraron diferencias en los resultados, debido posiblemente al alto grado de dilución de la enzima. El proceso se llevó a cabo por 6 h a 150 rpm. Experimentos preliminares permitieron definir que CitB y partícula de tamiz 35, son adecuados en el proceso de solubilización. Posteriormente se utilizó el diseño

estadístico Doehlert con superficie de respuesta, el cual se describe detalladamente en el Anexo 1, para la optimización de los niveles de los factores pH, concentración de CitB y temperatura, trabajados en los siguientes rangos: pH (3,0 – 6,0), concentración de CitB (5,0 – 45,0 mM) y temperatura (30 – 44 °C).

4.2.6. Solubilización de pectina a partir de albedo de limón y naranja amarga

Se calculó la concentración de albedo necesaria en los ensayos, para lograr equivalencia, en términos de material péctico, con la cantidad de protopectina usada en los mismos ensayos. Este cálculo se efectuó con previo conocimiento del rendimiento en la extracción de protopectina y de la humedad del albedo. Los resultados de estos cálculos indicaron que una concentración de protopectina de 0,02 g de protopectina/mL, la cual es equivalente a 0,3 g albedo/mL. La dilución de la SC se hizo con CitB (25 mM, pH 5,0), alcanzando una actividad PGasa de 30 U/mL. El proceso se llevó a cabo por 6 h, a 150 rpm y 37 °C.

La pectina obtenida fue separada de la solución filtrando a través de una tela de trama angosta, para luego adicionar al permeado etanol 96 % (v/v) en una relación de 3 volúmenes de etanol a un volumen de permeado. Esta solución se mantuvo a 4 °C por 2 h, período en el cual se formó un gel de pectina con posibles pequeñas cantidades de materiales insolubles, *i.e.* celulosa. Este gel se denominará materia insoluble en etanol (MIE). El MIE se centrifugó (10.000 × g, 15 min, a 4 °C) descartándose el sobrenadante. Esta operación fue repetida dos veces mas adicionando etanol 70 % (v/v), con el propósito de eliminar los oligómeros y monómeros que corresponden a la fracción soluble en etanol, y luego se determinó el peso seco. En este caso la medida de pectina corresponderá al peso seco del MIE (Contreras Esquivel 2003).

Se comparó el rendimiento obtenido en la extracción de pectina a partir de albedo de naranja amarga, tanto por el método enzimático, como por el método químico de hidrólisis ácida, el cual se realizó de la siguiente manera: a 15 g de albedo se le adicionaron 50 mL de H₂O destilada y se calentó hasta ebullición con agitación continua, buscando así inhibir las enzimas pécticas endógenas. Posteriormente, se retiró el líquido y se adicionaron 50 mL de H₂O destilada, llevándose la solución a pH = 1,5 con HCl(c). Se dejó en ebullición por 40 min, y posteriormente se separó la pectina siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente en el método enzimático.

4.2.7. Estudio cinético de la acción de PPasa-SE a protopectina de limón

Se utilizó protopectina de limón (tamiz 35), en una concentración de 20 mg/mL empleando CitB (25 mM, pH 5,0). El volumen de reacción fue 1,5 mL y la actividad PGasa utilizada fue ~ 34 U/mL. La reacción se llevó a cabo durante 4 h, a 150 rpm y 37 °C. Se estudió el efecto de la concentración de protopectina en el rango de 2 hasta 120 g/L sobre la velocidad inicial de reacción, así como el efecto de la concentración de enzima (9, 20, 35 y 50 U/mL), manteniendo la concentración de protopectina en 20 mg/mL. Las velocidades iniciales de reacción se calcularon a partir de las pendientes de las curvas de AGA en función del tiempo de reacción (para los primeros 5 min de reacción).

4.2.8. Medida de actividad enzimática (PGasa)

Se utilizó el método descrito en el Capítulo 2.

4.2.9. Determinación de ácidos urónicos

Se utilizó el método del *m*-hidroxidifenilo (mhdf), utilizando una curva patrón de AGA monohidrato (0-150 mg/L), tratada de igual manera que las muestras (Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973).

4.2.10. Determinación de la porosidad de las partículas de protopectina

Se colocó una cantidad exactamente pesada de protopectina (W) en una probeta graduada y se leyó el volumen (en mL) que ocupa (V_1). Posteriormente, se adicionó el mismo volumen V_1 de un líquido de desplazamiento, el cual no debe generar ninguna interacción con la partícula que modifique su estructura. Para este fin, se prefiere un compuesto orgánico, particularmente alcoholes conteniendo 3 ó 4 unidades de esqueleto carbonado. En el presente estudio se utilizó alcohol *iso*-propílico. Posteriormente, se midió el volumen total de la mezcla en mL (V_2). Con estos datos se calculó la densidad verdadera del material, $TD = (W/(V_2-V_1))$ y la observada, $OD = (W/V_1)$, y con ellas la porosidad de la partícula mediante la fórmula: $1 - (OD/TD)$ (Samejima *et al.* 1982).

4.2.11. Microscopía electrónica de barrido

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (J5M-5910LV, JEOL, Japón), que utiliza un recubrimiento de oro-paladio de 8 nm, a una presión de 40 a 50 Pa y un voltaje de 15 kV.

4.2.12. Determinación del grado de esterificación de la pectina. Método titulométrico

Se disolvieron 50 mg de pectina en 10 mL de H₂O, luego se agregaron 2 gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0,5 M (V₁). Posteriormente, se agregó 1 mL de NaOH (0,5 M) y se dejó en reposo por 15 min. A continuación la solución fue neutralizada con 1 mL de HCl (0,5 M) y agitada vigorosamente. Se tituló nuevamente con NaOH (0,5 M) (V₂). El grado de esterificación (GE) fue calculado mediante la Ec. 4.1 (Kim *et al.* 2000).

$$GE (\%) = \frac{V_2}{V_1 + V_2} \times 100 \quad \text{Ec. 4.1}$$

4.2.13. Determinación del grado de esterificación de la pectina. Método espectrofotométrico

Esta técnica consiste en la medida del metanol liberado por una solución de pectina durante un proceso de desesterificación que se realiza adicionando 0,25 mL de NaOH (1,5 M) a 0,5 mL de una solución de pectina (100 mg/L disuelta en agua). La solución se agitó vigorosamente. Después de 30 min a temperatura ambiente las muestras fueron acidificadas con 0,25 mL de H₂SO₄ (2.75 M). A continuación, la solución se enfrió en baño de hielo/agua, y posteriormente se midió la cantidad de metanol presente de la siguiente manera: a 0,25 mL de la solución de pectina desesterificada se agregaron 50 µL de solución KMnO₄ 2 % (p/v), agitando fuertemente y dejando en el baño de hielo/agua por 15 min. Luego se agregaron 200 µL de solución de Na₃AsO₄ (0,5 M), preparada en 0,12 N de H₂SO₄ y se dejó 1 h a temperatura ambiente. Luego se agregaron 500 µL de solución de pentano-2,4-diona (0,02 M), la cual se preparó en solución de acetato de amonio (2 M) y ácido acético (0,05 M), para

luego calentar por 15 min a 60 °C. Por último se llevó a temperatura ambiente y se leyó A₄₁₂. La curva de calibración se preparó a partir de soluciones de metanol en agua (0,3-2,0 mM) frente a un blanco de agua destilada. Tanto el blanco como la curva se procesaron igual que las muestras (Wodd & Siddiqui 1971).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Isotermas de adsorción de PPasa–SE sobre protopectina de limón

Los procesos de adsorción forman parte importante del fenómeno de catálisis heterogénea, que dependen de la estructura de la partícula y la composición del medio de reacción, además de otras variables operacionales como el pH y la temperatura. En el presente estudio se utilizaron alternativamente dos factores, a saber: a) la composición del buffer de dilución de la enzima (AcB 20 mM, CitB 10 mM y BCP 1/4, con valores de pKa de 4,76, 3,13 y 6.82, respectivamente); y b) el tamaño de partícula, el cual fue definido por la retención en tamices 20, 35 y 50 de la serie Tyler. Los ensayos se realizaron a una temperatura de 4-8 °C con el objeto de atenuar la velocidad de la reacción enzimática. Las diferencias fisicoquímicas que presentan las soluciones buffer empleadas (carga, tamaño iónico) permitieron establecer diferentes interacciones entre el buffer, la enzima y la protopectina, trabajando en todos los casos a pH 5,0.

4.3.1.1. Isotermas de adsorción usando AcB (20 mM, pH 5,0)

En la Fig. 4.1 se observa que al usar tamiz 50, el sistema se comporta de acuerdo al modelo de Langmuir, el cual se describe matemáticamente según la Ec. 4.2.

$$q = \frac{q_m C}{K_d + C} \quad \text{Ec. 4.2}$$

donde q es la actividad de la enzima adsorbida por la protopectina (U/mg de protopectina), C es la actividad de la enzima en equilibrio (U/mL), q_m es la máxima capacidad de adsorción de enzima por parte de la protopectina (U/mg de protopectina) y K_d es la constante de equilibrio de disociación (U/mL).

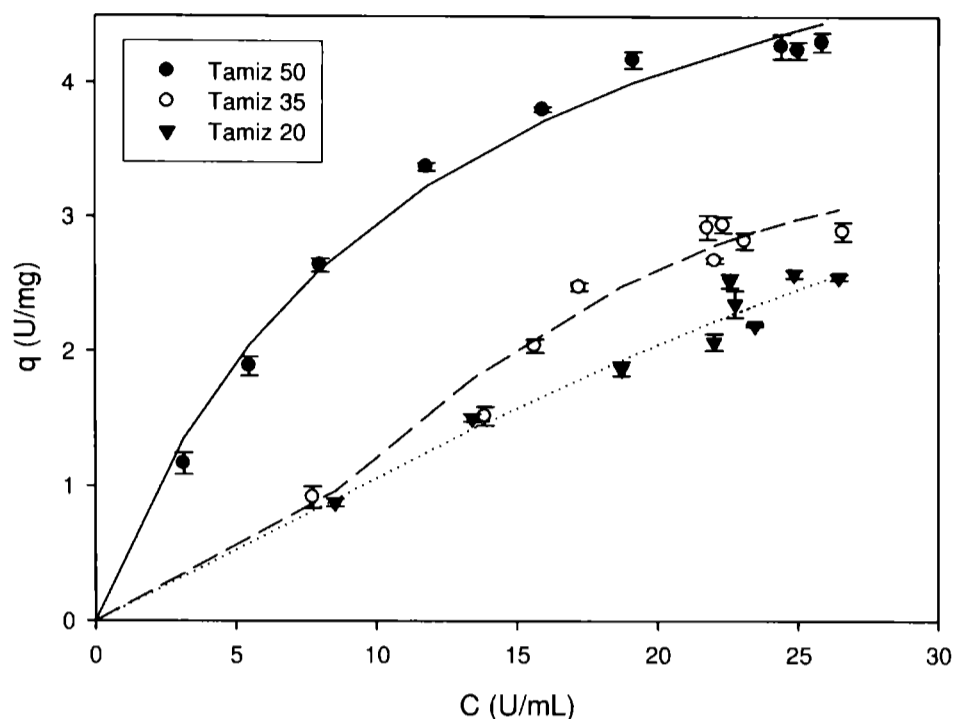


Figura 4.1. Isotermas de adsorción de PPasa-SE sobre protopectina de limón, usando AcB (20 mM, pH 5,0), a 150 rpm y ~ 4 - 8 °C. Concentración de sustrato: 20 mg/mL. Concentración de enzima: 25 U/mL.

Los parámetros del modelo, para el tamiz 50, fueron calculados por medio de una regresión no lineal usando el programa Sigma Plot (SYSTAT Software Inc.), y son: $q_m = 6,5 \pm 0,7$ U/mg de protopectina (21,5 mg proteína/g de protopectina) y $K_d = 11,9 \pm 3,0$ U/mL, con un $R^2 = 0,98$.

Estudios de adsorción de celulasa en un material de celulosa microcristalino de tamaño desconocido, reportan un valor para K_d cercano a 4 mg de proteína/mL y un valor de $q_m = 150$ mg proteína/g de celulosa (Boussaid & Saddler 1999). Usando una celulasa de *Trichoderma reesei*, se reportan valores de K_d de 0,19 a 16,7 mg proteína/mL, dependiendo del tipo específico de celulosa a la que se adsorba y sus condiciones de pre-tratamiento (Sun Bok Lee & Dewey 1982). De igual manera, usando celulasa y una celulosa comercial, se reportan valores de q_m entre 0,38 y 69 mg de proteína/g de celulosa (Gama *et al.* 1994). Esta información permite apreciar el gran efecto que presenta el tipo de enzima y las características del material adsorbente sobre la constante de equilibrio y la capacidad máxima de adsorción. No se encontraron reportes sobre constantes de equilibrio para sistemas PPasa - protopectina, pero el valor bajo de K_d obtenido en este trabajo, comparado con los trabajos para sistemas de celulasa-celulosa, sugiere una alta afinidad de la enzima por el sustrato.

A pesar de que los ensayos de adsorción fueron realizados a temperaturas bajas (4-8 °C), no fue posible evitar la reacción enzimática, con lo cual durante todos los ensayos de adsorción se detectó pectina solubilizada (Anexo 2). Otros autores también han descrito altos niveles de hidrólisis de celulosa a partir de celulosa tanto en ensayos a 4 °C como a 50 °C (Sun Bok Lee & Dewey 1982).

Las isothermas obtenidas con protopectina tamiz 35 y 20 (Fig. 4.1) muestran puntos de inflexión asociados a cambios de concavidad de la función, los cuales se presentan cuando se describen procesos de adsorción en multicapa, que no están contemplados en el modelo de Langmuir, lo que explica la falta de ajuste a ese modelo (Parida *et al.* 2006). De igual manera se observa una mayor capacidad de adsorción con el tamiz 50, evidenciando el efecto del área superficial sobre el proceso de adsorción de PPasa-SE, lo cual es característico en sistemas de catálisis heterogénea (Sun Bok Lee & Dewey 1982; Tanaka *et al.* 1988; Gama *et al.* 1994; Boussaid & Saddler 1999).

La Fig. 4.2 muestra microfotografías electrónicas que reflejan diferencias estructurales entre las partículas de tamiz 50 y 35, *i.e.* tamaño medio de partícula, estructura amorfa y presencia de alta porosidad. Esta última característica fue determinada experimentalmente para estos dos tamaños de protopectina, utilizando el método aproximado de desplazamiento de volumen, descrito previamente. Los resultados indican valores de porosidad similares (0,81), lo que sugiere que el tamaño de partícula es el factor que más influye sobre la capacidad de adsorción de PPasa-SE y no la porosidad, en nuestro sistema de estudio.

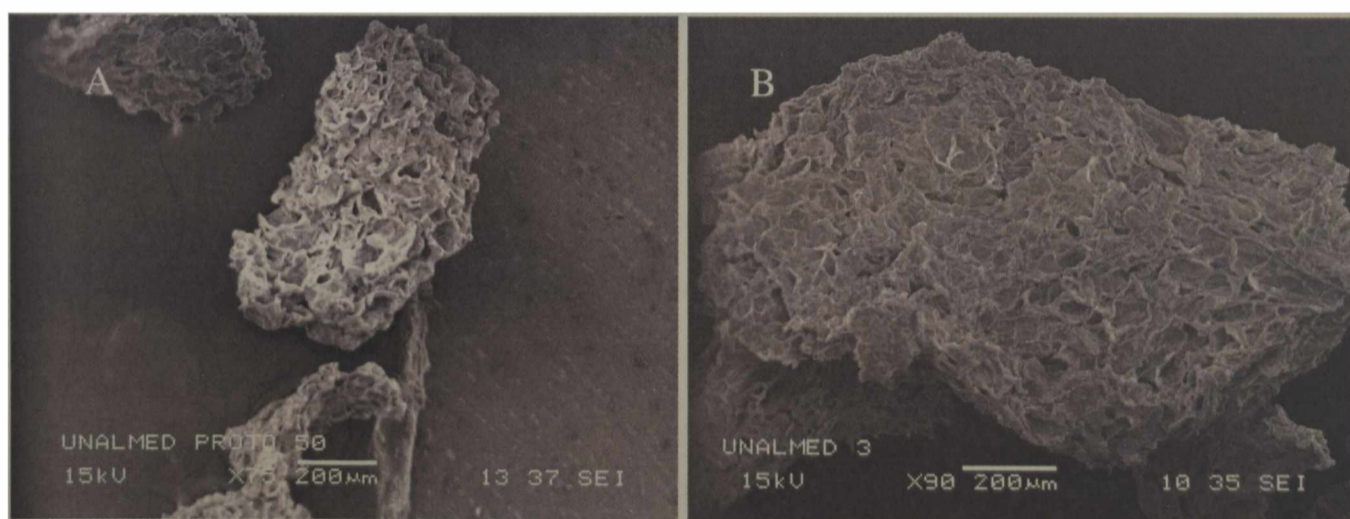


Figura 4.2. Microfotografías electrónicas de barrido para partículas de protopectina de limón. (A) Tamiz 50, (B) Tamiz 35.

4.3.1.2. Isotermas de adsorción usando CitB (10 mM, pH 5,0)

En la Fig. 4.3 se observa un comportamiento similar entre las partículas de tamiz 50 y 35, tanto en la máxima adsorción de enzima, como por la evidencia de una adsorción inicial (representado por líneas), seguida por un proceso de desorción.

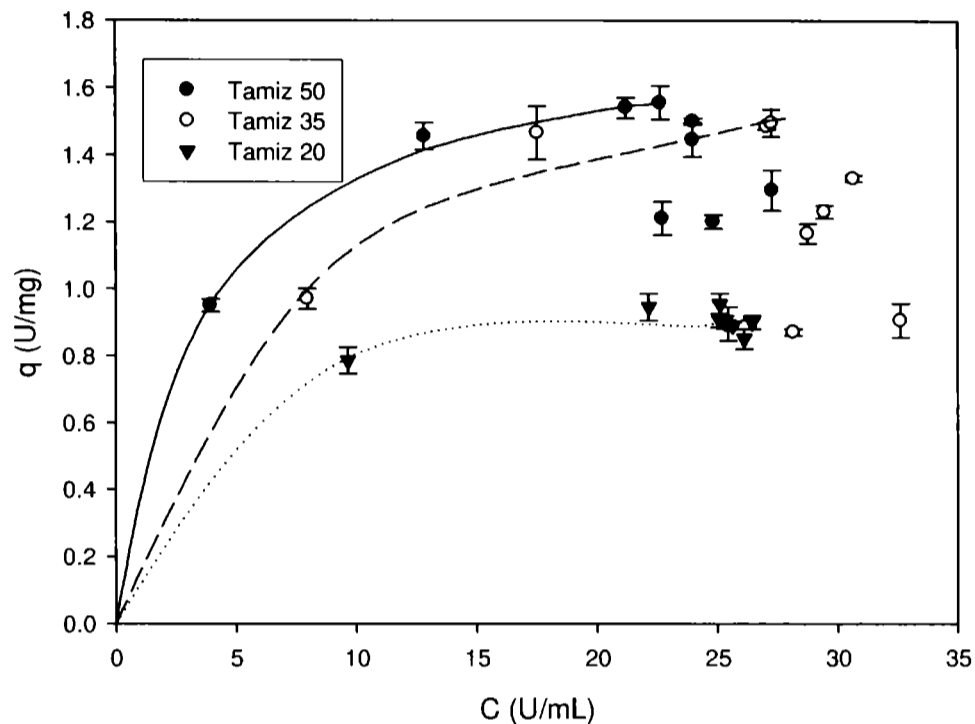


Figura 4.3. Isotermas de adsorción de PPasa-SE sobre protopectina de limón usando CitB (10 mM, pH 5,0), a 150 rpm y ~ 4 - 8 °C. Concentración de sustrato 20 mg/mL. Concentración de enzima 25 U/mL.

La zona de adsorción muestra un comportamiento que responde adecuadamente al modelo Langmuir, con parámetros de a) tamiz 50: $q_m = 1,8 \pm 0,1$ U/mg de protopectina (6,0 mg proteína/g de protopectina), $K_d = 3,5 \pm 0,8$ U/mL ($R^2 = 0.994$), y b) tamiz 35: $q_m = 1,9 \pm 0,5$ U/mg de protopectina (6,1 mg proteína/g de protopectina), $K_d = 7,2 \pm 4,5$ U/mL ($R^2 = 0.964$). Es importante destacar que la inmediata adsorción que se observa con el tamiz 20 impide modelar adecuadamente el sistema.

Se observa un alto error experimental en el parámetro K_d (62 %) cuando se utilizó tamiz 35, debido al escaso número de puntos causados por la rápida adsorción de la enzima. Los análisis de varianza indican que el modelo explica adecuadamente los resultados a α de 0.95 con unos valores de $R^2 = 0,994$ (tamiz 50) y $R^2 = 0,93$ (tamiz 35).

Al comparar los valores de q_m del tamiz 50, usando CitB 10 mM y AcB 20 mM, se observa que con AcB se produce una mayor adsorción. Las razones de esta diferencia podrían explicarse por: a) a niveles de pH de 5,0 el ión citrato posee dos cargas

negativas, a diferencia del ión acetato que posee una carga negativa, b) la cantidad de especies negativas, según la ecuación de Henderson-Hasselbalch, es mayor para el CitB, y c) mayor tamaño del ión citrato. Cualquiera de estas tres razones y/o la combinación de las mismas podrían explicar el hecho de que los iones citrato posean mayor interacción con la enzima (carga residual positiva), disminuyendo su capacidad de adsorción a la protopectina, que posee carga negativa al pH experimental del ensayo.

Otros trabajos han indicado que en sistemas celulosa – celulasa se observan fenómenos de adsorción y desorción de la enzima (Gan *et al.* 2003), lo cual es coincidente con lo observado en la Fig. 4.3. Dos posibles explicaciones de este fenómeno pueden ser atribuidas a: a) al emplear CitB se observa mayor solubilización de pectina en comparación con AcB (Anexo 2), desintegrando rápidamente la partícula, y permitiendo que la enzima adherida se libere nuevamente al medio, y b) La acción enzimática se ejerce únicamente sobre la estructura amorfa de la partícula, la cual cambia a estructura cristalina durante la reacción enzimática, tal y como se observa en la Fig. 4.4, y sugerido por otros autores (Sun Bok Lee & Dewey 1982; Al-Zuhair 2007).

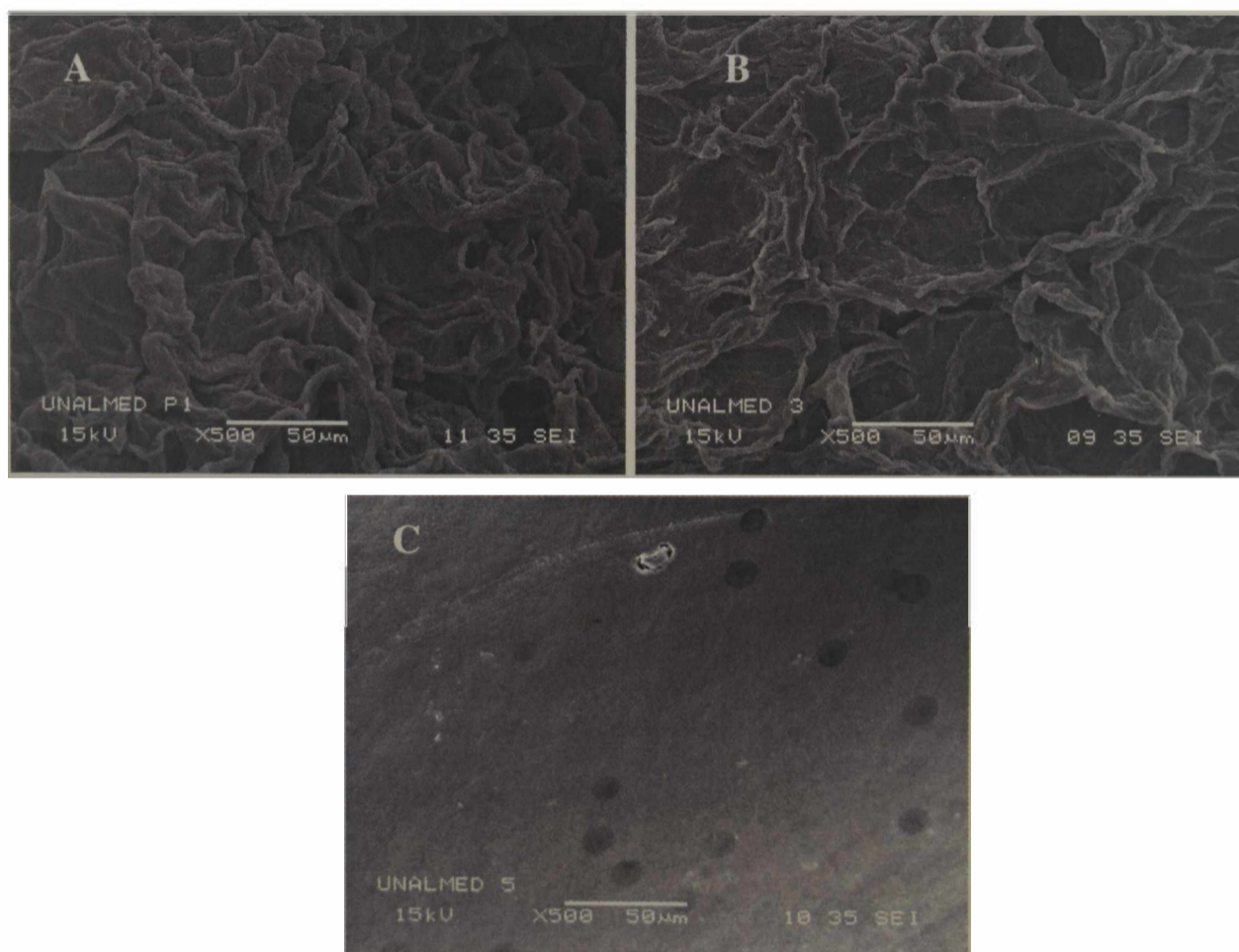


Figura 4.4. Microfotografías electrónicas de barrido de protopectina de limón tamiz 35. A: estructura amorfa antes de tratamiento. B: estructura amorfa después del contacto con CitB (10 mM, pH 5,0), C: estructura cristalina después del contacto con PPasa-SE (30 U/mL) en CitB (10 mM, pH 5,0). Los tratamientos se hicieron a ~ 4 - 8 °C, 150 rpm.

4.3.1.3. Isotermas de adsorción usando BCP 1/4 (pH 5,0)

La Fig. 4.5, en la que se observa las isotermas de adsorción usando BCP 1/4, muestra resultados muy importantes ya que, especialmente con el tamiz 50, permite confirmar el comportamiento que se ha observado con el AcB y CitB en la zona de adsorción, el cual consistió en que las interacciones entre los componentes del buffer y la enzima, definían la máxima capacidad de adsorción de ésta sobre la protopectina. Para este caso, la máxima adsorción de la PPasa-SE sobre la protopectina tamiz 50 fue de 2.5 U/mg protopectina, valor que corresponde a un intermedio entre los obtenidos con los otros dos bufferes. La explicación de éste resultado se basa en la posibilidad que posee el ión fosfato di-básico, con una carga negativa, para intercambiar un protón al ión citrato, que posee dos cargas negativas, y de esta manera neutralizar una de sus cargas, de tal forma que la interacción entre las especies iónicas con la enzima no sea tan elevada como la que se ha observado con el CitB.

La etapa de desorción es similar a la observada al usar CitB, y sus causas son atribuidas a los mismos efectos estructurales mencionados anteriormente, debido a que el proceso de solubilización de pectina fue similar al observado con el CitB, tal y como se observa en el Anexo 2.

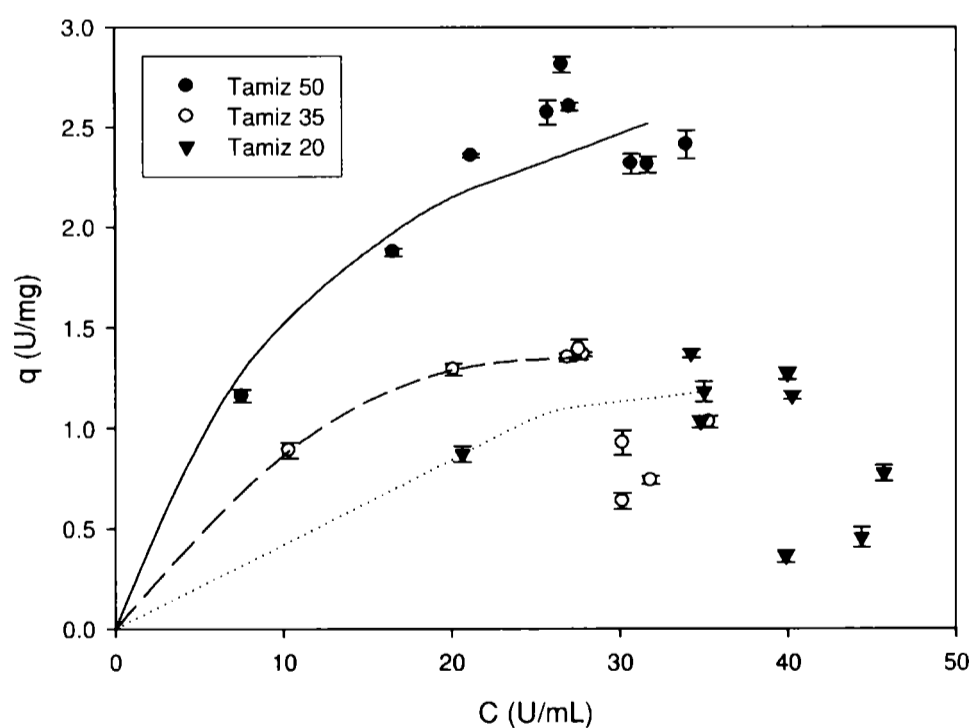


Figura 4.5. Isotermas de adsorción de PPasa-SE sobre protopectina de limón usando BCP 1/4 (pH 5,0), a 150 rpm y ~ 4 - 8 °C. Concentración de sustrato 20 mg/mL. Concentración de enzima 25 U/mL.

4.3.2. Solubilización de pectina de tejidos de limón y naranja amarga usando PPasa-SE

4.3.2.1. Efecto del tamaño de partícula de protopectina y composición del medio

La Fig. 4.6 muestra los resultados de ensayos en las cuales se evaluó el efecto del tipo de buffer (CitB, 10 mM; AcB, 20 mM y BCP 1/4), todos a pH 5,0, y el tamaño de partícula (tamiz 50 y 35) sobre el proceso de solubilización de pectina. Mediante un test de Student ($\alpha = 0.05$), se pudo determinar que no existe diferencia significativa entre los dos tamaños de partícula, independientemente del tipo de buffer utilizado. Tampoco se observó diferencia significativa entre CitB y BCP 1/4, pero si entre cada uno de ellos y AcB. Los resultados mostraron que los mayores niveles de solubilización se obtuvieron con CitB (10 mM) y BCP 1/4. Por tal motivo se seleccionaron el CitB y partículas de protopectina tamiz 35 para los ensayos posteriores.

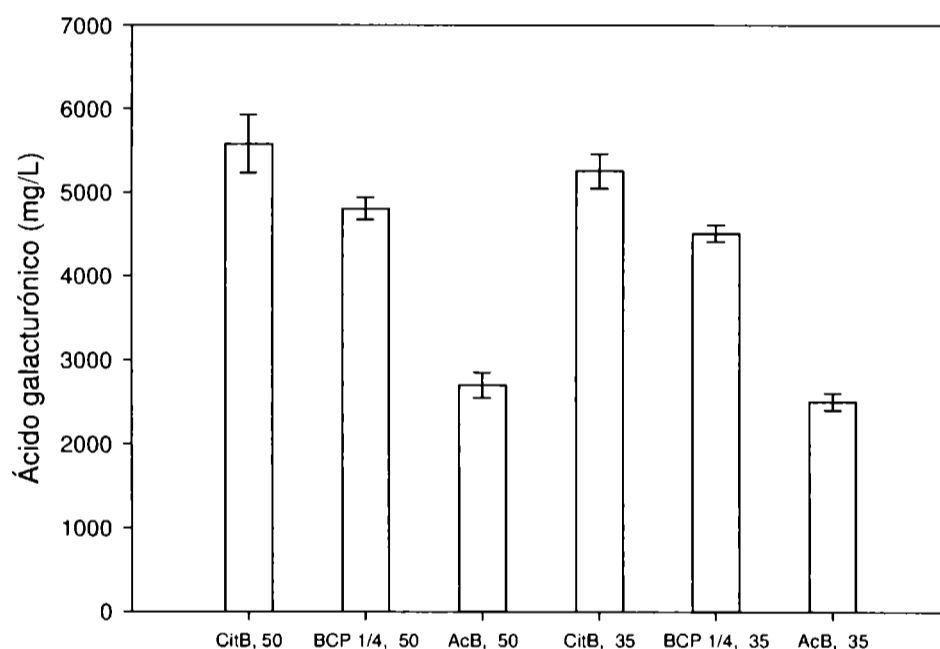


Figura 4.6. Efecto del tipo de buffer (CitB 10 mM, AcB 20 mM y BCP 1/4, todos a pH: 5,0) y el tamaño de partícula (tamices 35 y 50) sobre la capacidad de solubilización de pectina a partir de protopectina de limón. Concentración de sustrato = 20 mg/mL. Concentración de PPasa-SE = 1,7 U/mg de protopectina. Condiciones de reacción: 6 h, 150 rpm, 37 °C.

La diferencia presentada entre CitB (10 mM) y BCP 1/4 por un lado, y el AcB (20 mM) por el otro, puede ser atribuida a la presencia de ácido cítrico, un agente quelante de cationes divalentes, especialmente Ca^{2+} , los cuales están presentes dentro de la estructura de la protopectina y que son los responsables mantener unidas las cadenas lineales de homogalacturonano otorgándole rigidez estructural y causando la insolubilidad de la protopectina. De esta forma, la presencia de dicho ácido, promueve

la separación de las cadenas de homogalacturonano, con la subsecuente solubilización de la pectina (De Bruijn & Biekman 1998; Kim *et al.* 2000). Diferentes autores han utilizado agentes quelantes, *i.e.* EDTA, con el mismo fin (Sato 1968; Chesson 1980; Walter 1991). Además, se ha reportado el efecto sinérgico entre enzimas y algunos ácidos orgánicos sobre la maceración y extracción de pectina (Bateman 1968).

4.3.2.2. Efecto del pH, concentración de CitB y temperatura sobre el proceso de solubilización de pectina

Se utilizó el diseño estadístico Doehlert, descrito en el Anexo 1, para evaluar el efecto del pH, la concentración de CitB y la temperatura, sobre el proceso de solubilización de pectina a partir de protopectina de limón y de naranja amarga.

4.3.2.2.1. Experimentos con protopectina de limón

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados para cada una de las combinaciones de los niveles de los factores arrojados por el diseño experimental, cuyo análisis estadístico se detalla en el Anexo 3.

Tabla 4.1. Solubilización de pectina a partir de protopectina de limón, aplicando el diseño experimental Doehlert. Concentración de protopectina = 20 mg/mL. Concentración de PPasa-SE = 1,7 U/mg de protopectina. Condiciones de reacción: 6 h, 150 rpm. CB: Concentración de CitB.

Ensayo	pH	CB (mM)	Temperatura (°C)	AGA (mg/L)
1	3,8	18,3	30	4.510
2	4,5	38,3	30	5.110
3	5,2	18,3	30	4.440
4	3,0	25,0	37	5.420
5	3,8	5,0	37	5.320
6	3,8	45,0	37	4.830
7	5,2	45,0	37	6.310
8	5,2	5,0	37	4.590
9	6,0	25,0	37	7.670
10	3,8	31,7	44	4.890
11	4,5	11,7	44	4.450
12	5,2	31,7	44	5.590
13	4,5	25,0	37	6.770
14	4,5	25,0	37	7.000
15	4,5	25,0	37	7.330

La Ec. 4.3 representa el modelo matemático obtenido ($R^2 = 0.946$), el cual no incluye los efectos no significativos.

$$\begin{aligned} \text{AGA (mg /L)} = & 7030,7 + 176,7 \times T + 735,9 \times \text{pH} + 471,1 \times \text{CB} - 2631,9 \times T^2 \\ & + 1272,5 \times \text{pH} \times \text{CB} - 2200,3 \times \text{CB}^2 \end{aligned} \quad \text{Ec. 4.3}$$

Posteriormente se calculó, con base en el modelo, la concentración de pectina obtenida para cada temperatura (30, 37 y 44 °C), y con estos valores se realizaron las superficies de respuesta que se muestran en la Fig. 4.7.

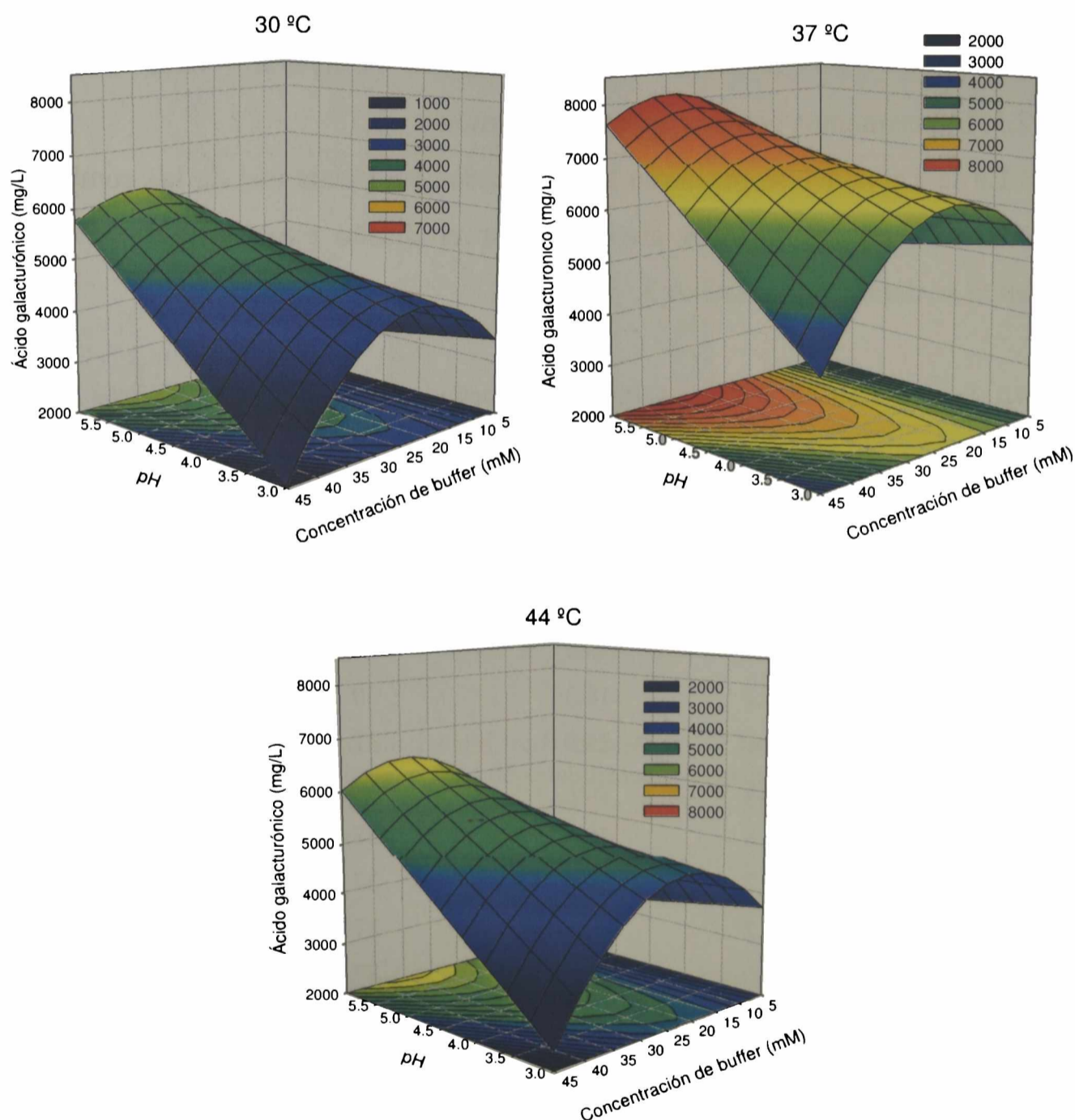


Figura 4.7. Superficies de respuesta usando protopectina de limón. Concentración de protopectina = 20 mg/mL. Concentración de PPasa-SE = 1,7 U/mg de protopectina. Condiciones de reacción: 6 h, 150 rpm.

El programa MATLAB[®] permitió optimizar el modelo, dando como condiciones óptimas para la solubilización de pectina: 37 °C, CitB 34 mM y pH 6,0. No obstante, ya que la PPasa-SE es inestable a $\text{pH} \geq 6.0$ (Ferreira *et al.* 2002), se definió un valor de $\text{pH} = 5,0$, recalculando así los valores óptimos de los otros factores (25 mM y 37 °C). Sin embargo se recomienda, sin mayor detrimento en el nivel de solubilización de pectina, trabajar a $\text{pH} < 4.0$, para evitar posibles contaminaciones, especialmente a mayor escala.

Los resultados de la superficie de respuesta en condiciones de 37 °C, CitB (10 mM) y $\text{pH} 5,0$, fueron comparados con los obtenidos previamente (Fig. 4.6). Además se realizaron ensayos independientes de solubilización de pectina a 37 °C, CitB (25 mM) y $\text{pH} 5,0$. En ambos casos se obtuvieron diferencias con el modelo menores de 8 %.

4.3.2.2.2. Experimentos con protopectina de naranja amarga

En la Tabla 4.2 se muestran los resultados para cada una de las combinaciones de los niveles de los factores arrojados por el diseño experimental, cuyo análisis estadístico se detalla en el Anexo 3.

Tabla 4.2 Solubilización de pectina a partir de protopectina de naranja amarga, aplicando el diseño experimental Doehlert. Concentración de protopectina = 20 mg/mL. Concentración de PPasa-SE = 1,7 U/mg de protopectina. Condiciones de reacción: 6 h, 150 rpm. CB: Concentración de CitB.

Ensayo	pH	CB (mM)	Temperatura (°C)	AGA (mg/L)
1	3,8	18,3	30	6.640
2	4,5	38,3	30	7.190
3	5,2	18,3	30	8.100
4	3,0	25,0	37	6.590
5	3,8	5,0	37	6.270
6	3,8	45,0	37	6.770
7	5,2	45,0	37	7.520
8	5,2	5,0	37	6.080
9	6,0	25,0	37	7.360
10	3,8	31,7	44	6.770
11	4,5	11,7	44	6.640
12	5,2	31,7	44	10.220
13	4,5	25,0	37	7.840
14	4,5	25,0	37	7.870
15	4,5	25,0	37	7.641

La Ec. 4.4 representa el modelo matemático obtenido ($R^2 = 0.758$) y la Fig. 4.8 muestra las superficies de respuesta para este material.

$$\begin{aligned} \text{AGA (mg/L)} = & 7783,0 + 346,1 \times T + 876,4 \times \text{pH} + 660,4 \times \text{CB} + 1024,1 \times T \times \text{pH} \\ & + 1292,9 \times T \times \text{CB} - 807,5 \times \text{pH}^2 + 539,3 \times \text{pH} \times \text{CB} - 1226,9 \times \text{CB}^2 \end{aligned} \quad \text{Ec. 4.4}$$

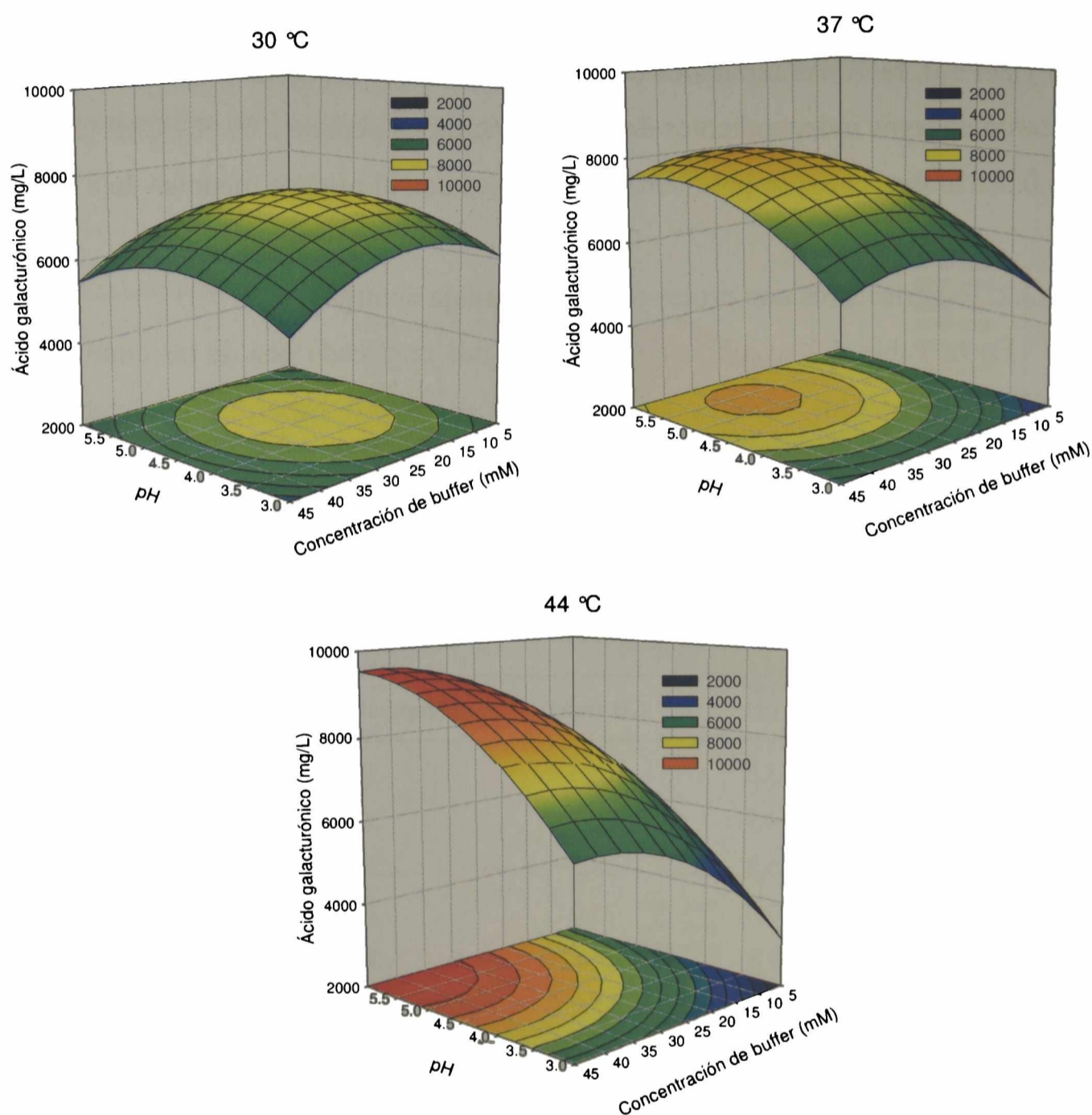


Figura 4.8. Superficie de respuesta usando protopectina de naranja amarga. Concentración de protopectina = 20 mg/mL. Concentración de PPasa-SE = 1,7 U/mg de protopectina. Condiciones de reacción: 6 h, 150 rpm.

Los resultados permiten establecer que la protopectina de naranja amarga se solubiliza más que la protopectina de limón. No obstante, ensayos control (sin presencia de PPasa-SE), a diferentes temperaturas, mostraron que a temperaturas de 37 °C y 44

°C, se alcanzan valores de solubilización de 300 ppm y 2.000 ppm respectivamente, a diferencia de los valores obtenidos con protopectina de limón. Lo cual es indicativo que la protopectina de naranja amarga es inestable a altas temperaturas, y por lo tanto, los altos niveles de solubilización de pectina, especialmente a 44 °C, no son causados sólo por la acción de la enzima. Por este motivo, el análisis estadístico para este material (Anexo 3) no puede ser considerado confiable.

Al igual que para protopectina limón, los niveles de solubilización obtenidos con éste modelo, a pH 5,0 y concentración de CitB = 10 mM, presentaron resultados semejantes a los reportados en la Fig. 4.6, para las mismas condiciones.

En el intervalo en que no se observa inestabilidad térmica de la protopectina (30 a 37 °C), la optimización del modelo mostró los mejores niveles de solubilización de pectina (8.100 mg/L de AGA) en condiciones de 37 °C, pH 5,3 y concentración de CitB = 30 mM. Estos niveles son muy cercanos a los obtenidos para protopectina de limón. Teniendo en cuenta la mejor correlación obtenida para protopectina de limón, en futuros ensayos se utilizarán los valores óptimos encontrados para protopectina de limón, a pH 5,0.

4.3.2.3. Cálculo de rendimientos de extracción de pectina a partir de tejidos de limón y de naranja amarga

La Tabla 4.3 muestra los resultados del proceso de solubilización de pectina, a partir de albedo y protopectina de limón y de naranja amarga.

Tabla 4.3. Extracción de materia insoluble en etanol (MIE), usando CitB (25 mM, pH: 5,0). Concentración de enzima: 30 U/mL. Condiciones de reacción: 6 h, 150 rpm y 37 °C. *Base seca de material procesado, **Base húmeda de material procesado.

Material procesado	Humedad (%)	Rendimiento (g MIE/100 g material)
Albedo de limón	80	28,0 * - 5,5 **
Albedo de naranja amarga	70	13,5 * - 4,1 **
Protopectina de limón	-	37,0 *
Protopectina de naranja amarga	-	28,0 *

Tanto para limón como para naranja amarga se observa un mayor rendimiento de pectina extraída al utilizarlos en forma de protopectina, lo que indicaría una mayor afinidad de la enzima por este tipo de sustrato. Sin embargo, esta diferencia podría también ser atribuida a la presencia de diferentes enzimas endógenas (poligalacturonasas y pectin-esterasas) en el albedo, las cuales podrían degradar la pectina obtenida durante el proceso, derivando en un menor rendimiento. El contenido de grupos urónicos (principalmente AGA) en la MIE fue de 60 y 65 %, para limón y naranja amarga, respectivamente. El grado de esterificación de las pectinas obtenidas fue de 78 y 75 %, para pectina de limón y naranja amarga, respectivamente, lo que indica que en ambos casos se trata de pectinas de alto metoxilo.

Mediante hidrólisis ácida, y empleando como modelo el albedo de naranja amarga, se obtuvo un rendimiento de 8,3 g pectina/100 g de albedo (base seca), correspondiente a 2,5 g pectina/100 g de albedo (base húmeda). Lo anterior indica un aumento del 63 % en la extracción de pectina con el método enzimático. Se ha descrito que los materiales vegetales contienen hasta un 30 % de material celulósico, el cual, junto con la pectina, es insoluble en etanol (Sinclair & Crandall 2008). Por ello, la medida de peso seco realizada en el ensayo enzimático incluye a ambos componentes a diferencia de la medida de peso seco realizada en el ensayo químico en el cual existe una hidrólisis total o parcial del material celulósico. Esta hidrólisis genera azúcares simples, solubles en etanol, razón por la cual esta fracción no es detectada en los resultados de peso seco.

Se han reportado contenidos de AGA en el albedo de limón de 35 g AGA/100 g albedo (base seca) (Sinclair & Crandall 2008), y de 5,25 g AGA/100 g albedo (base húmeda) (Schroder *et al.* 2004). Otros trabajos indican que el contenido de AGA en la protopectina de limón es de 34 g AGA/100 g de protopectina (base seca) (Contreras Esquivel 2003). Teniendo en cuenta éste último dato y que el 60 % del MIE es AGA (vease Tabla 4.3), se deduce una eficiencia real de 65 % en el proceso de extracción de pectina a partir de protopectina.

La Tabla 4.4 muestra diferentes reportes que presentan los rendimientos en extracción de pectina (medida como MIE). Sin embargo, otros autores han utilizado procedimientos colorimétricos para la determinación del material péctico (Meseguer *et al.* 1998; Canteri-Schemin *et al.* 2005).

Tabla 4.4. Rendimientos en la extracción de pectina.

Sustrato empleado	Método	Especificaciones	Rendimiento (g de pectina/100 g de material seco)	Referencia
Albedo de limón	Químico	-	20,2	(Contreras Esquivel 2003)
Albedo de limón	Enzimático	Poligalacturonasa de <i>A. kawachii</i>	27	(Contreras Esquivel 2003)
Albedo de limón	Enzimático	Poligalacturonasa de <i>A. niger</i>	17,6	(Contreras Esquivel 2003)
Protopectina de limón	Químico	-	22	(Sakamoto <i>et al.</i> 1995)
Protopectina de limón	Enzimático	PPasa – SE de <i>G. klebahnii</i> en AcB (100 mM)	26,5	(Sakamoto <i>et al.</i> 1995)
Albedo de limón	Enzimático	PPasa tipo B	10,9	(Sakamoto <i>et al.</i> 1994)
Albedo de limón	Microbiológico	<i>G. klebahnii</i>	2,9 (base húmeda de AL)	(Sakai & Okushima 1980)

Se observa que los rendimientos obtenidos en el presente estudio son mayores a los descritos por otros autores, lo cual confirma la bondad del proceso enzimático utilizado. De particular importancia es la confirmación del efecto que tiene el uso de CitB sobre la extracción de pectina (Sakamoto *et al.* 1995).

4.3.3. Estudio cinético de solubilización de pectina en el sistema protopectina-PPasa-SE

4.3.3.1. Efecto de la concentración de protopectina sobre la solubilización de pectina

La Fig. 4.9 muestra la variación en la concentración de pectina solubilizada en función del tiempo, a distintas concentraciones de sustrato, evidenciando un comportamiento de saturación, y linealidad durante los primeros 5 min de reacción.

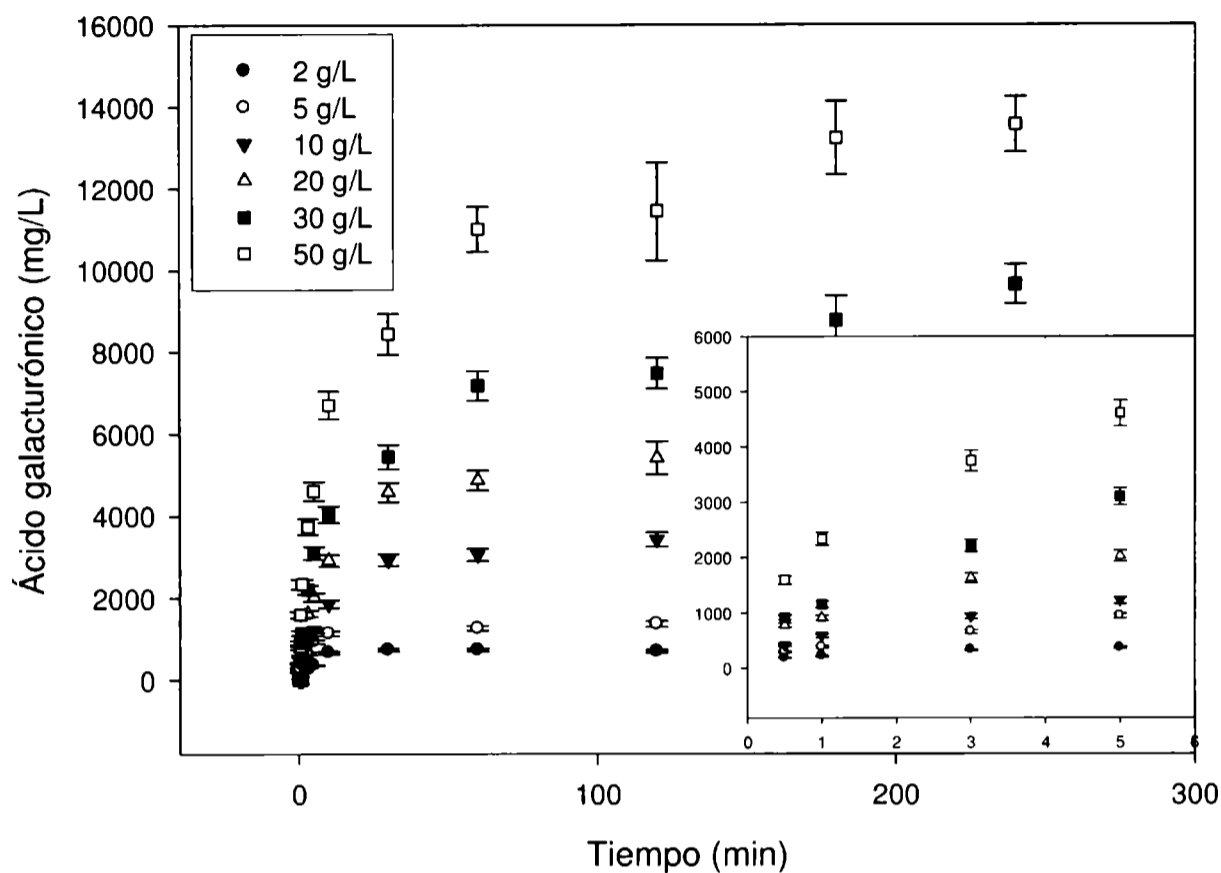


Figura 4.9. Efecto de la concentración de protopectina de limón (tamiz 35) sobre la solubilización de pectina. Concentración de PPasa-SE: 35 U/mL en CitB (25 mM, pH 5,0). Condiciones de reacción: 150 rpm y 37 °C.

Resultados similares fueron encontrados por diferentes autores para un sistema de hidrólisis de celulosa a partir de celulasas (Movagarnejad *et al.* 2000; Iman *et al.* 2003; Al-Zuhair 2007). Otros estudios proponen que la variación en la cristalinidad del sustrato es la causa de éste comportamiento (Zhang *et al.* 1999). Además, otros reportes también muestran que, como se mencionó previamente, la cristalinidad de la celulosa limita el proceso de hidrólisis debido a que la enzima puede degradar las zonas amorfas del material, pero es menos accesible a las zonas cristalinas (Sun Bok Lee & Dewey 1982). Este hecho fue mencionado previamente en la explicación de algunos de los comportamientos obtenidos en las isotermas de adsorción, descritas en el presente trabajo. También hay reportes que indican que la inestabilidad térmica de la celulasas era la razón para éste comportamiento (Carminal *et al.* 1985), esta hipótesis puede descartarse debido a que la PPasa-SE es estable a 37 °C (Cavalitto *et al.* 2000).

La Fig. 4.10 muestra el comportamiento de la actividad PGasa durante la cinética de extracción, para concentraciones de protopectina mayores de 20 g/L, ya que concentraciones menores no mostraron variación en la misma en la actividad.

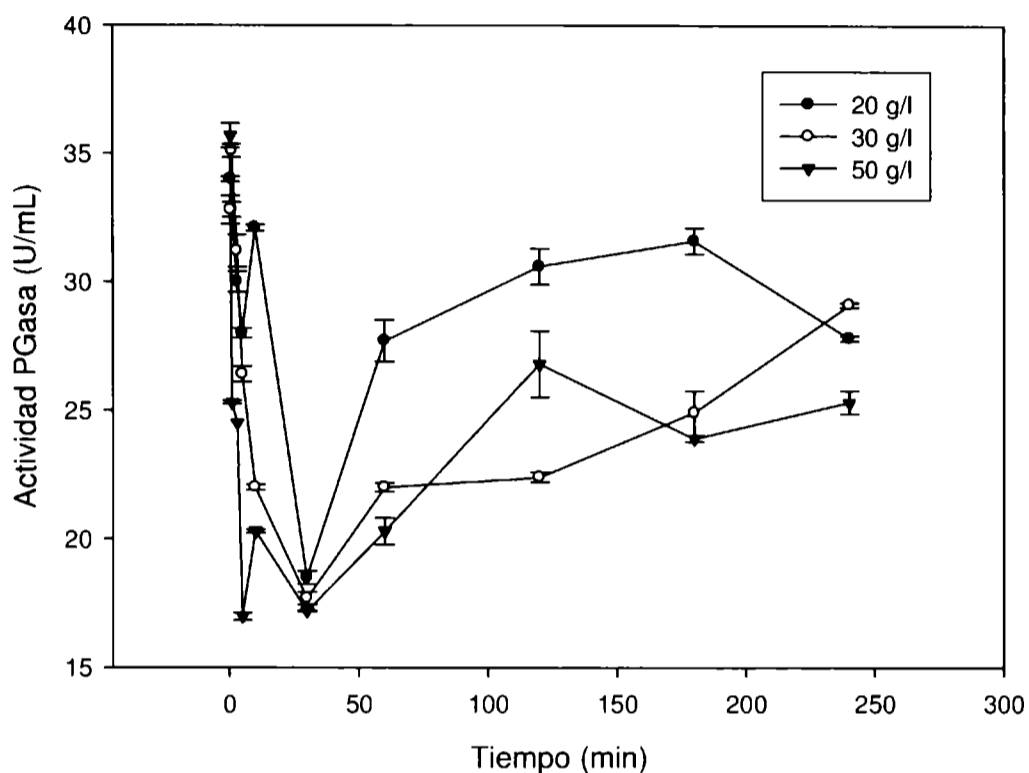


Figura 4.10. Efecto de la concentración de protopectina de limón (tamiz 35) sobre la actividad PGasa. Concentración de PPasa-SE inicial: 35 U/mL en CitB (25 mM, pH 5,0). Condiciones de reacción: 150 rpm y 37 °C.

Las medidas de actividad enzimática durante el estudio cinético mostraron que la adsorción de la enzima es directamente proporcional a la cantidad de protopectina presente en la mezcla de reacción. Además se observa una fuerte y casi instantánea adsorción, para luego llegar a un estado de equilibrio.

4.3.3.2. Modelo cinético de reacción: efecto de la concentración inicial de protopectina sobre la velocidad inicial de reacción

La Fig. 4.11 muestra el efecto de la concentración de protopectina sobre la velocidad inicial de reacción. Se reportan también ensayos realizados a 70 y 120 g/L para ampliar la tendencia de la gráfica. En estos casos el volumen del medio se aumentó a 0,38 mL/mg de protopectina debido a la alta hidratación de la protopectina. Este cambio de volumen no generó modificación en la velocidad inicial de reacción, lo cual fue comprobado con las muestras empleando una baja concentración de sustrato.

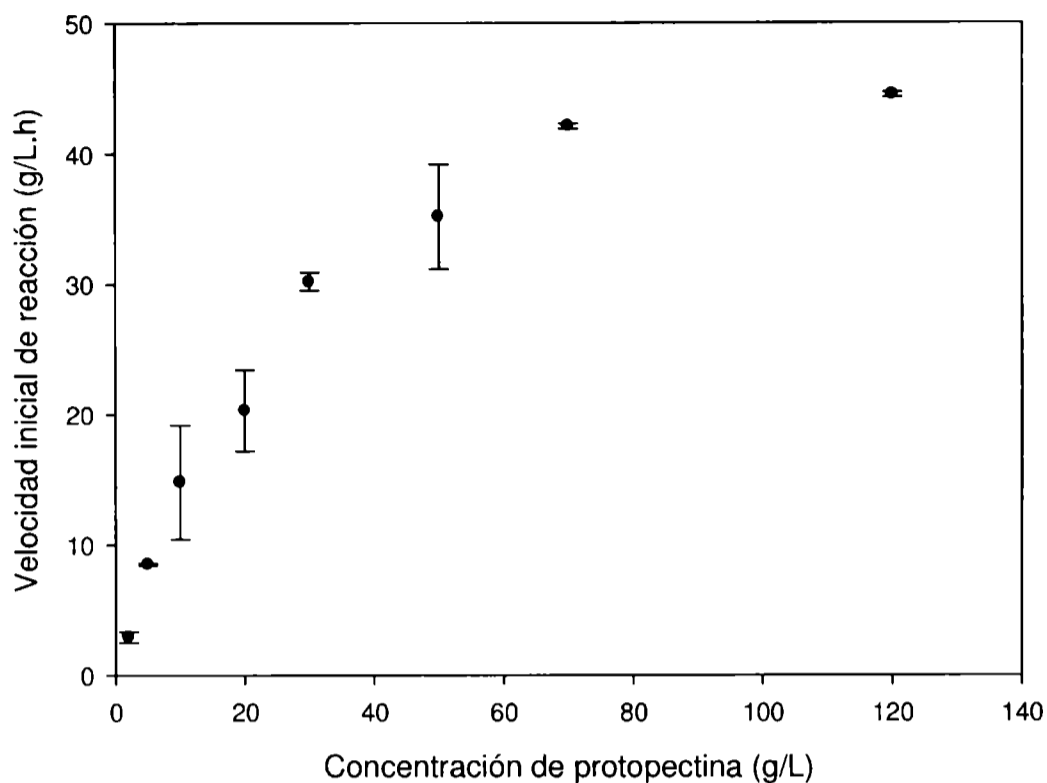


Figura 4.11. Efecto de la concentración de protopectina de limón (tamiz 35) sobre la velocidad inicial de reacción. Concentración de PPasa-SE: 35 U/mL en CitB (25 mM, pH 5,0). Condiciones de reacción: 150 rpm y 37 °C.

Se observó un comportamiento que responde adecuadamente al modelo de Michaelis-Menten, el cual se representa por la Ec. 4.5:

$$v_o = \frac{v_m S}{K_M + S} \quad \text{Ec. 4.5}$$

donde v_o es la velocidad inicial de reacción en g/L.h, v_m es la máxima velocidad inicial de reacción, S es la concentración de protopectina en g/L y K_M es la constante de Michaelis-Menten de velocidad de reacción en g/L.

Los parámetros del modelo fueron: $v_m = 57,3 \pm 5,6$ g/L.h y $K_M = 30,2 \pm 7,7$ g/L. Un análisis de varianza indica que el modelo explica adecuadamente los resultados en un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. El coeficiente de correlación R^2 fue de 0.99.

Este comportamiento fue publicado también por otros autores para sistemas de catálisis enzimática en fase heterogénea del tipo celulosa – celulasa (Sun Bok Lee & Dewey 1982; Gan *et al.* 2003; Al-Zuhair 2007). Otros reportes bibliográficos muestran que para una suspensión de celulosa de 50 g/L en CitB (50 mM, pH 4,8), se presenta

una velocidad inicial de reacción de 9,1 g/L.h y unos parámetros de Michaelis-Menten $v_m = 12,97$ g/L.h y $K_M = 22,82$ g/L (Sun Bok Lee & Dewey 1982). Aunque se trata de sistemas heterogéneos diferentes, existe similitud en el orden de magnitud de dichos reportes con los valores obtenidos en el presente trabajo.

4.3.3.3. Efecto de la concentración de PPasa-SE sobre la solubilización de pectina

La Fig. 4.12 muestra el efecto de la concentración de PPasa-SE sobre la solubilización de pectina. En ella se observa un comportamiento típico de saturación y la concentración de enzima no muestra ningún efecto sobre v_o , la cual fue de $24,8 \pm 2,2$ g/L.h.

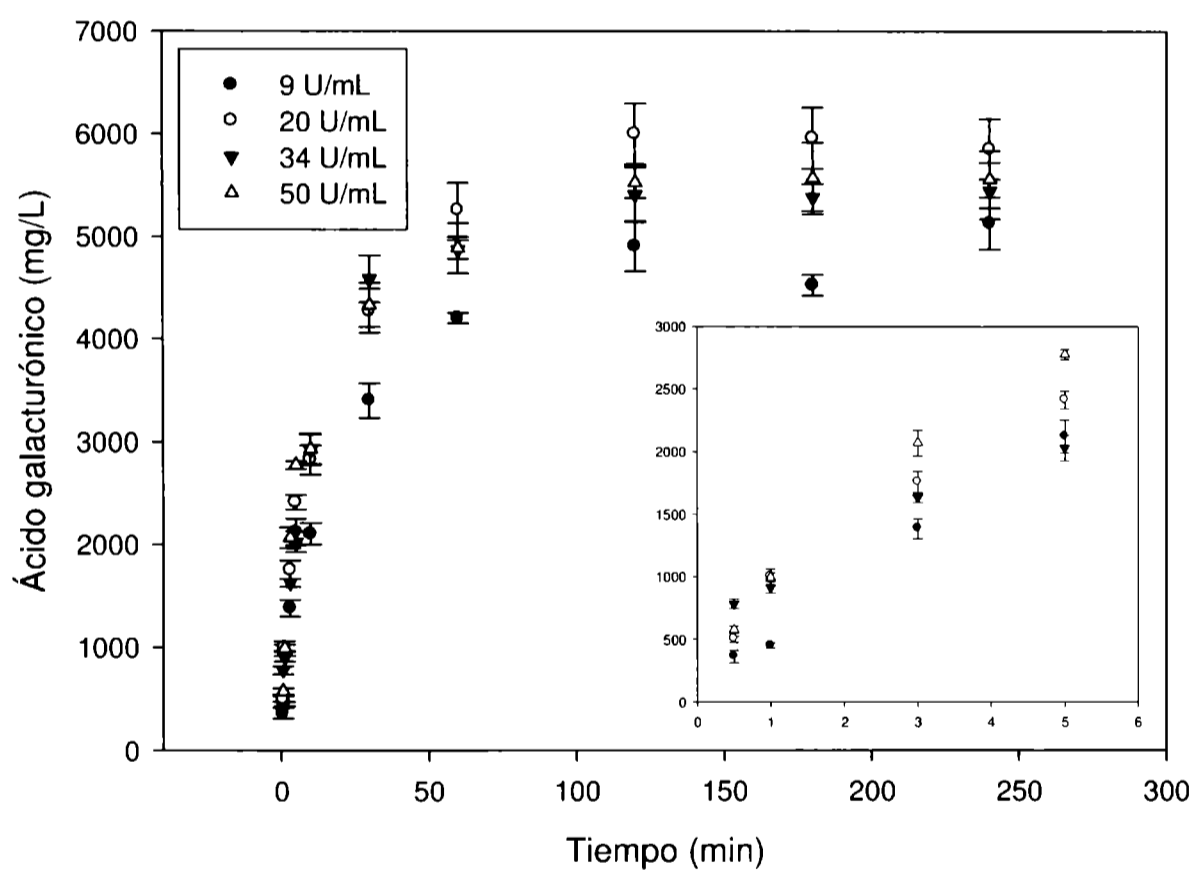


Figura 4.12. Efecto de la concentración de PPasa-SE sobre la solubilización de pectina a partir de protopectina de limón (20 g/L), tamiz 35. CitB (25 mM, pH 5,0). Condiciones de reacción: 150 rpm y 37 °C.

4.4. CONCLUSIONES

La composición del medio y el tamaño de partícula, influyen de manera importante sobre la adsorción de PPasa-SE a protopectina de limón, la cual, bajo ciertas condiciones se ajustó al modelo de Langmuir. Usando AcB se presenta mayor adsorción

de la enzima, lo cual es causado por la menor interacción que se presenta entre sus componentes y la enzima, en comparación con CitB y BCP 1/4. Por otro lado, las partículas de menor tamaño (mayor área superficial) promovieron una mayor adsorción.

El proceso de adsorción usando CitB y BCP 1/4 fue acompañado por un posterior proceso de desorción ocasionado por modificaciones estructurales de la partícula de protopectina (cambio de estructura amorfa a estructura cristalina), fruto de la reacción de solubilización de pectina, la cual, incluso trabajando a bajas temperaturas, no fue posible evitar completamente.

Estudios relacionados con la capacidad de solubilización de pectina a partir de protopectina, mostraron que empleando CitB se genera una mayor eficiencia en el proceso, lo cual se relaciona con la capacidad quelante del ácido cítrico a cationes divalentes, especialmente Ca^{2+} , lo cual genera mejor separación de las cadenas de homogalacturonano.

El pH, la concentración de CitB y la temperatura ejercieron un efecto significativo sobre el proceso de solubilización de pectina. Un diseño estadístico Doehlert permitió definir como niveles óptimos para el proceso: concentración de CitB = 25 mM, pH 5,0 y 37 °C, alcanzando niveles de solubilización de ~ 7.400 mg de AGA/L.

Los rendimientos en la extracción enzimática de pectina fueron mayores a los reportados por otros autores, usando el mismo material de partida. Además se obtuvieron pectinas de alto metoxilo, con un contenido de ácidos urónicos de 65 %.

El modelo de Michaelis–Menten explicó adecuadamente el comportamiento cinético del proceso de solubilización de pectina a partir de protopectina, usando la PPasa-SE, siendo los parámetros cinéticos de $v_m = 57,3 \pm 2,9$ g/L.h y $K_M = 30,2 \pm 4,0$ g/L. Además, la concentración de enzima no presentó un efecto importante sobre la velocidad inicial de reacción.

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Zuhair, S. (2007) The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, **99**, 4078-4085.
- Baciu, I. & Jördening, H. (2005) Kinetics of galacturonic acid release from sugar-beet pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, 505-512.

- Bateman, D. F. (1968) The enzymatic maceration of plant tissue. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **74**, 67-80.
- Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acid. *Analytical Biochemistry*, **54**, 484-489.
- Boussaid, A. & Saddler, J. (1999) Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 138-143.
- Canteri-Schemin, M. H., Ramos, H. C., Waszczynskyj, N. & Wosiacki, G. (2005) Extraction of pectin from apple pomace. Brazilian archives of biology and technology. *Brazilian archives of biology and technology*, **48**, 259-266.
- Carminal, G., Lapez Santin, J. & Sola, C. (1985) Kinetic modeling of the enzymatic hydrolysis of pretreated cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, **27**, 1282-1290.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Mignone, C. F. (1997) Quantification of pectin-releasing activity of protopectinase-SE from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnology Techniques*, **11**, 331-334.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Mignone, C. F. (1999) Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnology Techniques*, **13**, 385-390.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Mignone, C. F. (2000) Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **25**, 260-265.
- Chesson, A. (1980) Review. Maceration in relation to the post-harvest handling and processing of plant material. *Journal of Applied Bacteriology*, **48**, 1-45.
- Contreras Esquivel, J. C. (2003) *Purificación y caracterización de enzimas solubilizadoras de pectina de Aspergillus kawachii*. Universidad Nacional de la Plata.
- De Bruijn, J. & Biekman, E. (1998) Enzymatic maceration of potatoes: influence of reaction conditions. *Agro-Ciencia*, **14**, 245-250.
- Ferreira, O. A., Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Ertola, R. J. (2002) Influence of trace elements on enzyme production: Protopectinase expression by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 498-504.
- Gama, F. M., Teixeira, J. A. & Mota, M. (1994) Cellulose Morphology and Enzymatic Reactivity: A Modified Solute Exclusion Technique. *Biotechnology and Bioengineering*, **43**, 381-387.
- Gan, Q., Allen, S. J. & Taylor, G. (2003) kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulase: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*, **38**, 1003-1018.
- Iman, M., Ikari, K. & Suzuki, I. (2003) High-performance of cellulose using mixed cellulose species and ultrasonication pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, **17**, 79-83.
- Kim, D. H., Kim, D. G., Lee, D. Y., Kim, K. E. & Kim, C. W. (2000) Physicochemical characterization of pectin extracted from cheju mandarin (*Citrus unshiu*) peels with citric acid. *Food Science and Food Biotechnology*, **9**, 95-98.
- McLaren, D. & Packer, L. (1970) Some aspects of enzyme reactions in heterogeneous systems. *Advances in Enzymology* (ed F. F. Nord), pp. 245-308. John Wiley & Sons, Inc., New York.

- Meseguer, I., Aguilar, V., González, M. J. & Martínez, C. (1998) Extraction and colorimetric quantification of uronic acids of the pectic fraction in fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, **11**, 285-291.
- Movagarnejad, K., Sohrabi, M., Kaghazchi, T. & Vahabzadeh, F. (2000) A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid-liquid systems. *Biochemical Engineering Journal*, **4**, 197-206.
- Parida, S. K., Dash, S., Patel, S. & Mishra, B. K. (2006) Adsorption of organic molecules on silica surface. *Advances in Colloid and Interface Science*, **121**, 77-110.
- Sakai, T. (1988) Protopectinase from yeast and a yeast-like Fungi. *Methods in Enzymology* (eds W. Wood, A. & S. T. Kellogs), pp. 335-350. Academic Press, San Diego.
- Sakai, T. & Okushima, M. (1980) Microbial production of pectin from citrus peel. *Applied and Environmental Microbiology*, **39**, 908-912.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. & Vandamme, J. (1993) Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, **39**, 213-294.
- Sakamoto, M., Shirane, Y., Naribayashi, I., Kimura, K., Morishita, N., Sakamoto, T. & Sakai, T. (1994) Purification and characterization of a rhamnogalacturonase with protopectinase activity from *Trametes sanguinea*. *European Journal of Biochemistry*, **226**, 285-291.
- Sakamoto, T., Hours, R. A. & Sakai, T. (1995) Enzymatic pectin extraction from protopectins using microbial protopectinasas. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **58**, 353-358.
- Samejima, M., Irate, G. H. & Koida, Y. (1982) Studies on microcapsules. I. Role and effect of coactivation inducing agent in the microcapsule of ascorbic acid by phase separation method. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **30**, 2894-2899.
- Sato, S. (1968) Enzymatic maceration of plant tissue. *Physiologia Plantarum*, **21**, 1067-1075.
- Schroder, R., Christopher, J. C., Sharrock, K., Hallett, I. C. & MacRae, E. A. (2004) Pectins from the albedo of immature lemon fruitless have high water binding capacity. *Journal of Plant Physiology*, **161**, 371-379.
- Sinclair, W. B. & Crandall, P. R. (2008) Carbohydrate fractions of lemon peel. *Plant Physiology*, **601**, 681-705.
- Sun Bok Lee, H. S. S. & Dewey, D. Y. R. (1982) Adsorption of cellulose on cellulose: effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 2137-2153.
- Tanaka, M., Ikeseka, M. & Matsuno, R. (1988) Effect of pore size in substrate and diffusion of enzyme on hydrolysis of cellulosic materials with cellulases. *Biotechnology and Bioengineering*, **32**, 698-706.
- Van Buren, J. P. (1991) The Chemistry and Technology of Pectin. (ed R. H. Walter), pp. 1-22. Academic Press, San Diego.
- Walter, R. H. (1991) The chemistry and technology of pectin. Academic Press, San Diego.
- Wodd, P. J. & Siddiqui, I. R. (1971) Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Analytical Biochemistry*, **39**, 418-428.
- Zhang, S., Wolfgang, D. E. & Wilson, D. B. (1999) Substrate heterogeneity causes the nonlinear kinetics of insoluble cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **66**, 35-41.

CAPÍTULO 5

MACERACIÓN ENZIMÁTICA DE ALBEDO DE CITRICOS USANDO PROTOPECTINASA-SE de *Geotrichum klebahnii*. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PRODUCTOS

RESUMEN

Se estudiaron diferentes condiciones de operación en la maceración de albedo de limón (*Citrus limon*) y de naranja amarga (*Citrus aurantium*) con protopectinasa-SE (PPasa-SE) de *G. klebahnii*. Usando frascos con deflectores agitados en un sistema orbital de agitación a 150 rpm, a una potencia volumétrica (P/V_L) de 1 KW/m^3 , se obtuvieron altos rendimientos en tejido macerado (TM), conservando en gran proporción la integridad celular. Los mejores rendimientos en la fracción de TM se encontraron con una concentración de PPasa-SE = 50 U/mL en buffer ácido cítrico – citrato de Na (CitB). No se observaron diferencias importantes en relación al rendimiento en TM al usar tanto la enzima proveniente de un medio de cultivo crudo como la purificada por el procedimiento de adsorción a microfiltros. Se observó también que los sólidos disueltos de la fracción de sobrenadante (S) están compuestos en un ~ 70 % por glucosa, fructosa, sacarosa y ácido galacturónico (AGA). Por medio de un diseño experimental Doehlert se pudo establecer que el máximo rendimiento en TM (42,4 %) se obtiene a 30 °C, concentración de CitB = 25 mM y pH 5,0. Se determinó la actividad antioxidante y la concentración de algunos compuestos fitoquímicos en las fracciones de TM y S del proceso de maceración de naranja amarga. En ambos casos se encontraron mayores valores para la fracción de TM, lo cual comprueba la bondad del proceso enzimático para la conservación de compuestos fitoquímicos intracelulares, los cuales son benéficos para la salud.

5.1. INTRODUCCIÓN

La maceración enzimática, definida como la utilización de enzimas para la desintegración de tejidos vegetales con el objeto de producir pulpas de frutas y vegetales, depende fundamentalmente de dos acciones combinadas. La primera es el ataque de enzimas sobre la lámina media de los tejidos (o material cementante), la cual está compuesta principalmente de protopectina (sustancia péctica insoluble) y otros polisacáridos estructurales. La segunda es una adecuada agitación, la cual debe generar el suficiente esfuerzo de corte como para minimizar las fuerzas de atracción entre las células y así promover su separación, pero que a su vez no genere el rompimiento de ellas de tal forma que se deteriore la calidad del producto obtenido (Biekman 1992). Además de estos dos factores principales, durante un proceso de maceración se deben tener en cuenta otros factores operacionales como composición del medio, pH, temperatura y tiempo.

La Protopectinasa-SE (PPasa-SE) de *Geotrichum klebahnii* tiene la capacidad de hidrolizar restringidamente la protopectina presente en los tejidos, liberando pectina soluble con la consiguiente separación de las células sin producir mayores daños (Sakamoto *et al.* 1995; Nakamura *et al.* 1995). De este modo, se desea que dichas células conserven muchos de sus compuestos intracelulares, entre los cuales se cuentan; carotenoides, vitaminas (C, B6, B9 y E) y compuestos fenólicos (flavonoides, cinamatos y taninos) (Aranceta 2003). Todos estos compuestos poseen beneficios directos sobre la salud. Su uso posee actualmente sumo interés para las industrias de alimentos y cosmética. Entre los cuales se ha comprobado que muchos de ellos poseen una importante actividad antioxidante, evitando de esta manera, a partir de diferentes mecanismos, los fenómenos oxidativos causados por los radicales libres sobre los tejidos orgánicos. Estos fenómenos oxidativos pueden ocasionar rancidez en los alimentos y pérdidas en su almacenamiento, así como daños directos a la salud humana, promoviendo diferentes tipos de enfermedades crónicas, *i.e.* cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, etc., además de aceleración en los procesos normales de envejecimiento (Choksi *et al.* 2004). Estas razones han llevado a la necesidad de estudiar procedimientos para incorporar estos compuestos a la dieta, ya que los mismos suelen sufrir un fuerte deterioro durante el almacenamiento y procesamiento de los alimentos.

Algunas industrias utilizan la cáscara de los cítricos para la extracción de pectina, importante agente gelificante y fibra nutricional (Wang *et al.* 2007). No obstante, en la mayoría de los casos este material se sub-utiliza, o en el peor de los casos, se convierte en desecho. El presente trabajo posee como objetivo aumentar el aprovechamiento de las cáscaras de cítricos para la obtención de complementos alimenticios (Nutracéuticos), ricos en compuestos fitoquímicos con actividad antioxidante. Particularmente la naranja amarga (*Citrus aurantium*) es un cítrico con un alto contenido de flavonoides, principalmente naringina y neohesperidina, presentes principalmente en la cáscara y en el jugo (Peterson *et al.* 2006). Además, contiene altas concentraciones de otros compuestos fitoquímicos benéficos para la salud, entre los cuales se destacan el ácido ascórbico (vitamina C) y ácidos fenólicos. Todos ellos, como se mencionó previamente, presentan una remarcable actividad antioxidante.

En el presente capítulo se evaluó el efecto de las condiciones de agitación, la concentración de enzima y la composición del medio sobre el proceso de maceración albedo de limón (*Citrus limon*) y naranja amarga. Además, se utilizó un diseño estadístico para estudiar el efecto del pH, la concentración del buffer y la temperatura sobre el proceso de maceración. Finalmente se midió la actividad antioxidante de los productos obtenidos y se determinó la concentración de algunos compuestos fitoquímicos benéficos para la salud que pueden influir en la actividad antioxidante detectada.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Reactivos químicos

Los siguientes reactivos: 1,1-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]), 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio (ABTS), persulfato de potasio (K₂O₈S₂) y ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-carboxil (Trolox[®]), 2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) y reactivo de Folin-Ciocalteu,. Naringina, ácido poligalacturónico (PGA) y ácido galacturónico monohidrato (AGA) fueron adquiridos comercialmente a Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo); Aldrich (MI); o Merck (Dramstad). Todos los demás reactivos empleados fueron comercialmente disponibles y de grado analítico.

5.2.2. Fuentes de enzima

La enzima fue producida de acuerdo al protocolo detallado en el Capítulo 4. Una vez liofilizada, la misma se resuspendió en agua generando una solución concentrada (SC) que presentó una actividad PGasa de 3.500 U/mL (690 U/mg de proteína). La SC fue diluida al momento de su utilización con una solución buffer definida en cada experimento. A su vez, se utilizó una solución enzimática (800 U/mL) obtenida a partir de un procedimiento de recuperación por adsorción a microfiltros de fibra de vidrio, como fuera descrito en el Capítulo 3. Esta enzima fue diluida de forma conveniente con buffer ácido acético – acetato de Na (AcB) (20 mM, pH 5,0). Excepto se explicita, en todos los casos fue utilizada la enzima proveniente de SC.

5.2.3. Características de los frutos utilizados

Se seleccionaron frutos frescos de limón (*Citrus limon* Burm, cv. Lisbon) y de naranja amargo (*Citrus aurantium* L.). En algunos casos, se utilizaron dos grados diferentes de maduración, los cuales fueron medidos cualitativamente según el color del flavedo de la siguiente manera: alto grado de maduración (color naranja) y bajo grado de maduración (color amarillo-verde). Estos frutos fueron cuidadosamente lavados. La parte superficial coloreada de la cáscara (flavedo) se separó y fue descartada, para luego extraer el albedo por medios mecánicos.

5.2.4. Procedimiento de maceración

A 3,0 g de albedo cortado en cilindros (\emptyset : 4 mm, longitud: 5 mm) se agregaron 5 mL de solución buffer y se agitó en un sistema orbital o recíproco, según se indique, durante 1 h. La temperatura, velocidad de agitación y condiciones de buffer fueron definidas para cada experimento. Posteriormente se agregaron 5 mL de la misma solución buffer con una cantidad definida de PPasa-SE en cada experimento (expresada en unidades totales PGasa), y se continuó la agitación por 3 h. En la Fig. 5.1 se describe el tratamiento a los productos luego del proceso enzimático. El rendimiento de cada una de las tres fracciones obtenidas, a saber: tejido macerado (TM), sobrenadante (S) y tejido no macerado (TNM), se expresó como porcentaje en peso seco de la fracción, con respecto al peso seco del tejido original (% p/p).

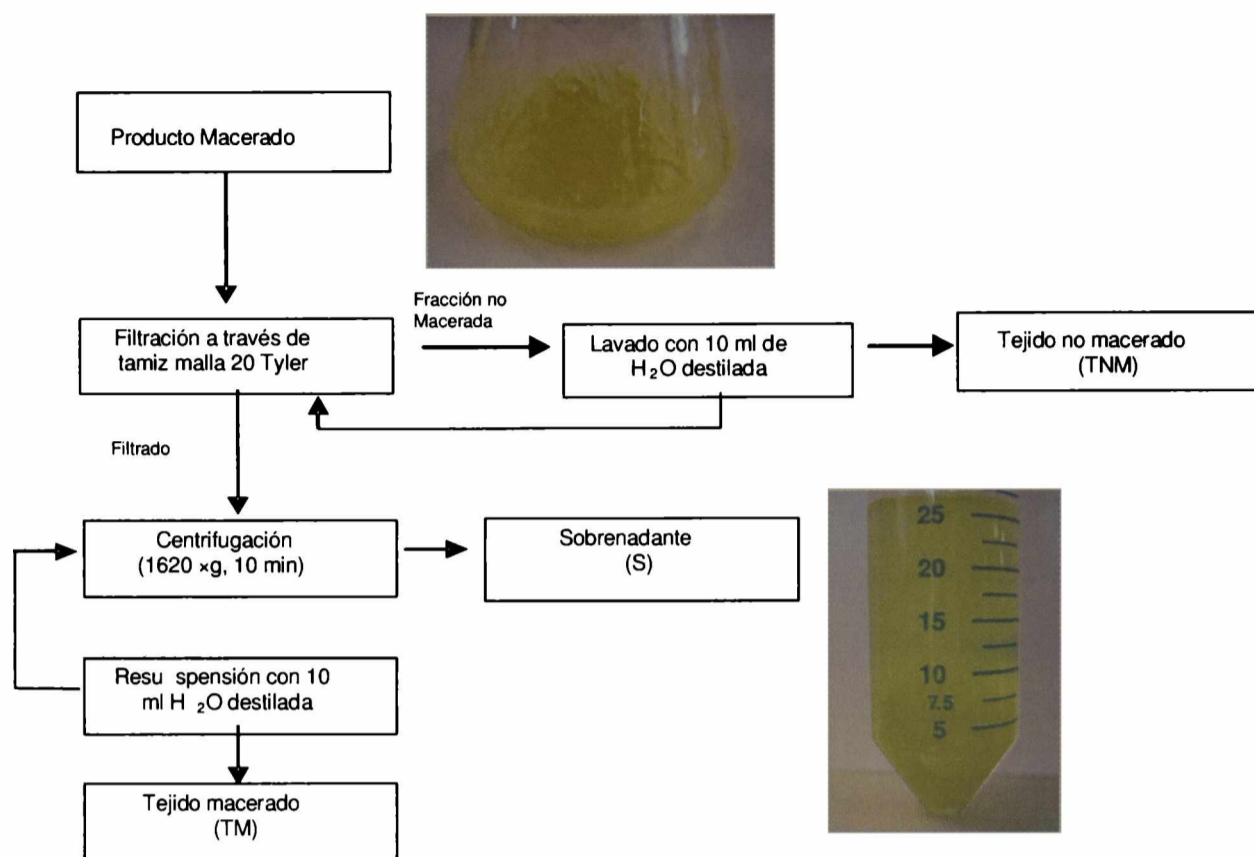


Figura 5.1. Esquema de tratamiento de los productos de la maceración enzimática.

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

5.2.5. Determinación de la actividad enzimática PGasa

Se utilizó el método reportado en el Capítulo 2.

5.2.6. Determinación de la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa

Para la determinación de mono y disacáridos se empleó HPLC (Agilent Serie 1100). Tanto las muestras como los solventes utilizados fueron filtrados previamente a través de membranas de celulosa (E02WP04700, 0,22 μm , Osmonics, EE.UU.). Dichos compuestos fueron detectados mediante Índice de Refracción (IR) (Waters 2414)

empleando una columna C18, 4,6 mm × 150 mm (Symmetry) con una bomba Binaria (Waters 2996) en modalidad isocrática. La fase móvil fue agua bidestilada a un flujo de 0,8 mL/min. La temperatura de columna fue de 80 °C y la del detector fue de 45 °C. Los solventes, luego de su filtración, fueron desgasificados agitando a presión reducida. El volumen de muestra fue 10 µL y el tiempo total de análisis fue de 12 min.

5.2.7. Determinación de ácidos urónicos

Se utilizó el método descrito en el Capítulo 4.

5.2.8. Evaluación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH[•]

Se utilizó el método de Brand-Williams (Brand-Williams *et al.* 1995), con algunas modificaciones propuestas por Rojano (Rojano *et al.* 2008). El método se basa en la reacción de 10 µL de muestra con 990 µL de solución de DPPH[•], durante 30 min, y posteriormente determinar la disminución de la absorbancia a 517 nm asociada a la reducción de la concentración de DPPH[•]. Los resultados se expresaron en unidades de IC₅₀ y actividad antioxidante en equivalentes de Trolox (TEAC).

5.2.9. Evaluación de la actividad antioxidante por el método del radical ABTS^{•+}

El método se basa en la reacción de 10 µL de muestra con 990 µL de solución del radical ABTS^{•+} (preparado por oxidación de ABTS con K₂O₈S₂) en buffer fosfato monobásico de Na - Fosfato dibásico de Na (100 mM, pH 7,4), durante 30 min, y posteriormente determinar la disminución de la absorbancia a 732 nm asociada a la reducción de la concentración de ABTS^{•+} (Re *et al.* 1999). Los resultados se expresaron en unidades de IC₅₀ (Sánchez-Moreno *et al.* 1998) y actividad antioxidante en equivalentes de Trolox (TEAC).

5.2.10. Evaluación de la capacidad reductora FRAP

Se utilizó el método de Benzie and Strain, el cual se basa en la reacción de 900 µL de una solución de TPTZ, 50 µL de muestra y 50 µL de agua destilada, durante 7

min, y posteriormente determinar la disminución de la absorbancia a 593 nm (Benzie & Strain 1996). Se construyó una curva patrón con ácido ascórbico. Los resultados se expresaron como actividad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico (AEAC) (mg de ác. ascórbico/g muestra).

5.2.11. Determinación de Fenoles Totales

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Dewanto *et al.* 2002). A 1 mL de extracto diluido se adicionó 125 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu y 625 μ L de agua destilada y se dejó por 6 min. Luego se adicionaron 1,25 mL de solución de Na₂CO₃ (7 % p/v) y 1,0 mL de agua, manteniendo 90 min a temperatura ambiente, para luego leer la A₇₆₀, usando agua destilada como blanco. Para la curva patrón se usó ácido gálico como estándar. Los resultados fueron expresados en mg de ác. gálico/g de extracto.

5.2.12. Determinación de Acidez Total

Se tomo 1,0 g de muestra y se llevó a un frasco de 100 mL, se adicionó 25 mL de agua destilada y se tituló con KOH (0,1 M) empleando como indicador fenolftaleína. La acidez se reportó como mg de KOH/g de extracto (Ziena 2000).

5.2.13. Determinación de Flavononas Totales

A 62,5 μ L de muestra se adicionó 62,5 μ L de NaOH (4 N). Posteriormente se agregó 3 mL de dietilenglicol (90 %, v/v) agitando vigorosamente. La lectura se hizo a 420 nm. La curva patrón fue construida usando naringina como estándar. Los resultados se expresaron como equivalentes de naringina (Davis 1947).

5.2.14. Determinación de Naringina

Se determinó mediante la técnica de HPLC (Agilent, Serie 1100). Las condiciones de cromatografía fueron: columna C18, fase móvil de 68 % de H₂O y 32 % de acetonitrilo, 1 mL/min flujo isocrático durante 4 min y luego un escalón a 100 % sin gradiente hasta 10 min. La longitud de onda del detector fue 280 nm (Chien *et al.* 2001).

5.2.15. Determinación de Vitamina C

Se determinó mediante el método 19884-43.064-068 de la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC).

5.2.16. Determinación de Azúcares reductores

Se determinó mediante el método Somogyi-Nelson (Somogyi 1952).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Efecto de las condiciones de agitación sobre el proceso de maceración

En la Fig. 5.2 se muestran el efecto de dos velocidades de agitación (100 y 200 golpes/min), en un sistema reciprocante, sobre la maceración de albedo de limón con PPasa-SE (500 U). El medio de reacción fue AcB (20 mM, pH 5,0).

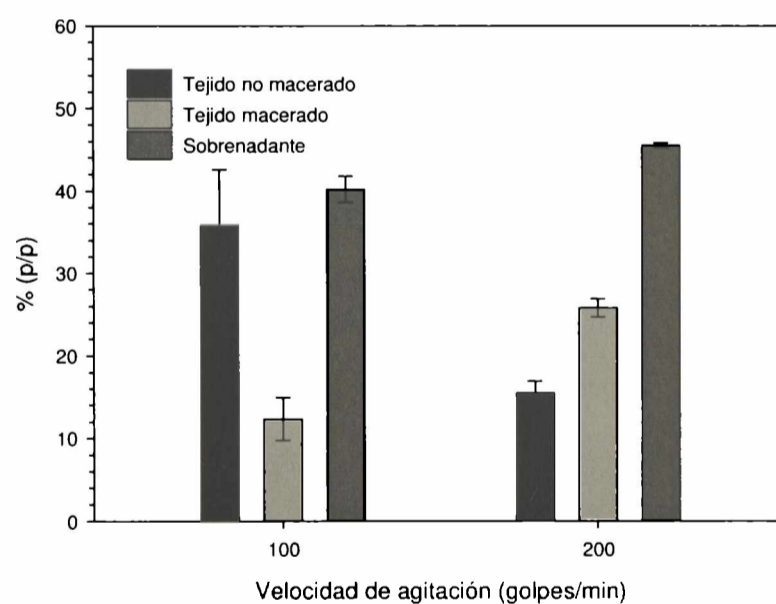


Figura 5.2. Efecto de la velocidad de agitación en sistema reciprocante sobre la maceración de albedo de limón usando PPasa-SE (500 U), en AcB (20 mM, pH 5,0). Condiciones de reacción: 37°C, 3 h.

Tradicionalmente en los estudios de los procesos de maceración se utilizan dos tipos sistemas de agitación: a) agitación orbital (AO) (Bateman 1968; Sato 1968; Ishii

1984; De Bruijn & Biekman 1998), y b) agitación recíprocante (AR) (Biekman 1992; Nakamura *et al.* 1995). Con el sistema de AR se obtienen mayores rendimientos de TM, por causa del mayor esfuerzo de corte que sufre el tejido, el cual influye sobre el proceso de maceración de tejidos vegetales. Si bien se presentan buenos resultados con el sistema de AR, éste no resulta ser adecuado en procesos a mayor escala, debido a las dificultades que se presentarían al tratar reproducir las condiciones usadas a pequeña escala.

Pensando en procesos a mayor escala, se estudió el sistema AO con frascos modificados internamente por incorporación de 3 deflectores laterales con el propósito de distorsionar el movimiento ordenado del sistema de AO. Este sistema genera turbulencias que causan mayores esfuerzos de corte, similares a los alcanzados en el sistema de AR (Büchs *et al.* 2000). La Fig. 5.3 muestra fotografías que permiten diferenciar el comportamiento reológico de los diferentes sistemas de agitación. Particularmente la Fig 5.3a muestra que al usar el sistema de AO (sin deflectores) se presenta un comportamiento ordenado, característico de reologías laminares. En cambio, en las Figs. 5.3b y 5.3c se observa que al usar el sistema de AR y el de AO (con deflectores) se presenta un comportamiento turbulento, con mayores esfuerzos de corte.

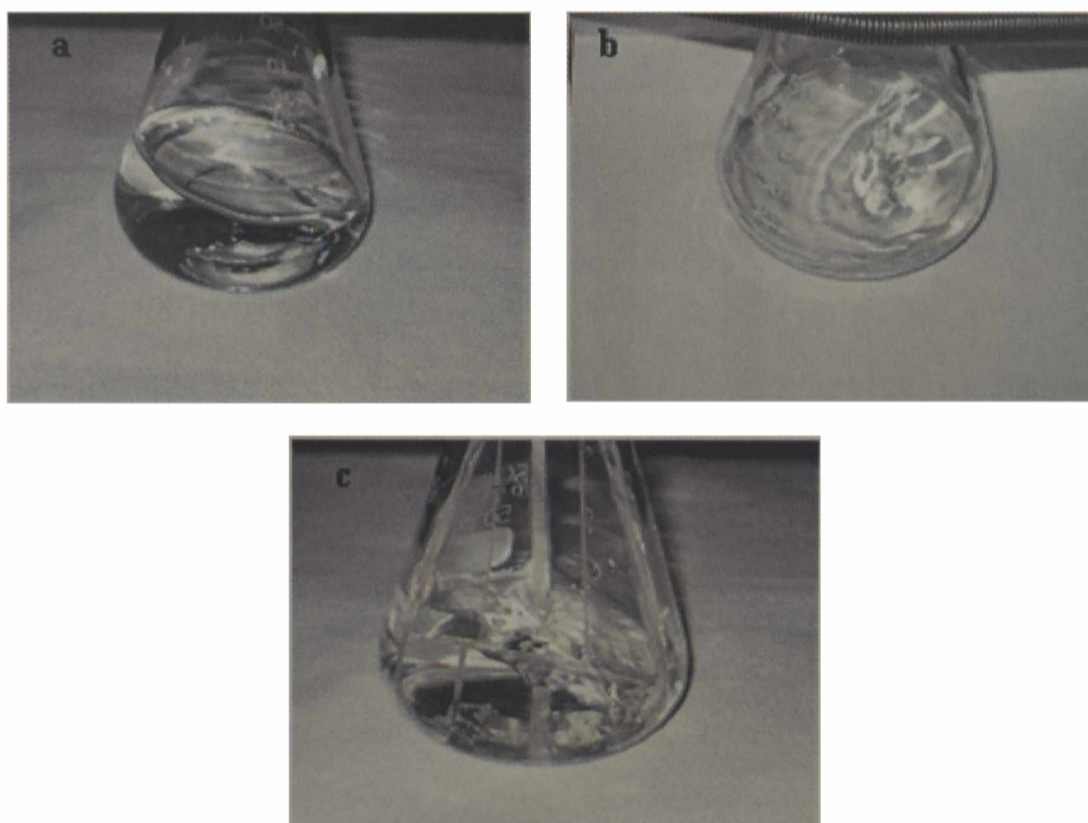


Figura 5.3. Comportamiento reológico en diferentes sistemas de agitación. (a) Agitación orbital (sin deflectores), (b) Agitación recíprocante (sin deflectores), (c) Agitación orbital (con deflectores).

Se realizaron ensayos de maceración de albedo de naranja amarga con diferentes sistemas de agitación (frascos de 250 mL, con 50 mL de solución) en buffer de ácido cítrico–citrato de Na (CitB) (10 mM, pH 5,0). Los resultados se muestran en la Fig. 5.4.

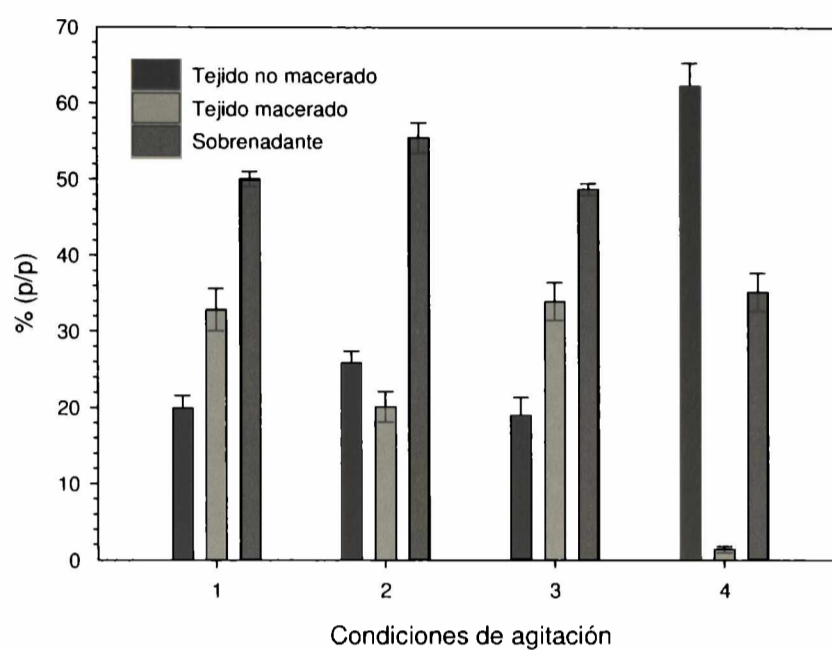


Figura 5.4. Efecto de las condiciones de agitación sobre la maceración de albedo de naranja amarga usando PPasa-SE (250 U), en CitB (10 mM, pH 5,0). Condiciones de reacción: 30 °C, 3 h. (1) agitación orbital (con deflectores), 150 rpm, (2) agitación orbital (sin deflectores), 150 rpm, (3) agitación recíprocante, 200 golpes/min, (4) agitación orbital (con deflectores), sin enzima, 150 rpm.

Se observa que al usar AO (con deflectores) a 150 rpm, y AR a 200 golpes/min se obtiene un rendimiento en TM similar (33 %). El rendimiento alcanzado con AO (sin deflectores), a 150 rpm, fue menor al obtenido con los otros sistemas, comprobando así el efecto del esfuerzo de corte sobre la maceración. Experimentos adicionales usando AO (con deflectores) a 200 rpm, generaron alta ruptura celular, afectando la calidad del producto obtenido. Estos resultados llevan a pensar que un bajo nivel de agitación impide la adecuada separación celular y, contrariamente, altos niveles de agitación mejoran la separación, pero con riesgo de alta ruptura celular. Se ha reportado que el esfuerzo de corte y la alta concentración de electrolitos en el medio causan ruptura celular ya que promueven estrés mecánico u osmótico (Sato 1968; Chesson 1980).

En la Fig. 5.5 se muestran fotografías (100×) de células maceradas de albedo de limón. Particularmente la Fig. 5.5A muestra células en buen estado, obtenidas con un sistema de AO (con deflectores) a 150 rpm. Resultados similares se obtuvieron mediante un sistema de AR a 200 golpes/min. La Fig. 5.5B muestra que en condiciones de AO (con deflectores) a 200 rpm, existe una alta ruptura celular.

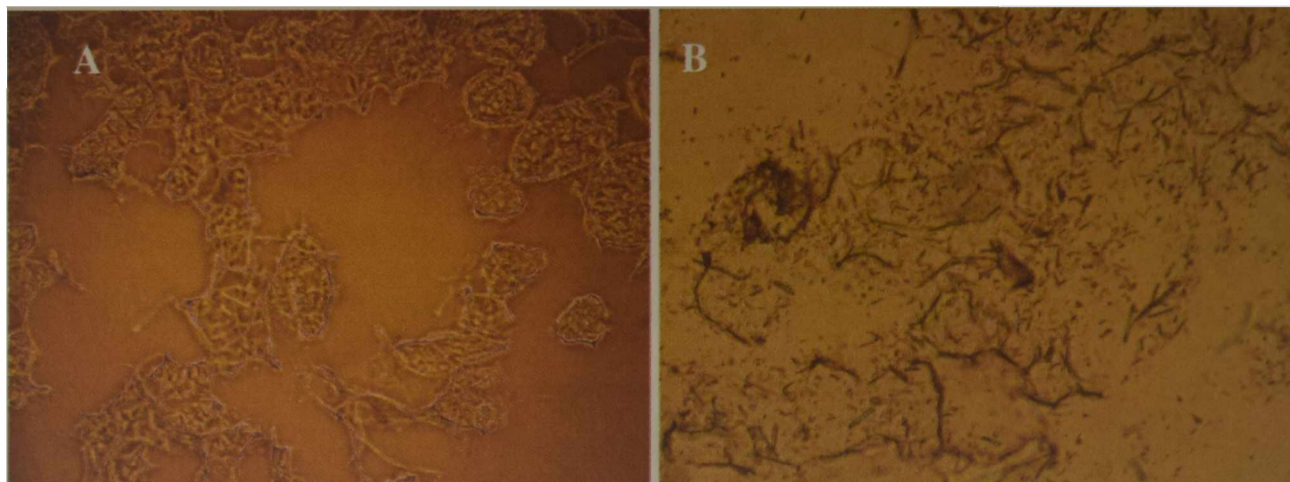


Figura 5.5. Fotografías de células maceradas de albedo de limón. (A) Agitación orbital con deflectores, 150 rpm (B) Agitación orbital con deflectores, 200 rpm. Observación al microscopio (100×).

La potencia volumétrica (P/V_L) en un sistema de agitación es un parámetro operativo importante para estimar la intensidad de los esfuerzos de corte generados en dichos sistemas, y a su vez es un criterio muy utilizado para el escalamiento de los procesos. Su determinación puede ser por métodos directos o a través de correlaciones matemáticas, las cuales normalmente utilizan números adimensionales, particularmente el denominado número de potencia modificado (Ne') y el número de Reynolds (Re), los cuales se describe en las Ecs. 5.1 y 5.2.

$$Ne' = \frac{P}{\rho n^3 d^4 V_L^{1/3}} \quad \text{Ec. 5.1}$$

$$Re = \frac{\rho n d^2}{\eta} \quad \text{Ec. 5.2}$$

donde P es la potencia ejercida sobre el sistema, n es la frecuencia de agitación, d es el diámetro del recipiente (normalmente es el máximo diámetro del recipiente), V_L es el volumen del líquido agitado, n es la velocidad de agitación y ρ y η son la densidad y la viscosidad del líquido agitado, respectivamente.

Con base en simplificaciones matemáticas se puede llegar a la Ec. 5.3, la cual relaciona Ne' con Re para sistemas de agitación orbital (Büchs *et al.* 2000).

$$Ne' = 1,94 Re^{0,2} \quad \text{Ec. 5.3}$$

De esta manera se obtiene la Ec. 5.4.

$$\frac{P}{V_L} = 1,94\rho \frac{n^3 d^4}{V_L^{2/3}} \text{Re}^{0,2} \quad \text{Ec. 5.4}$$

Mediante esta correlación se puede calcular el parámetro P/V_L en frascos agitados en función de diferentes condiciones de operación y geometrías del frasco. Además, con base en estudios y modificaciones realizados por Peter, se pueden usar también para frascos agitados con deflectores (Büchs *et al.* 2000; Peter *et al.* 2006).

Tomando como modelo frascos de 250 mL ($\varnothing = 8$ cm), con $V_L = 50$ mL, deflectores de longitud de base 2,5 cm y altura 9 cm, se calculó y compararon los valores de P/V_L en frascos con y sin deflectores, a diferentes velocidades de agitación (tomando como modelo de estudio agua), y de esta manera ver la influencia de dichas condiciones sobre el esfuerzo de corte que sufre el sistema de agitación orbital (AO). Los resultados se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Efecto de las condiciones de agitación sobre la Potencia volumétrica (P/V_L) del sistema.

Presencia de deflectores	Velocidad de agitación (rpm)	P/V_L (KW/m ³)
NO	150	0,1
NO	200	0,3
SI	150	1,0
SI	200	3,0

Se concluye que los mejores resultados se obtienen con $P/V_L = 1,0$ KW/m³, mientras que con $P/V_L < 1,0$ no se logra una adecuada separación de las células, y con $P/V_L > 1,0$ puede presentarse una ruptura excesiva de células. Un ensayo sin enzima usando AO (con deflectores) mostró un nivel de maceración despreciable. Estos resultados muestran la importante relación entre la acción enzimática y la agitación durante el proceso de maceración.

Si bien los resultados obtenidos con AO (con deflectores) y con AR muestran resultados similares en cuanto al rendimiento en TM y la calidad del producto, el

primero tiene ventajas en procesos a mayor escala, como se explico previamente. Sin embargo, ya que los siguientes experimentos del presente Capítulo fueron realizados a escala de laboratorio se decidió emplear el sistema de AR a 200 golpes/min.

5.3.2. Efecto de la cantidad de enzima sobre el proceso de maceración

La Fig. 5.6 muestra el efecto del uso de la PPasa-SE proveniente del medio crudo (SC) en comparación con la recuperada del medio por adsorción a microfiltros de fibra de vidrio (ver Capítulo 3) sobre el proceso de maceración. No se evidencian diferencias en los resultados, posiblemente por el alto nivel de dilución de la enzima que impide observar algún efecto de del medio sobre el proceso. Con base en este resultado se optó por utilizar en todos los futuros ensayos la enzima proveniente de SC.

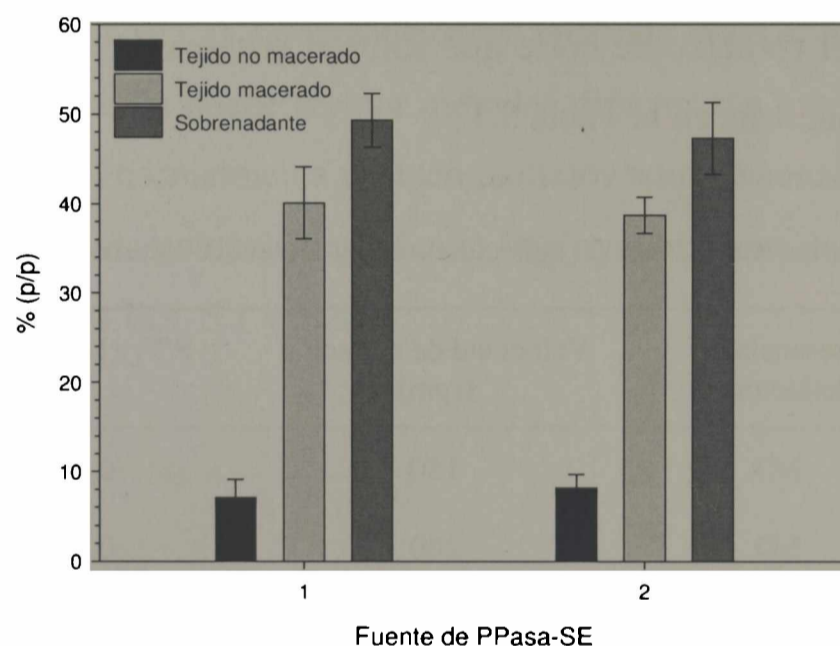


Figura 5.6. Efecto de la fuente de PPasa-SE (500 U) sobre la maceración de albedo de limón, en AcB (20 mM, pH 5,0). Condiciones de reacción: 200 golpes/min, 37°C, 3 h. (1) PPasa-SE de solución concentrada del sobrenadante del cultivo, (2) PPasa-SE purificada por adsorción a microfiltros de fibra de vidrio.

La Fig 5.7 muestra el efecto de la cantidad de enzima sobre la maceración de albedo de limón, usando AcB (20 mM, pH 5,0), observando que cuando la cantidad de PPasa-SE fue 250 U, se alcanza un rendimiento en TM mayor (~ 46 %). Cantidades superiores de enzima no generan un cambio significativo en el resultado. Para los ensayos posteriores se seguirá usando una cantidad de enzima de 250 U.

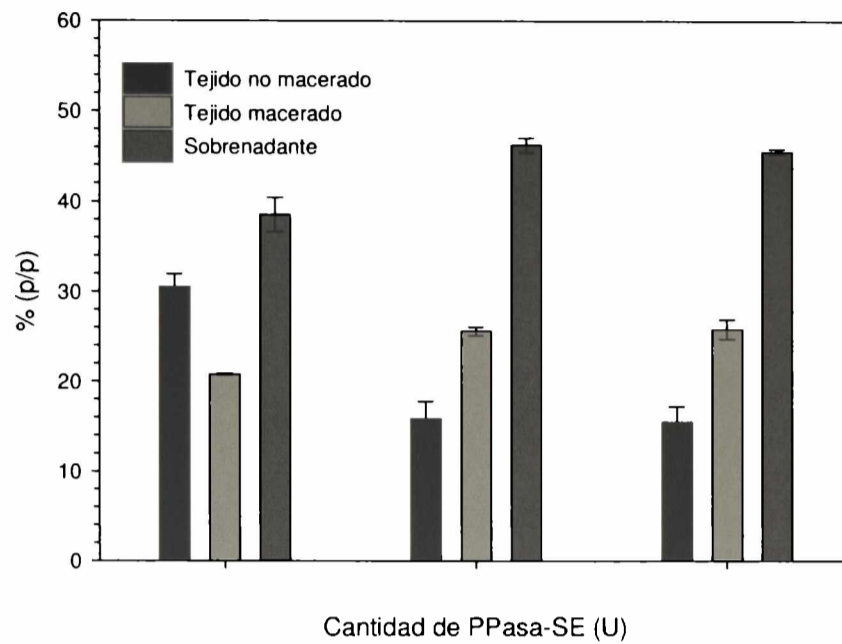


Figura 5.7. Efecto de la cantidad de PPasa-SE sobre la maceración de albedo de limón, usando AcB (20 mM, pH 5,0). Condiciones de reacción: 200 golpes/min, 37°C. 3 h.

5.3.3. Efecto de la composición del medio sobre el proceso de maceración

La Fig. 5.8 muestra el efecto de la composición de medio sobre la maceración de albedo de limón. Se utilizaron CitB (10 mM) y AcB (20 mM), ambos de pH 5.0.

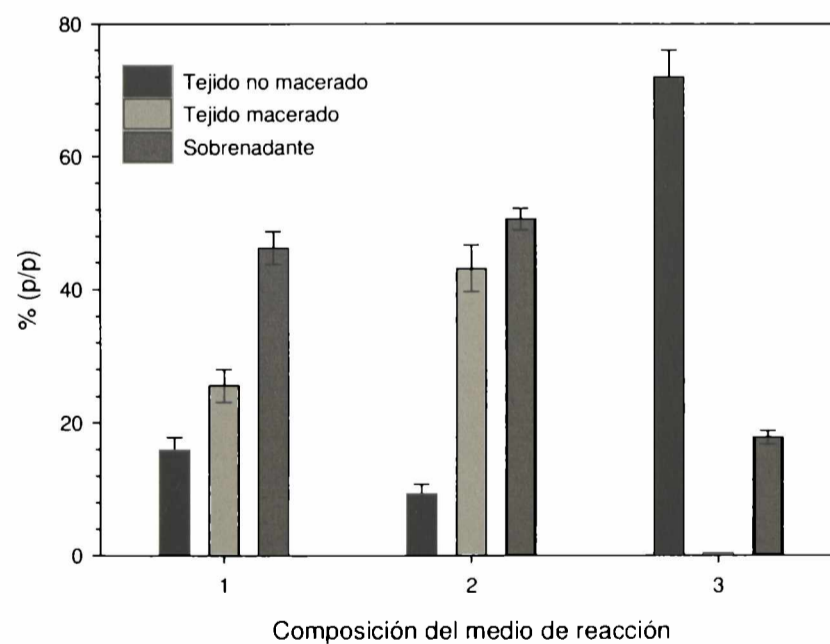


Figura 5.8. Efecto de la composición del medio sobre la maceración de albedo de limón usando PPasa-SE (250 U). Condiciones de reacción: pH: 5.0, 200 golpes/min, 37°C, 3 h. (1) buffer ácido acético-acetato de Na (20 mM), (2) buffer ácido cítrico-citrato de Na (10 mM), (3) ensayo control (sin enzima).

Con CitB (10 mM) se observan un mejor rendimiento del TM, en comparación con AcB (20 mM). Un ensayo sin enzima no mostró evidencia de maceración lo cual, como se mencionó en el Capítulo 3, puede atribuirse al efecto quelante del ácido cítrico sobre los iones Ca^{2+} , que favorece la solubilización de pectina y la separación de las células (Bateman 1968; Sato 1968; Fry 1986; De Bruijn & Biekman 1998).

Los reportes bibliográficos relacionados con el proceso de maceración muestran el uso de diferentes medios de reacción: a) maceración de diversos tejidos con PPasas fúngicas, usando AcB (20 mM, pH 5,0) o buffer ácido fosfórico-fosfato monobásico de Na (20 mM, pH 6,0) (Nakamura *et al.* 1995), b) maceración de tejidos de avena con pectin liasa, usando AcB (100 mM, pH 5,5) (Ishii 1984) y c) maceración de diferentes tubérculos (papa, batata y mandioca) con una protopectinasa bacteriana con actividad de pectin liasa, usando AcB (20 mM, pH 4,0) (Salvador *et al.* 2002). En estos trabajos la selección del medio respondió únicamente a la búsqueda de condiciones estables para la enzima, pero sin tomar en cuenta el potencial beneficio de un agente quelante sobre el proceso.

5.3.4. Efecto del tiempo de reacción sobre el proceso de maceración

La Fig. 5.9 muestra la variación en el rendimiento de TM con el tiempo de reacción, usando CitB (10 mM, pH 5,0), explicado por un modelo de saturación (Ec. 5.5), $R^2 = 0.963$. Después de 3 h no se observa un cambio importante en el resultado.

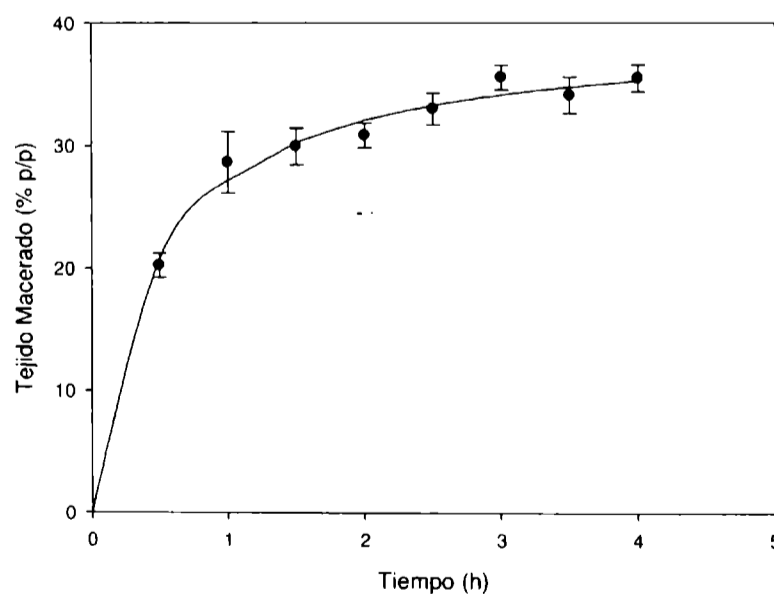


Figura 5.9. Efecto del tiempo de reacción sobre el proceso de maceración de albedo de limón usando PPasa-SE (250 U), en CitB (10 mM, pH 5,0). Condiciones de reacción: 200 golpes/min, 30 °C.

$$y = \frac{a x}{b + x} = \frac{39,2 x}{0,4 + x} \quad \text{Ec. 5.5}$$

Reportes bibliográficos indican que, bajo determinadas condiciones, a las 3 h se alcanza el máximo rendimiento en la maceración, seguido de un alto daño celular (Sato 1968). Por otro lado, a diferencia de lo observado en la Fig 5.9, otros reportes indican que, usando pectinasas comerciales y PPasa tipo B, se presenta una etapa inicial en la cual el proceso de maceración es muy lento (Bateman 1968; Nakamura *et al.* 1995).

La Fig. 5.10 muestra la variación en la cantidad de enzima presente en S, durante el proceso de maceración, la cual fue calculada por medio de la actividad PGasa medida en la fracción se S, y su volumen total (16,5 mL).

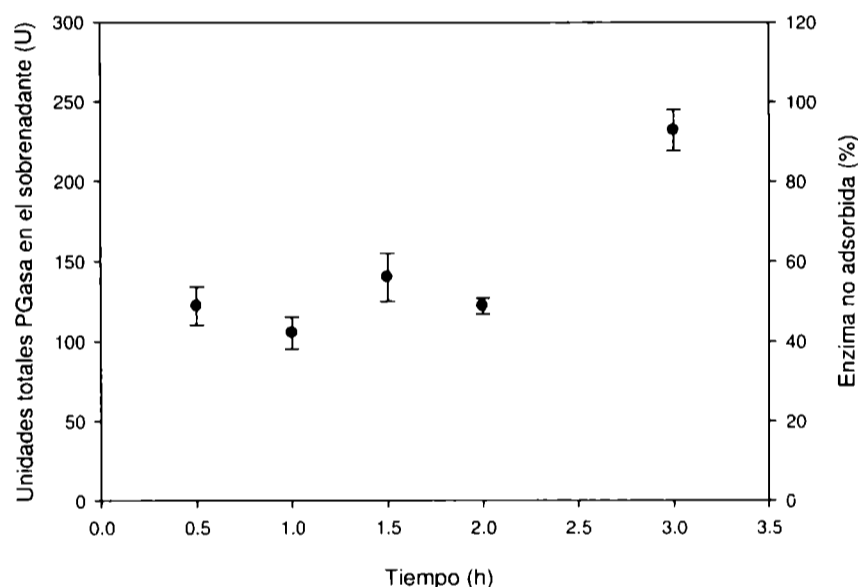


Figura 5.10. Unidades totales PGasa en el sobrenadante del proceso de maceración de albedo de limón usando PPasa-SE (250 U), en CitB (10 mM, pH 5,0). Condiciones de reacción: 200 golpes/min, 30 °C.

Se observa que la cantidad de enzima presente en S durante las primeras 2 h del proceso fue ~ 110 U, lo cual indica, teniendo en cuenta que la cantidad inicial adicionada al proceso fue 250 U, una adsorción de enzima de ~ 60 %, sobre el material sólido. Sin embargo luego de 3 h de maceración, se observa una cantidad de enzima en el medio de ~ 240 U, la cual es solo un poco menor a cantidad inicial de enzima agregada a la mezcla de reacción. Se observa por lo tanto que la terminación del proceso de maceración coincide con un fenómeno de desorción de la enzima del material sólido. Además, con base en los resultados mostrados en la Fig. 5.7 correspondientes al efecto de la cantidad de enzima en la maceración, se comprueba que la cantidad óptima de

enzima durante el proceso debe estar en el rango de 125 U a 250 U, corroborando de esta manera diferentes reportes bibliográficos que indican que en los procesos catálisis heterogénea sólo actúa la enzima adsorbida al material sólido (McLaren & Packer 1970; Cavalitto *et al.* 1999).

Los resultados permiten concluir que la enzima necesaria en el proceso de maceración de 3 g de albedo de limón, es de ~ 140 U (47 U/g albedo limón base húmeda). Teniendo en cuenta el rendimiento en extracción de protopectina de albedo de limón (350 mg/g albedo seco), y la humedad del albedo (80 %), la enzima adsorbida al albedo durante la maceración sería equivalente a ~ 0,7 U/mg protopectina, valor que está en mismo orden del reportado en el Capítulo 4 (0,8 a 1,7 U/mg de protopectina, con CitB). Lo anterior demuestra la alta especificidad de la PPasa-SE por la protopectina.

5.3.5. Composición de azúcares en la fracción S

La Fig. 5.11 muestra que la concentración de material péctico en S (medido como AGA) luego de 30 min, fue ~ 4.100 mg/L, con un máximo de ~ 6.100 mg/L después de 2 h. Las Figs. 5.12 y 5.13 muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC que permitieron calcular las concentraciones de glucosa (4,2 g/L), fructosa (3,2 g/L) y sacarosa (0,8 g/L). Se observa también la presencia de otros compuestos que no fueron identificados.

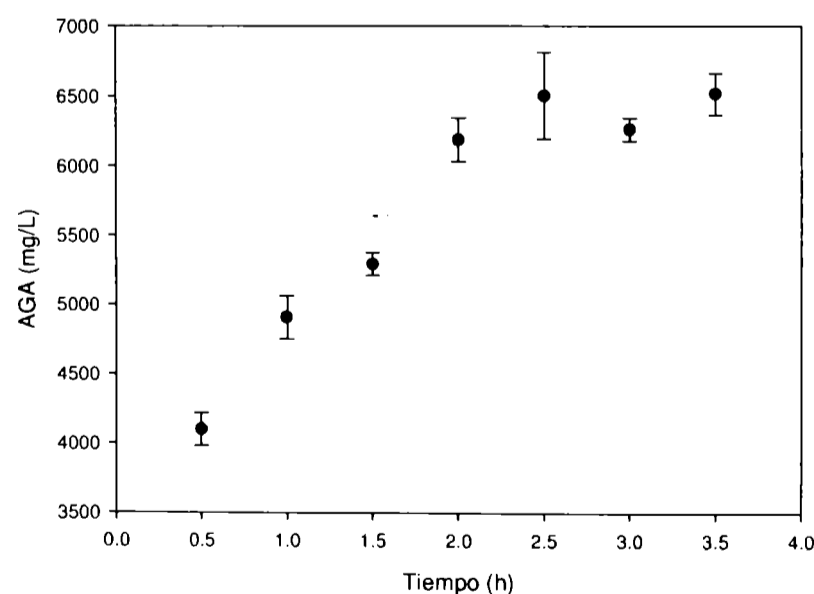


Figura 5.11. Material péctico (medido como ácido galacturónico) en la fracción de sobrenadante del proceso de maceración de albedo de limón usando PPasa-SE (250 U), con CitB (10 mM, pH 5,0). Condiciones de reacción: 200 golpes/min, 30 °C.

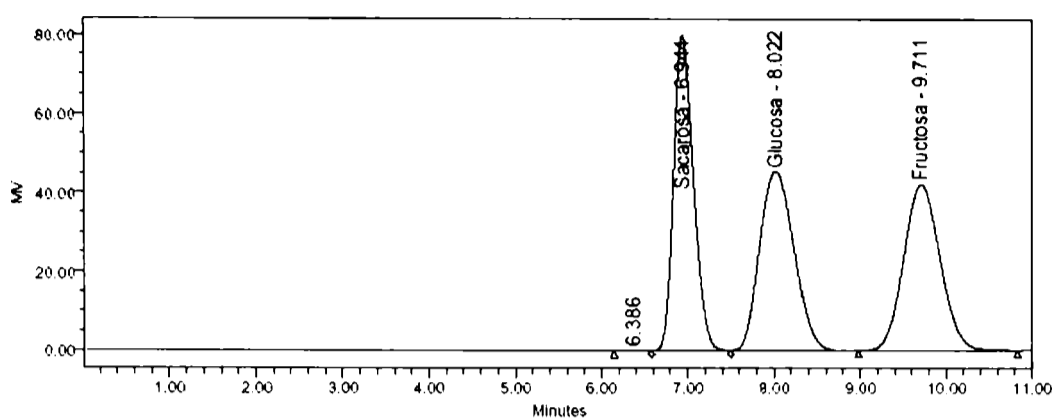


Figura 5.12. Cromatograma de HPLC de los estándares de sacarosa, glucosa y fructosa en la fracción S.

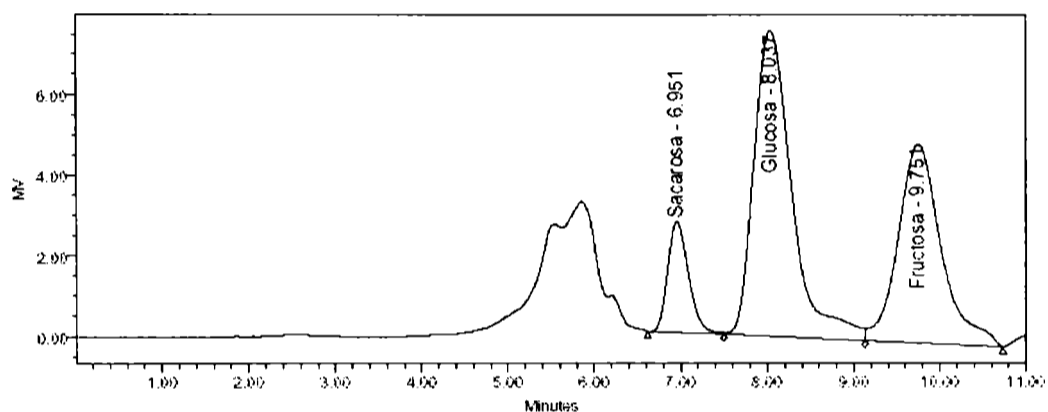


Figura 5.13. Cromatograma de HPLC de una muestra de S del proceso de maceración de albedo de limón usando PPasa-SE (250 U), con CitB (10 mM, pH 5,0). Condiciones de reacción: 200 golpes/min, 30 °C.

La cantidad total de estos azúcares en la fracción S fue: 0,069 g para glucosa, 0,053 g para fructosa, 0,013 g para sacarosa y 0,067 g para el material péctico. Ya que peso seco de la fracción S es de 0,29 g, se concluye que sólo el ~ 70 % (p/p) de S corresponde a estos azúcares. El porcentaje restante podría estar formado por material celulolítico, compuestos propios de la célula y otros azúcares no identificados.

5.3.6. Efecto del pH, concentración de CitB y temperatura sobre la maceración de albedo de limón

Se utilizó el diseño experimental Doehlert (Anexo 1) para la optimización de los niveles de los siguientes factores, cuyos rangos de operación fueron: pH (3,0 – 6,0), concentración de CitB (5,0 – 45,0 mM) y temperatura (30 – 44 °C). La Tabla 5.2 muestra los resultados obtenidos para cada ensayo.

Tabla 5.2. Efecto de pH, concentración de CitB y temperatura sobre la maceración de albedo de limón con PPasa-SE (250 U), usando el diseño experimental Doehlert. Condiciones de reacción: 200 golpes/min, 3 h. CB: Concentración de CitB.

Ensayo	pH	CB (mM)	T (°C)	% TM	% TNM	% S	Σ %	Vol. TM
1	3,8	18,3	30	39,7	10,5	54,1	104,3	4,7
2	4,5	38,3	30	41,6	8,3	61,3	111,2	4,0
3	5,2	18,3	30	43,1	9,2	53,2	105,6	5,2
4	3,0	25,0	37	38,2	6,2	62,2	106,6	4,0
5	3,8	5,0	37	35,2	9,8	52,2	97,2	4,2
6	3,8	45,0	37	36,1	7,7	66,1	109,9	3,8
7	5,2	45,0	37	34,1	8,1	70,1	112,3	3,9
8	5,2	5,0	37	36,9	10,1	52,5	99,5	4,4
9	6,0	25,0	37	34,3	9,2	61,5	105,1	3,6
10	3,8	31,7	44	37,1	7,5	65,3	109,9	4,3
11	4,5	11,7	44	38,0	8,0	57,7	103,7	4,5
12	5,2	31,7	44	35,5	7,5	68,0	111,0	4,3
13	4,5	25,0	37	37,8	6,1	63,6	107,4	4,1
14	4,5	25,0	37	38,0	6,6	63,6	108,1	4,1
15	4,5	25,0	37	38,4	7,3	60,4	106,0	4,2

El Anexo 4 muestra el análisis de varianza obtenido para el modelo ($R^2 = 0,929$), el cual es representados por la Ec. 5.6.

$$TM(\% p/p) = 38,05 - 2,81 \times T - 0,77 \times pH - 0,64 \times CB + 2,82T^2 - 2,34 \times T \times pH - 1,60 \times T \times CB - 1,84 \times pH^2 - 2,12 \times pH \times CB - 2,71 \times CB^2 \quad \text{Ec. 5.6}$$

A partir de este modelo se calculó el porcentaje de tejido macerado para cada nivel de temperatura evaluado: 30, 37 y 44 °C, y con estos valores se realizaron las superficies de respuesta que se muestran en la Fig. 5.14.

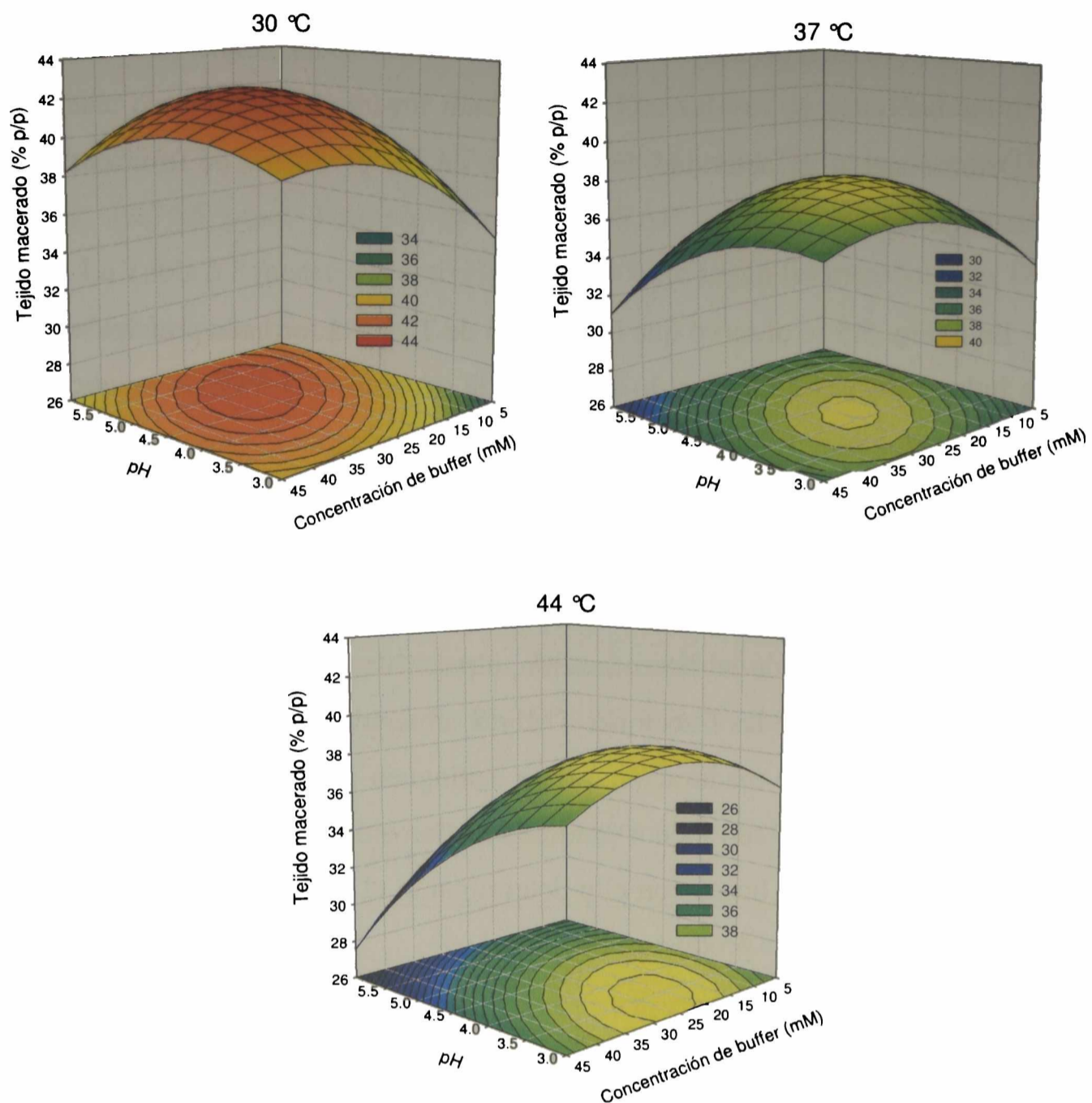


Figura 5.14. Superficies de respuesta del proceso de maceración de albedo de limón usando PPasa-SE (250 U), según diseño estadístico Doehlert. Condiciones de reacción: 200 golpes/min, 3 h.

Estas superficies muestran que a 30 °C se obtiene un mayor porcentaje de TM (42 %), lo cual indica que aunque se alcanzan mayores niveles de solubilización de pectina a mayores temperaturas (resultados mostrados en el Capítulo 3), es posible que se presente mayor daño celular, generando así una menor proporción de TM.

La optimización del modelo por medio del software MATLAB[®], mostró que a una temperatura de 30 °C, con CitB (25 mM, pH de 5,0) se obtiene el mayor % TM (42,4 %). No obstante, al igual que como se aclaró en el Capítulo 4 para la solubilización de pectina, si se pretende trabajar a mayor escala, es recomendable usar

valores de pH < 4,0, evitando así posibles contaminaciones, sin detrimento importante en el % de TM (40 %, a pH 3,2).

5.3.7. Determinación de actividad antioxidante en los productos de la maceración de naranja amarga

En la Fig. 5.5 se observó que la fracción de TM está formada principalmente por células independientes e intactas, lo cual sugiere que en dicha fracción se encuentra la mayor proporción compuestos fitoquímicos intracelulares, *i.e.* naringina y hesperidina, (principales flavonoides presentes en los cítricos), vitaminas, ácidos orgánicos (ácido cítrico, málico, quínico y ascórbico), y otros metabolitos secundarios (Abeysinghe *et al.* 2007), los cuales han sido reportados como antioxidantes naturales. En la Fig. 5.15 se presentan los resultados de la determinación, a partir de diferentes metodologías, de la actividad antioxidante de las fracciones TM y S, obtenidas del proceso de maceración. Se usaron dos estados de maduración que se distinguen a partir de ahora por medio de números: 1 para el tejido con menor grado de maduración y 2 para el tejido con mayor grado de maduración. Se busca con ello determinar si el grado de maduración afecta la calidad nutracéutica de los productos obtenidos.

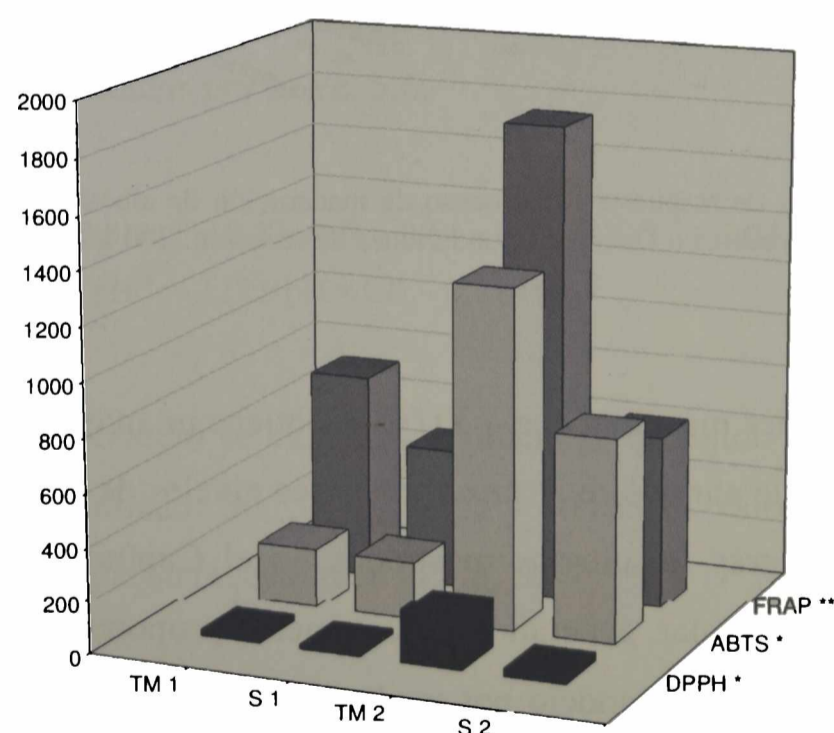


Figura 5.15. Medida de actividad antioxidante en los productos de la maceración de naranja amarga usando las metodologías FRAP, ABTS y DPPH. * Actividad antioxidante en equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol Trolox/g extracto}$). ** Actividad antioxidante ($\text{mg de ácido ascórbico/g extracto}$).

En la Fig. 5.15 se observa que para ambos estados de maduración la actividad antioxidante es mayor en la fracción TM. Además se presenta mayor actividad antioxidante en el estado de mayor maduración. Los valores de actividad antioxidante para la fracción TM (2) fueron: TEAC-DPPH = 198,4 $\mu\text{mol Trolox/g extracto}$, TEAC-ABTS = 1.276,5 $\mu\text{mol Trolox/g extracto}$ y FRAP = 1.779 mg ácido ascórbico/g extracto. La Tabla 5.3 muestra la actividad antioxidante según las metodologías DPPH y ABTS, en unidades de IC₅₀.

Como se mostró previamente, la fracción S está formada principalmente por los restos de compuestos que forman la lámina media del tejido (material péctico, glucosa, fructosa y sacarosa). Dicha fracción también mostró una actividad antioxidante importante, la cual podría estar relacionada con compuestos fitoquímicos propios del interior de la célula y que por el rompimiento de las mismas fueron liberados al medio. En la Tabla 5.3 se muestran los resultados de la actividad antioxidante en forma de IC₅₀ (concentración de la muestra capaz de inhibir el 50 % del radical evaluado).

Tabla 5.3. Medida de actividad antioxidante en los productos de la maceración de naranja amarga como IC₅₀, según las metodologías DPPH, ABTS.

MUESTRA	IC ₅₀ DPPH ($\mu\text{g extracto/mL}$)	IC ₅₀ ABTS ($\mu\text{g extracto/mL}$)
TM 1	165	50
S 1	215	51
TM 2	21	9
S 2	134	15

5.3.8. Concentración de compuestos fitoquímicos en los productos de la maceración de naranja amarga

La Fig. 5.16 muestra los resultados de las concentraciones de vitamina C, naringina y acidez total, con lo cual se busca explicar los posibles factores que pueden influir en la actividad antioxidante. Se ha reportado que estos compuestos influyen en la actividad antioxidante de los tejidos vegetales, actuando como agentes antioxidantes secundarios.

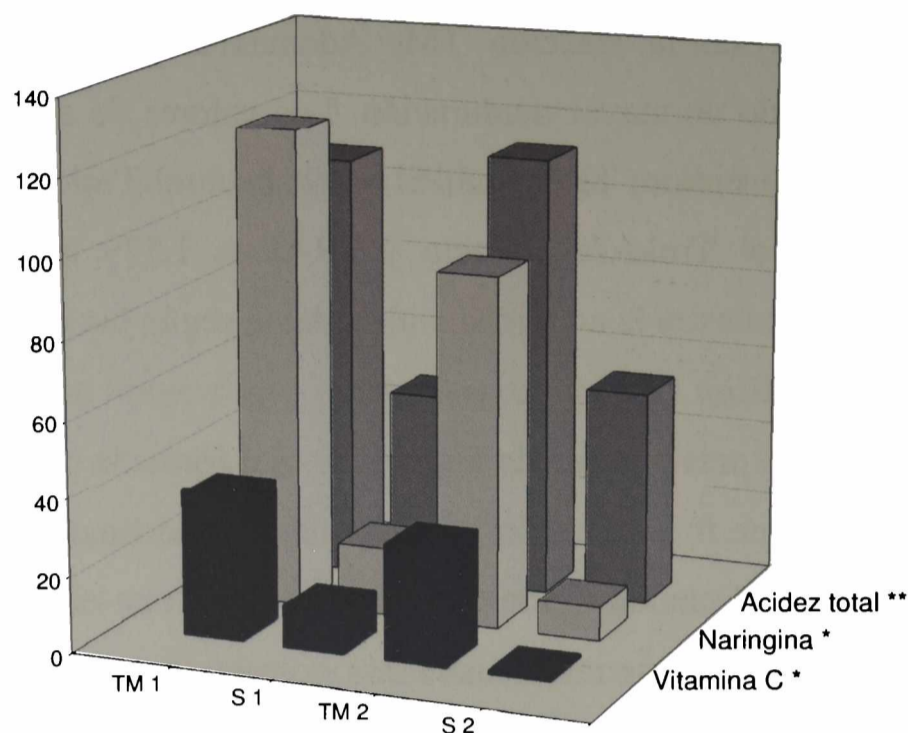


Figura 5.16. Medida de concentración de compuestos bioactivos en productos de maceración de naranja amarga. * mg /g de extracto, ** mg KOH/g de extracto.

La Fig. 5.16 muestra que, al igual que como se encontró en la medida de actividad antioxidante, la mayor concentración de vitamina C y de naringina y la mayor acidez total se obtiene en la fracción de TM. Lo anterior permite comprobar que por medio del proceso de maceración se pueden obtener células enteras, conservando en su interior los compuestos intracelulares que pueden ser benéficos para la salud. Además, no se presenta un cambio marcado en la concentración de estos compuestos con respecto al grado de maduración del tejido, a diferencia de lo que se observó con la medida de actividad antioxidante.

La concentración de vitamina C y de naringina y la acidez total pueden influir de alguna manera en la actividad antioxidante encontrada en la fracción TM. Sin embargo, no explica la razón de que dicha actividad antioxidante sea mayor en la fracción TM del fruto con mayor grado de maduración. Por esta razón se determinó la concentración de otros compuestos que, según diferentes autores, inciden de manera importante en la actividad antioxidante. Dichos compuestos fueron: fenoles totales, azúcares reductores y flavononas totales. También se determinó la concentración de AGA en todas las fracciones. Los resultados se observan en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Concentración de compuestos fitoquímicos en diferentes fracciones. TM: tejido macerado, S: sobrenadante. * mg /g extracto, ** mg KOH/g extracto.

Muestra	Fenoles totales (mg ácido galico/g extracto)	Azúcares reductores (mg/g extracto)	Flavononas totales (mg/ g extracto)	Ácido galacturónico (mg/ g extracto)
TM 1	234	27	136	142
S 1	322	113	113	290
TM 2	280	373	93	109
S 2	319	337	75	232

En la Tabla 5.4 se observa que la concentración de azúcares reductores es significativamente mayor para el fruto con mayor grado de maduración (2), lo cual fue reportado por otros autores (Albertini *et al.* 2006), siendo la diferencia entre TM y S importante sólo cuando se comparan en el tejido menos maduro. Por el contrario, la concentración de flavononas totales fue ligeramente mayor en el tejido menos maduro (1), lo cual también fue reportado por otros autores (Giannuzzo *et al.* 2000). La concentración de AGA, principal componente de la pectina, es mayor en la fracción S, para ambas condiciones de maduración. Sin embargo, su presencia en la fracción TM indica que las células aún tienen adheridas cantidades considerables de pectina, lo cual es debido a que la PPasa-SE presenta mayor capacidad de solubilización de pectina a 37 °C (Capítulo 4). La concentración de fenoles fue mayor en la fracción S, siendo el grado de maduración un factor que no mostró efecto importante sobre estos compuestos.

El aumento directamente proporcional entre la concentración de azúcares reductores y grado de maduración puede explicar la actividad antioxidante obtenida con el fruto más maduro, debido al efecto sinérgico de dichos azúcares reductores con otros compuestos, *i.e.* ácido ascórbico, naringina (en general las flavononas) y ácidos totales, los cuales influyen directamente con la actividad antioxidante (Stratil *et al.* 2007).

Reportes bibliográficos muestran que el principal aporte individual a la actividad antioxidante fue dado por la vitamina C y en menor cantidad por otros compuestos fenólicos (Xu *et al.* 2008). Otros reportes indican que la naringina no es un importante compuesto que promueva la actividad antioxidante (Rajadurai & Stanely Mainzen prince 2007) (Abeysinghe *et al.* 2007), y que el aumento en el grado de maduración

podría generar una mayor concentración de compuestos fenólicos libres, con importante actividad antioxidante (Soares 2002). Lo anterior puede explicar parcialmente el resultado de mayor actividad antioxidante en el tejido más maduro evidenciado en el presente trabajo.

5.4 CONCLUSIONES

Correlaciones empíricas mostraron que el sistema de agitación oscilante permite generar mayor potencia volumétrica que la agitación orbital. No obstante, la presencia de modificaciones geométricas dentro de los sistemas de reacción, como son los deflectores internos, generaron un aumento en la potencia volumétrica durante la agitación orbital, permitiendo de esta manera lograr esfuerzos de corte adecuados, y más fáciles de simular en procesos de mayor escala. Particularmente, se encontró que un sistema de agitación orbital a 150 rpm, usando frascos con deflectores, permitió obtener buenos resultados durante el proceso de maceración de albedo de cítricos, conservando en gran proporción células intactas e independientes. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por medio de los sistemas tradicionales de agitación a pequeña escala, como lo es la agitación recíprocante.

Una concentración de PPasa-SE de 50 U/mL, en CitB, permitió obtener buenos resultados en el proceso de maceración de albedo de limón.

Los resultados del proceso de maceración fueron similares al usar la enzima del medio crudo, y la enzima recuperada por medio de adsorción a microfiltros de fibra de vidrio.

El pH, la concentración de CitB y la temperatura mostraron efecto significativo en el proceso de maceración de albedo de limón, siendo las condiciones óptimas, según el diseño estadístico Doehlert, de pH 5,0, 25 mM y 30 °C, respectivamente. Bajo estas condiciones se alcanzó un rendimiento en el proceso, después de 3 h, de 42 % en la fracción de TM.

Los sólidos solubles de la fracción de sobrenadante (S) obtenida durante el proceso de maceración están compuestos en un ~ 70 % por glucosa, fructosa, sacarosa y sustancias pécticas.

La fracción de TM obtenida del proceso de maceración de albedo de naranja amarga mostró buena actividad antioxidante, medida mediante las técnicas DPPH, ABTS y FRAP. Esta actividad antioxidante fue considerablemente mayor que la presentada en la fracción de S. De igual manera la fracción de TM presentó alta concentración de compuestos como ácido ascórbico, naringina y otros ácidos orgánicos, que explican en gran medida la actividad antioxidante presentada. Además, con esto se demuestra que el TM contiene una alta proporción de células enteras, conservando en su interior los nutrientes propios del tejido. Lo anterior hace atractivo el proceso de maceración enzimática descrito para la obtención de ingredientes nutraceuticos con posible uso como suplementos alimenticios no solo a partir de subproductos de cítricos sino de otro tipo de frutos.

5.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeysinghe, D. C., Li, X., Sun, C., Zhang, W., Zhou, C. & Chen, K. (2007) Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, **104**, 1338-1344.
- Albertini, M. V., Carcouet, E., Pully, O., Gambotti, C., Luro, F. & Berti, L. (2006) Changes in Organic Acids and Sugars during Early Stages of Development of Acidic and Acidless Citrus Fruit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**, 8335-8339.
- Aranceta, J. (2003) Las frutas, verduras y hortalizas en la alimentación de los españoles. DETECOM, Madrid.
- Bateman, D. F. (1968) The enzymatic maceration of plant tissue. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **74**, 67-80.
- Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76.
- Biekman, E. S. A. (1992) Enzymatic maceration of potatoes for the production of instant dried mashed potato: modelling of the desintegration process. *Food Biotechnology*, **6**, 19-33.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, **28**, 25-30.
- Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C. & Zoels, B. (2000) Power consumption in shaking flasks on rotatory shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**, 589-593.
- Cavalitto, S. F., Hours, R. A. & Mignone, C. F. (1999) Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnology Techniques*, **13**, 385-390.

- Chesson, A. (1980) Review. Maceration in relation to the post-harvest handling and processing of plant material. *Journal of Applied Bacteriology*, **48**, 1-45.
- Chien, P. J., Sheu, F. & Shyu, Y. T. (2001) Monitoring enzymatic debittering in grapefruit juice by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, **9**, 115-120.
- Choksi, R. B., Boylston, W. H., Rabek, J. P., Widger, W. R. & Papaconstantinou, J. (2004) Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2**, 95-101.
- Davis, W. B. (1947) Determination of flavonones in citrus fruits. *Analytical Chemistry*, **19**, 476-478.
- De Bruijn, J. & Biekman, E. (1998) Enzymatic maceration of potatoes: influence of reaction conditions. *Agro-Ciencia*, **14**, 245-250.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K. & Liu, R. I. (2002) Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 3010-3014.
- Fry, S. C. (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **37**, 165-186.
- Giannuzzo, A. N., Nazareno, M. A., Mishima, H. T. & López de Mishima, B. A. (2000) Extracción de naringina de *Citrus paradisi* L. estudio comparativo y optimización de técnicas extractivas. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **20**, 257-261.
- Ishii, S. (1984) Cell wall cementing materials of grass leaves. *Plant Physiology*, **76**, 959-961.
- McLaren, D. & Packer, L. (1970) Some aspects of enzyme reactions in heterogeneous systems. *Advances in Enzymology* (ed F. F. Nord), pp. 245-308. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Nakamura, T., Hours, R. A. & Sakai, T. (1995) Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal of Food Science*, **60**, 468-472.
- Peter, C. P., Suzuki, Y., Rachinskiy, K., Lotter, S. & Buchs, J. (2006) Volumetric power consumption in baffled shake flasks. *Chemical Engineering Science*, **61**, 3771-3779.
- Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Beecher, J. R., Bhagwat, S. A., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B. & Holde, J. M. (2006) 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*, **19**, 866-873.
- Rajadurai, M. & Stanely Mainzen prince, P. (2007) Preventive effect of naringin on isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: an *in vivo* and *in vitro* study. *Toxicology*, **232**, 216-225.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231-1237.
- Rojano, B. A., Gavia Montoya, C. A., Sáez Vega, J., Schinella, G. & Tournier, H. (2008) Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *VITAE*, **15**, 169-177.
- Sakamoto, T., Hours, R. A. & Sakai, T. (1995) Enzymatic pectin extraction from protopectins using microbial protopectinasas. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **58**, 353-358.
- Salvador, L. D., Suganuma, T., Kitahara, K., Fukushige, Y. & Tanoue, H. (2002) Degradation of cell wall materials from sweetpotato, cassava, and potato by a bacterial protopectinase and terminal sugar analysis of the resulting solubilized products. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **93**, 64-71.

- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **76**, 270-276.
- Sato, S. (1968) Enzymatic maceration of plant tissue. *Physiologia Plantarum*, **21**, 1067-1075.
- Soares, S. E. (2002) Phenolic acids as antioxidants. *Review of Nutrition*, **15**, 71-81.
- Somogyi, M. (1952) Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 19-23.
- Stratil, P., Klejdus, B. & Kubán, V. (2007) Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, **71**, 1741-1751.
- Wang, Y. C., Chuang, Y. C. & Ku, Y. H. (2007) Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, **102**, 1163-1171.
- Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y. & Shi, J. (2008) Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, **106**, 545-551.
- Ziena, H. M. S. (2000) Quality attributes of Bearss Seedless lime (*Citrus latifolia* Tan) juice during storage. *Food Chemistry*, **71**, 167-172.

CONCLUSIONES GENERALES

Diferentes características hacen de la Protopectinasa-SE (PPasa-SE) una enzima con alto potencial de aplicación a nivel industrial. A continuación se describen algunas de estas características, la mayoría de ellas deducidas a partir de los resultados descritos en esta tesis:

a) En primera instancia, el hecho de ser la única enzima extracelular expresada por el hongo levaduriforme *G. klebahnii*, se convierte en una ventaja operativa y económica debido a la posibilidad de utilizarla tanto pura como directamente del sobrenadante del cultivo. Además, de ser necesario, la alta productividad que se puede obtener al usar sistemas de cultivo por lotes alimentados en biorreactores tipo tanque agitado, así como su capacidad de adsorción reversible a microfiltros de fibra de vidrio (MFV), facilitan considerablemente su purificación. De igual manera, la propiedad de adsorción a los MFV permite concentrar parcialmente la enzima.

b) La enzima se produce en un medio de cultivo sintético económico, formado por glucosa (como fuente de carbono y energía), urea (como fuente de nitrógeno), sales y micronutrientes. La simplicidad de dicho medio facilita y simplifica el proceso de purificación de la enzima.

c) La expresión de la enzima se favorece al trabajar en un medio ácido (pH entre 2,5 y 3,0), lo cual disminuye las posibilidades de que se presenten contaminaciones durante la fermentación de *G. klebahnii*. Esta característica es de especial importancia en procesos a mayor escala.

d) PPasa-SE mostró una alta eficiencia durante el proceso de extracción de pectina a partir de cáscaras de cítricos, mayor incluso que la obtenida a partir de los procedimientos de extracción tradicionales (químico o microbiológico). Además, esta eficiencia no se ve afectada de manera importante al trabajar en valores de pH entre 3,0 y 5,0. Esto posibilita la operación a niveles bajos de pH, disminuyendo el riesgo de

contaminaciones, factor a tener en cuenta considerando que la materia prima utilizada puede contener una diversa flora microbiana.

e) PPasa-SE también es altamente eficiente durante los procesos de maceración de tejidos vegetales, permitiendo obtener aglomerados de células con potencial aplicación en la industria alimenticia, particularmente en la elaboración de suplementos y/o ingredientes de alimentos.

f) Es posible obtener complementos alimenticios nutraceuticos, con alta concentración de compuestos benéficos para la salud, como la vitamina C y los flavonoides, los cuales muestran importante actividad antioxidante. De esta manera este proceso permite, usando tecnologías de bajo impacto ambiental, el aprovechamiento de residuos agrícolas, como las cáscaras de cítricos.

De igual manera, el trabajo realizado durante el desarrollo de la presente tesis representa un aporte científico-tecnológico al conocimiento, no solo en relación al área directa de estudio, sino también a otros campos de la Biotecnología, a saber: a) Análisis de sistemas de cultivo para la obtención de enzimas fúngicas, b) Purificación y concentración de enzimas por adsorción a materiales porosos, c) Caracterización de materiales porosos, d) Efectos de diferentes condiciones fisicoquímicas y estructurales sobre los procesos de catálisis enzimática en fase heterogénea, e) Análisis reológico de procesos de agitación, f) Aplicación e interpretación del diseño estadístico Doehlert con superficie de respuesta, y g) Estudio de la actividad antioxidante de productos de origen vegetal.

ANEXO 1.

Descripción del diseño estadístico Doehlert

El método de Doehlert es un diseño de superficie de respuesta que permite encontrar máximos o mínimos en la zona del ensayo (Doehlert 1970). Con este método se puede manejar un número apreciable de variables a la vez sin que el número de ensayos se haga operativamente inmanejable. El diseño se fundamenta en la construcción de unas celdas uniformes que definen los niveles de cada factor. La principal ventaja que tiene sobre otros diseños es que tiene la posibilidad de ampliar uniformemente, sobre cualquier dirección, el valor de los niveles, o incluso aumentar el número de factores analizados. Para la realización de este método los valores que se le asignan a las variables se distribuyen uniformemente alrededor de un valor central, generando un octaedro en el caso de manejar tres variables, o un hexágono al manejar solo dos. Para el caso del hexágono (Fig. 4.1), a fin de determinar el valor en todos los puntos de las variables x e y , y para asegurar estén equidistantes, se toma como imagen generatriz al triángulo equilátero ABC de lado unitario y se determina la posición de cada punto, partiendo arbitrariamente del punto A ($x = 0,000$, $y = 0,000$).

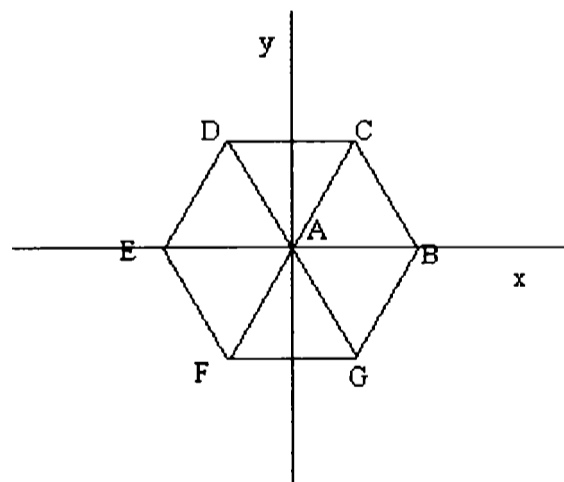


Figura 1. Representación esquemática del hexágono en el diseño Doehlert.

Mediante un análisis geométrico basado en las propiedades del triángulo equilátero, se determinan las coordenadas de los puntos B y C, arrojando los siguientes

valores: A (0,000, 0,000), B (1,000, 0,000) y C (0,500, 0,866). El resto de los extremos del hexágono se ubican en los siguientes puntos: D (-0,500, 0,866), E (-1,000, 0,000), F (-0,500, -0,866) y G (0,500, -0,866). Al utilizar tres variables, la figura generatriz es un tetraedro de arista unitaria cuyos vértices se encuentran en (0,000, 0,000, 0,000), (1,000, 0,000, 0,000), (0,500, 0,866, 0,000) y (0,500, 0,289, 0,816), generando las coordenadas de 4 puntos codificados. El resto de puntos surge de la resta de estos puntos entre si, arrojando un total de 13 puntos equivalentes a 15 ensayos, teniendo en cuenta que el punto central se hace por triplicado para determinar la varianza del experimento.

La Tabla 4.1 muestra los valores codificados de las variables y a partir de ellos se calculan los valores reales de los factores, para lo cual se requiere definir los valores centrales y los Δ_{codif} y Δ_{real} , para cada uno de los factores a analizar.

Tabla 1. Valores codificados de cada variable según el diseño experimental Doehlert.

Ensayo	<i>x</i> Codificado	<i>y</i> Codificado	<i>z</i> Codificado
1	-0,500	-0,289	-0,816
2	0,000	0,577	-0,816
3	0,500	-0,289	-0,816
4	-1,000	0,000	0,000
5	-0,500	-0,866	0,000
6	-0,500	0,866	0,000
7	0,500	0,866	0,000
8	0,500	-0,866	0,000
9	1,000	0,000	0,000
10	-0,500	0,289	0,816
11	0,000	-0,577	0,816
12	0,500	0,289	0,816
13	0,000	0,000	0,000
14	0,000	0,000	0,000
15	0,000	0,000	0,000

Teniendo en cuenta los intervalos de los factores pH, concentración de buffer y temperatura, se deduce un punto central (4,5, 25 mM, 37 °C) que corresponde al punto codificado (0,000, 0,000, 0,000). Los valores de $\Delta x_{real} = 3,0$, $\Delta y_{real} = 40,0$ y $\Delta z_{real} = 14$,

corresponden a $\Delta x_{\text{codif}} = 2,0$, $\Delta y_{\text{codif}} = 1,732$, $\Delta z_{\text{codif}} = 1,632$. Con estos valores y la Ec. 4.1 se pueden determinar los valores reales correspondientes a cada valor codificado (Tabla 4.2).

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

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

Tabla 2. Valores reales de las variables según el diseño experimental Doehlert.

Ensayo	pH	Concentración de buffer (mM)	Temperatura (°C)
1	3,8	18,3	30
2	4,5	38,3	30
3	5,3	18,3	30
4	3,0	25,0	37
5	3,8	5,0	37
6	3,8	45,0	37
7	5,3	45,0	37
8	5,3	5,0	37
9	6,0	25,0	37
10	3,8	31,7	44
11	4,5	11,7	44
12	5,3	31,7	44
13	4,5	25,0	37
14	4,5	25,0	37
15	4,5	25,0	37

ANEXO 2

Medidas de pectina solubilizada (como ácidos urónicos) durante las isotermas de adsorción de PPasa-SE a protopectina de limón

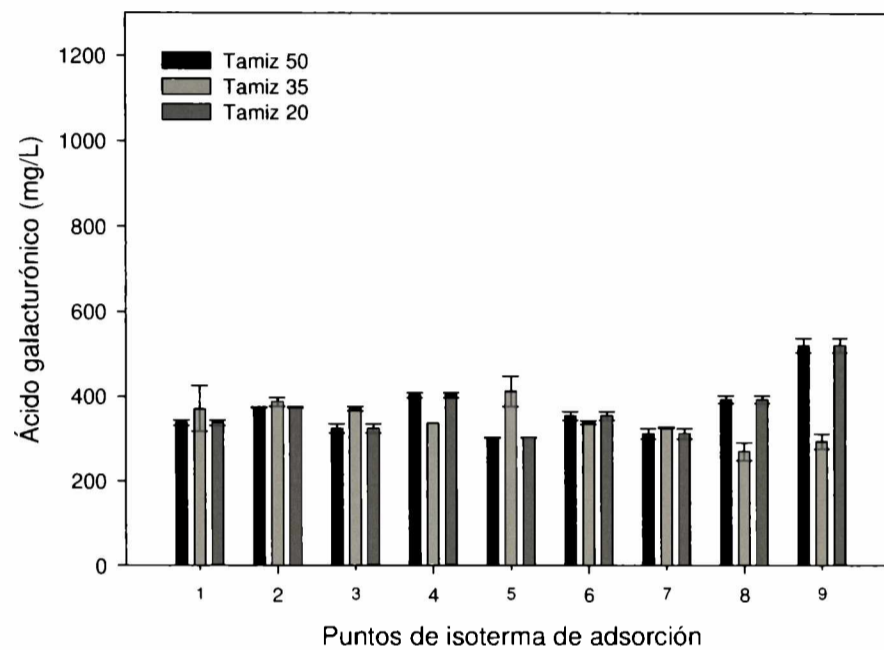


Figura 1. Concentración de pectina solubilizada (medida como ácido galacturónico) usando AcB (20 mM, pH 5.0)

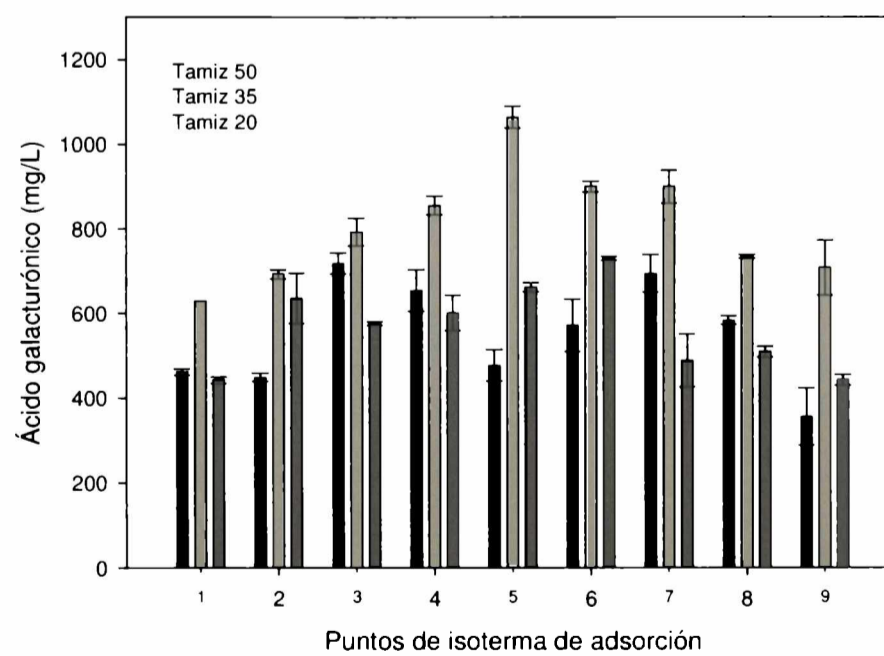


Figura 2. Concentración de pectina solubilizada (medida como ácido galacturónico) usando CitB (10 mM, pH 5.0)

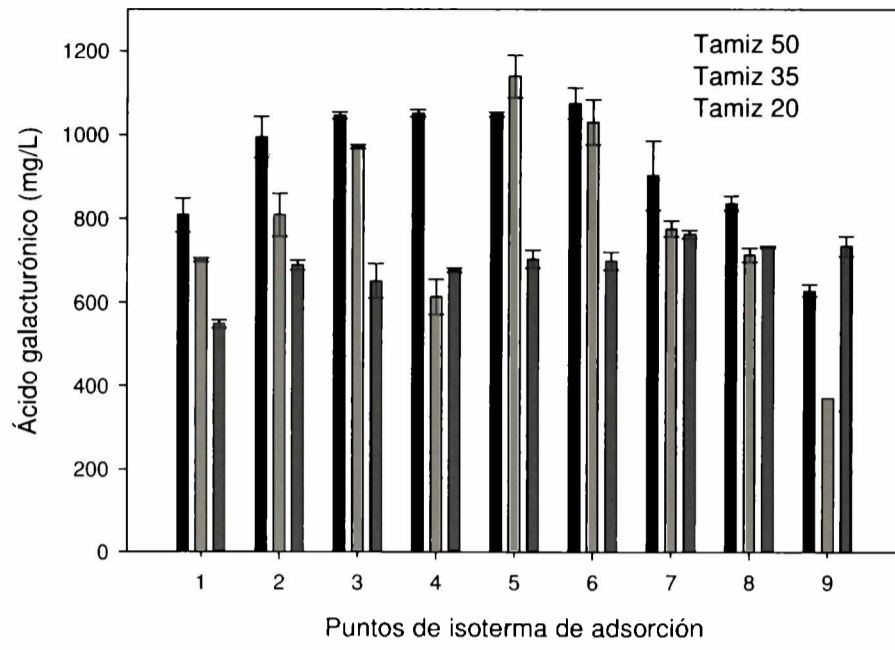


Figura 3. Concentración de pectina solubilizada (medida como ácido galacturónico) usando BCP 1/4 (pH 5.0)

ANEXO 3

Análisis estadístico del proceso de solubilización de pectina

A) Protopectina de Limón

Tabla 1. Análisis de varianza para protopectina de limón, tamiz 35.

Factor	S. C.	G. L	M. C.	F	P
A: T	$1,247 \times 10^5$	1	$1,247 \times 10^5$	0,67	0,4505
B: pH	$2,166 \times 10^6$	1	$2,166 \times 10^7$	11,62	0,0191
C: CB	$8,875 \times 10^5$	1	$8,875 \times 10^5$	4,76	0,0809
AA	$9,214 \times 10^6$	1	$9,214 \times 10^6$	49,45	0,0009
AB	$2,522 \times 10^2$	1	$2,522 \times 10^2$	0,00	0,9721
AC	$1,466 \times 10^5$	1	$1,466 \times 10^5$	0,79	0,4157
BB	$2,790 \times 10^5$	1	$2,790 \times 10^5$	1,50	0,2756
BC	$1,214 \times 10^6$	1	$1,214 \times 10^6$	6,52	0,0511
CC	$5,809 \times 10^6$	1	$5,809 \times 10^6$	31,17	0,0025
Error	$9,317 \times 10^5$	5	$1,863 \times 10^5$		
Total	$1,743 \times 10^7$	14			

$$R^2 = 94,6 \%$$

$$R^2 \text{ (ajustado para G.L)} = 85,0 \%$$

$$\text{Error estándar del estimado} = 431,663$$

$$\text{Error absoluto de medias} = 222,544$$

$$\text{Estadístico Durbin-Watson (DW)} = 2,065$$

El análisis estadístico de residuos de Durban-Watson (DW) determina si existe una correlación significativa basada en el orden en el cual aparecen los datos, para lo cual si el valor DW es mayor a 1,4 es probable que no exista una auto-correlación significativa en los residuos. En este caso el valor DW fue 2,065, lo cual indica que no existe una auto-correlación significativa.

B) Protopectina de Naranja Amarga

Tabla 2. Análisis de varianza para protopectina de naranja amarga, tamiz 35

Factor	S. C.	G. L	M. C.	F	P
A: T	$4,786 \times 10^5$	1	$4,786 \times 10^5$	31,12	0,0307
B: pH	$3,072 \times 10^6$	1	$3,072 \times 10^6$	199,76	0,0050
C: CB	$1,744 \times 10^6$	1	$1,744 \times 10^6$	113,44	0,0087
AA	$6,457 \times 10^4$	1	$6,457 \times 10^4$	4,20	0,1770
AB	$6,283 \times 10^5$	1	$6,283 \times 10^5$	40,86	0,0236
AC	$1,002 \times 10^6$	1	$1,002 \times 10^6$	65,15	0,0150
BB	$7,825 \times 10^5$	1	$7,825 \times 10^5$	50,88	0,0191
BC	$2,181 \times 10^5$	1	$2,181 \times 10^5$	14,18	0,0638
CC	$1,806 \times 10^6$	1	$1,806 \times 10^6$	117,44	0,0084
Error	$9,317 \times 10^5$	3	$1,538 \times 10^4$		
Total	$3,076 \times 10^4$	14			

$$R^2 = 75,8 \%$$

$$R^2 \text{ (ajustado para G.L)} = 32,3 \%$$

$$\text{Error estándar del estimado} = 834,791$$

$$\text{Error absoluto de medias} = 398,033$$

$$\text{Estadístico Durbin-Watson (DW)} = 0,904$$

En este caso el valor de DW indica que puede existir auto-correlación significativa dentro del modelo.

ANEXO 4

Análisis estadístico del proceso de maceración

Tabla 1. Análisis de varianza para albedo de limón.

Factor	S. C.	G. L.	M. C.	F	P
A: T	31,64	1	31,64	333,43	0,0030
B: pH	2,39	1	2,39	25,15	0,0375
C: CB	1,66	1	1,66	17,47	0,0528
AA	10,55	1	10,55	111,19	0,0089
AB	3,27	1	3,27	34,44	0,0278
AC	1,54	1	1,54	16,25	0,0564
BB	4,08	1	4,08	43,04	0,0225
BC	3,38	1	3,38	35,68	0,0269
CC	8,78	1	8,78	92,52	0,0106
Error	0,18	2	0,10		
Total	88,71	14			

$$R^2 = 92,9 \%$$

$$R^2 \text{ (ajustado para G.L.)} = 80,2 \%$$

$$\text{Error estándar del estimado} = 1,121$$

$$\text{Error absoluto de medias} = 0,534$$

$$\text{Estadístico Durbin-Watson (DW)} = 1,267$$

En este caso el valor DW indica que puede existir auto-correlación significativa dentro del modelo.