

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN DE PECTINA DE CÁSCARA DE LIMÓN USANDO PROTOPECTINASA-SE

EVALUATION OF PECTIN SOLUBILIZATION CAPABILITY FROM LEMON PEEL USING PROTOPECTINASE-SE

Arley D. ZAPATA Z.^{1,2*}, Carlos A. ESCOBAR G.¹, Sebastián F. CAVALITTO^{2,3}, Roque A. HOURS.²

Recibido: Junio 14 de 2008 Aceptado: Noviembre 10 de 2008

RESUMEN

La pectina es un polisacárido de origen vegetal ampliamente usado en las industrias alimenticia y farmacéutica, entre otras, debido a sus particulares propiedades físico-químicas. En este artículo se estudia la actividad solubilizadora de pectina de protopectinasa-SE, enzima producida por el hongo levaduriforme *Geotrichum klebahnii*, utilizando como sustrato el albedo del limón (parte interna, blanca y esponjosa de la cáscara) y la protopectina (sustancia péctica insoluble en agua, obtenida del mismo tejido). Se evalúa el efecto del tamaño de partícula y de la composición, el pH y la temperatura del medio de reacción, usando el diseño experimental Doehlert. El pH, la temperatura y la concentración de solución amortiguadora de pH (ácido cítrico-citrato de sodio, CitB) ejercen un importante efecto sobre el proceso de solubilización de pectina a partir de protopectina, con un nivel óptimo de solubilización a pH 5,0, 37°C y concentración de CitB = 25 mM. Bajo las condiciones óptimas de reacción se obtuvieron rendimientos de 37 y 28 g de pectina/100 g de tejido (base seca) a partir de protopectina y albedo, respectivamente. La pectina extraída en ambos casos presenta un contenido de grupos urónicos de 60% y un grado de esterificación de 78%.

Palabras clave: pectina, protopectina, polisacárido, *Citrus limon*.

ABSTRACT

Pectin is a polysaccharide of vegetal origin widely used in food and pharmaceutical industries, among others, due to its particular physicochemical properties. Pectin solubilizing activity of Protopectinase-SE, an enzyme produced by the yeast-like fungus *Geotrichum klebahnii*, was studied using lemon albedo (the inner white and spongy part of the peel) and protopectin (the water insoluble pectic substance obtained from the same tissue) as substrates. Effects of substrate particle size and composition, pH and temperature of reaction medium were evaluated using a Doehlert experimental design with response surface. Temperature, pH and buffer (citric acid-sodium citrate, CitB) concentration display an important

1 Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Calle 59A Número 63 - 20. Medellín, Colombia.

2 Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, CINDEFI. (UNLP; CCT-La Plata, CONICET). Calle 47 y 115. (1900) La Plata, Argentina.

3 Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Roque Saenz Peña 352. (B1876BXD) Bernal, Argentina.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: adzapata@unal.edu.co

effect on pectin solubilization process, with optimal solubilization conditions at pH 5.0, 37°C and CitB = 25 mM. Yield of 37 and 28 g of pectin/100 g tissue (dry basis) are achieved under optimal reaction conditions from protopectin and albedo, respectively. In both cases, extracted pectin shows a 60% uronic acid content and 78% esterification grade.

Key words: pectin, protopectin, polysaccharide, *Citrus limon*.

INTRODUCCIÓN

Las pectinas constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos ácidos de origen vegetal con propiedades de gelificación, estabilización de emulsiones y aporte de fibra nutricional, razón por la cual tienen gran aplicabilidad en las industrias alimenticia y farmacéutica, entre otras. Para su producción se utilizan algunos subproductos propios de industrias de jugos de fruta, principalmente cáscaras de cítricos y orujo de manzana. Su precursor es la protopectina, definida como la sustancia péctica insoluble en agua que origina pectina soluble por despolimerización parcial (1, 2).

Estructuralmente la pectina está constituida por un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (AGA) unidos entre sí por enlaces α -1,4, los cuales pueden estar esterificados con metanol. A esta región se la denomina Homogalacturonano (HG), la cual normalmente equivale a un 70% - 80% de la masa total de la pectina. Las propiedades funcionales de la pectina dependen, entre otros factores, de su grado de esterificación. A su vez el esqueleto estructural de HG puede estar interrumpido por moléculas de ramnosa unidas por enlaces α -1,2, a partir de los cuales se forman cadenas laterales de azúcares, principalmente L-arabinosa y D-galactosa, generando de esta manera la región denominada Ramnogalacturonano (RG). Existen algunos factores estructurales que le otorgan a la pectina gran rigidez, convirtiéndola en una estructura insoluble denominada protopectinas. Entre estos factores se pueden mencionar los puentes de Ca^{2+} entre grupos carboxílicos libres, y la unión de las cadenas de azúcares laterales a la celulosa (1, 3, 4).

Existen diferentes técnicas para la extracción de pectina a partir de tejidos vegetales, las cuales utilizan procedimientos físico-químicos, microbiológicos o enzimáticos. Sin embargo, los procedimientos físico-químicos, si bien son los más utilizados a nivel industrial (5-8), tienen las desventajas que conlleva el manejo, tanto de ácidos fuertes como de altas temperaturas, sin mencionar sus altos requerimientos energéticos y los problemas

de contaminación ambiental que generan. Desde hace algunos años se ha informado sobre diversos trabajos relacionados con el uso de las técnicas microbiológicas y enzimáticas (5, 6, 9); sin embargo, son escasos los estudios que relacionan dichos procesos con la optimización de las condiciones de operación.

Los procedimientos enzimáticos para la extracción de pectina utilizan aquellas enzimas, de origen microbiano, que tienen la capacidad de solubilizar pectina a partir de protopectina, las cuales son denominadas Protopectinasas (PPasas) (10). La Protopectinasa-SE (PPasa-SE), fue aislada a partir del hongo levaduriforme *Trichosporon penicillatum* SNO-3, el cual posteriormente fue reclasificado como *Geotrichum klebahnii* ATCC 42397 (11). 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 caracterizada e identificada como una endo-PGasa (3.2.1.15). Diversas PPasas, producidas tanto por bacterias como por levaduras y hongos filamentosos, han sido también purificadas y caracterizadas (9, 12, 13).

La producción industrial de pectina se concentra en algunos países de Europa, principalmente Alemania e Inglaterra, donde existen plantas que producen más de 8.000 toneladas anuales. Los valores de importación de sustancias pécticas (pectinas, pectatos y ácidos pécticos) en Colombia, según informes obtenidos entre los años 2005 y 2007, ascienden en promedio a 265 toneladas anuales, mercado equivalente a US\$ 2.180.000 (14). Con base en estos datos, y aprovechando la característica de ser Colombia un país con gran cantidad y variedad de cítricos, se hace pertinente el estudio de sistemas que permitan la extracción enzimática de pectina, ofreciendo de esta manera alternativas para el aprovechamiento de residuos agrícolas, mediante tratamientos biotecnológicos innovadores y de bajo impacto ambiental.

En el presente trabajo se evaluó el efecto del tamaño de partícula y la composición, pH y tem-

peratura del medio de reacción, sobre la capacidad de solubilización de pectina a partir de protopectina de limón, usando PPasa-SE. Para ello se utilizó el diseño experimental Doehlert, que permitió definir los niveles de las variables que optimizan el proceso de solubilización de pectina. Posteriormente se pudo determinar el rendimiento del proceso, usando las condiciones óptimas de operación encontradas previamente, a partir tanto de albedo como de protopectina de limón. Por último, la pectina extraída fue caracterizada parcialmente por medio de la determinación del contenido de ácidos urónicos (expresados como AGA) y el grado de esterificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y fuente de enzima

Los reactivos 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 estaban comercialmente disponibles y en grado analítico. La PPasa-SE fue obtenida a partir de cultivos de *Geotrichum klebahnii* ATCC 42397 realizados en un biorreactor LH 210 (Inceltech, France) de 5,0 L, en la modalidad de lote alimentado, utilizando un medio constituido por glucosa, urea, sales y micronutrientes, definido en trabajos previos (15, 16). La biomasa se separó por centrifugación (10 min, 4°C) a $16,000 \times g$, y el sobrenadante se concentró por evaporación a presión reducida, se liofilizó y almacenó 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 amortiguadora de pH definida en cada experimento.

Obtención de protopectina

Se seleccionaron frutos frescos y maduros de limón (*Citrus limon* Burm, cv. Lisbon), los cuales se refrigeraron 12 h antes de su utilización. La técnica utilizada para la extracción de protopectina consistió en el tratamiento con etanol frío (16, 17), para lo cual inicialmente se extrajo la parte superficial coloreada de la cáscara (flavedo), la cual fue

descartada. Después de extraer mecánicamente el mesocarpio del hesperidio del limón también denominado albedo (parte interna, blanca y esponjosa de la cáscara), éste se trituroó usando una procesadora de alimentos 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 con el fin 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 35 y 50 ($\text{Ø} = 425$ y $300 \mu\text{m}$, respectivamente). De esta manera, los diámetros de las partículas obtenidas, asumiendo geometría esférica, fueron: retenidas en tamiz 35 ($850 \mu\text{m} > \text{Ø} > 425 \mu\text{m}$) y 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.

Variables fisicoquímicas evaluadas durante el proceso de solubilización de pectina

Se evaluó el efecto del tamaño de partícula, composición del medio, pH y la temperatura sobre la capacidad de solubilización de pectina (expresada

como ácidos urónicos) a partir de protopectina de limón a una concentración de 20 mg/mL (30 mg de protopectina + 1,5 mL de solución amortiguadora). 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 a la protopectina a 30°C. El proceso se llevó a cabo por 6 h a 150 rpm. La composición del medio se evaluó preliminarmente de acuerdo al tipo de solución amortiguadora de pH utilizada: a) ácido acético-acetato de sodio (AcB) 20 mM, b) ácido cítrico-citrato de sodio (CitB) 10 mM, y c) citrato de sodio 12.5 mM-fosfato di-básico de sodio 6.25 mM (BCP 1/4). El pH de todas las soluciones amortiguadoras fue 5,0 y su conductividad eléctrica, medida con un conductímetro (HI 3291, Hanna), fue de 1.2, 1.4 y 1.9 mS, respectivamente. Dichos 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 (18) con superficie de respuesta 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). Este diseño se fundamenta en la organización uniforme de las variables alrededor de un punto central, dando origen a una estructura tetraédrica de arista unitaria cuyos vértices pueden ser cuantificados por un procedimiento matemático simple, generando unas coordenadas codificadas que posteriormente se transforman en valores reales de los niveles de cada factor arrojando un total de 15 experimentos, incluyendo un punto central por triplicado. Las medidas se hacen con base en la concentración de AGA.

Determinación del rendimiento en la extracción de pectina a partir de albedo y protopectina de limón

Inicialmente se calculó la concentración de albedo necesaria para lograr equivalencia, en términos de material péctico, con la cantidad de protopectina usada en los ensayos previos, para lo cual se tuvo en cuenta el rendimiento en la extracción de protopectina (350 mg de protopectina/g de albedo en base seca) y la humedad del albedo (80%). Los resultados de estos cálculos indicaron que una concentración de protopectina de 0,02 g/mL 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, por ejemplo 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. El rendimiento en la extracción de pectina se reporta como g de MIE por cada 100 g de tejido procesado (5).

Técnicas de análisis

La actividad enzimática de PPasa-SE se evaluó con base en su actividad como PGasa, determinada de acuerdo a la capacidad para hidrolizar cadenas de PGA. Una unidad de actividad PGasa se define como la cantidad de residuos reductores por mL de ácido poligalacturónico por minuto liberada en las condiciones de reacción (19). La cuantificación de pectina se hizo de forma indirecta midiendo la concentración de grupos urónicos de acuerdo al método del m-hidroxidifenilo (mhdf) (20), el cual utiliza una curva patrón de AGA monohidrato (0-150 mg/L), tratada de igual manera que las muestras. Las medidas se hicieron en un espectrofotómetro (DU 640, Beckman). La determinación del grado de esterificación se realizó por métodos titulométricos (21).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tamaño de partícula y la composición del medio

A continuación se muestran los resultados relacionados con el efecto del tipo de solución amortiguadora de pH (CitB, 10 mM; AcB, 20 mM y BCP 1/4), todas a pH 5,0, y el tamaño de partícula (tamiz 50 y 35), sobre el proceso de solubilización de pectina (Véase figura 1). Se observa que no existe diferencia significativa entre los dos tamaños de partícula, independientemente del tipo de solución amortiguadora empleada. Tampoco se

observa diferencia significativa entre CitB y BCP 1/4, pero sí entre ellos y AcB. Dichas evidencias fueron comprobadas estadísticamente mediante un test de Student ($\alpha = 0.05$). Los mayores niveles

de solubilización se obtuvieron con CitB (10 mM) y BCP 1/4; por tal motivo se seleccionó el CitB y el tamaño de partícula definido por el tamiz 35 para los ensayos posteriores.

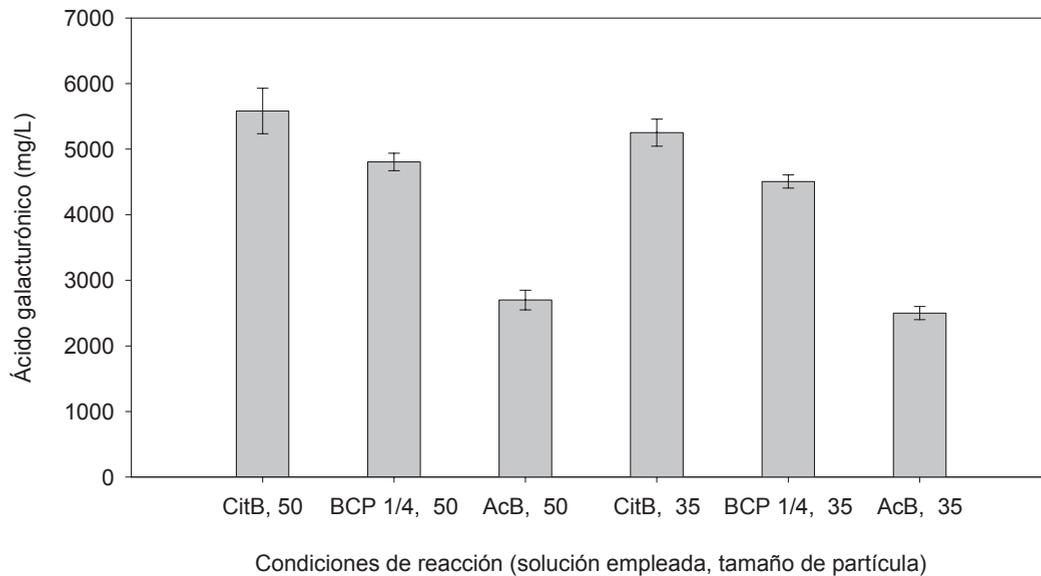


Figura 1. Efecto del tipo de solución amortiguadora de pH y tamaño de partícula de protopectina sobre la capacidad de solubilización de pectina a partir de protopectina de limón. AcB: ácido acético-acetato de sodio (20 mM), CitB: ácido cítrico-citrato de sodio (10 mM) y BCP 1/4: citrato de sodio 12.5 mM-fosfato di-básico de sodio 6.25 mM.

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 de mantener unidas las cadenas lineales del HG, otorgándoles 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 (21, 22). Diferentes autores han utilizado EDTA con el mismo fin (1, 23, 24). Además, se ha reportado el efecto sinérgico entre enzimas y algunos ácidos orgánicos sobre la extracción de pectina (25).

Efecto del pH, concentración de CitB y temperatura

El modelo matemático que se describe a continuación representa los resultados obtenidos mediante el diseño experimental Doehlert (Véase tabla 1), el cual explica dichos resultados con un

$R^2 = 0.95$. Este modelo incluye sólo los efectos significativos definidos según un análisis de varianza ($P < 0.05$).

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

Con base en el modelo se calculó la concentración de pectina obtenida en cada nivel de temperatura (30, 37 y 44°C), y con estos valores se realizaron las superficies de respuesta (Véase figura 2). Además, 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 $\text{pH} \geq 6.0$ (16), 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 para el nivel de solubilización de pectina, trabajar a $\text{pH} < 4.0$, evitando así posibles contaminaciones, especialmente cuando se trabaja en mayor escala.

Tabla 1. Resultados de solubilización de pectina a partir de protopectina de limón, según el diseño experimental Doehlert. CB: Concentración de CitB.

pH	CB (mM)	Temperatura	AGA (mg/l)
3,75	18,33	30	4509
4,50	38,33	30	5109
5,25	18,33	30	4442
3,00	25,00	37	5423
3,75	5,00	37	5317
3,75	45,00	37	4828
5,25	45,00	37	6305
5,25	5,00	37	4590
6,00	25,00	37	7674
3,75	31,67	44	4888
4,50	11,67	44	4448
5,25	31,67	44	5590
4,50	25,00	37	6769
4,50	25,00	37	6995
4,50	25,00	37	7328

Para validar el modelo se compararon los resultados obtenidos en condiciones de 37°C, CitB (10 mM) y pH 5,0, con los obtenidos previamente (véase figura 1). Además se realizaron ensayos independientes de solubilización de pectina a 37°C, CitB (25 mM) y pH 5,0. En ambos casos se obtuvieron diferencias con el modelo menores de 8%.

Determinación del rendimiento

Los resultados del proceso de solubilización de pectina a partir de albedo y protopectina de limón (Véase tabla 2), permiten observar un mayor rendimiento de pectina extraída al utilizar protopectina, lo que indicaría una mayor afinidad de la enzima con 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 el MIE fue de 60%. El grado de esterificación de la pectina extraída fue de 78%, lo que indica que se trata de pectina de alto metoxilo.

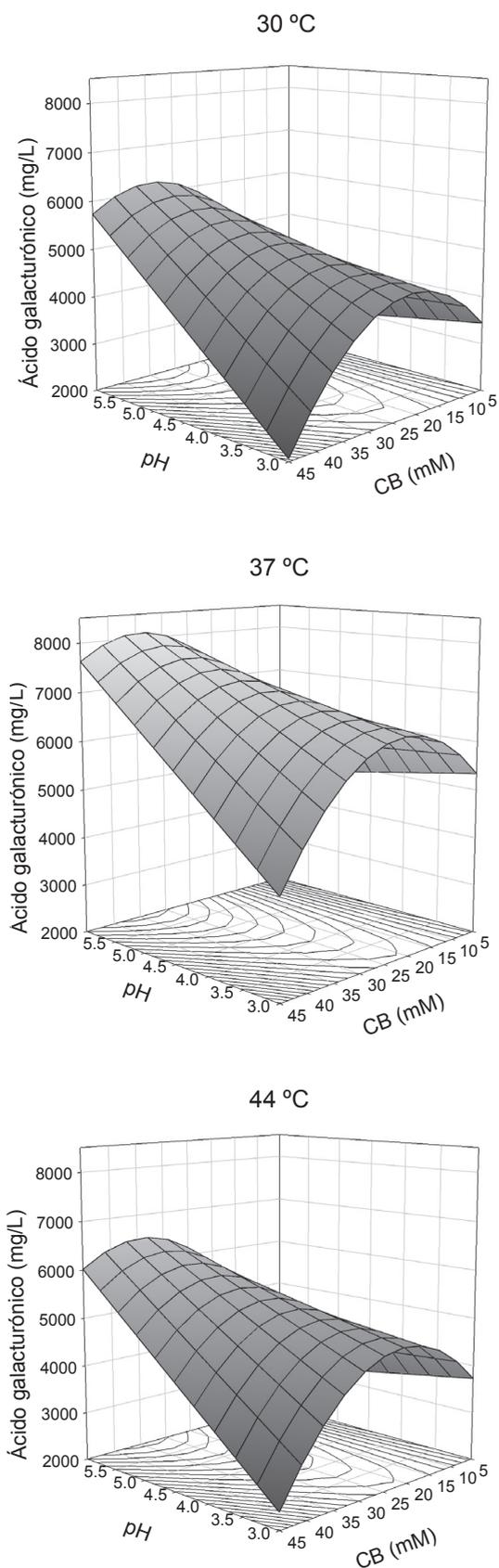


Figura 2. Superficies de respuesta del proceso de solubilización de pectina. CB: Concentración de CitB.

Tabla 2. Rendimientos en la extracción de pectina (material insoluble en etanol). Rendimiento: g de pectina/100 g de tejido.

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

* Base seca de material procesado

** Base húmeda de material procesado.

El contenido total de AGA en la cáscara ha sido reportado en función tanto del albedo del limón (35 g AGA/100 g albedo) (26), como de la protopectina de limón (34 g AGA/100 g de protopectina) (5), ambos en base seca. Teniendo en cuenta este último dato, así como el resultado obtenido en cuanto al contenido de AGA en el MIE (60%), se puede inferir que la eficiencia real del proceso a partir de protopectina, fue de 65%. Lo anterior, descartando una inactivación total de la enzima durante el proceso, puede ser explicado en primera instancia con

base en una pérdida de afinidad entre la enzima y el sustrato. Esta hipótesis se estudia en la actualidad.

Existen diferentes informes que presentan los rendimientos en extracción de pectina obtenidos por medio de diferentes métodos de extracción (Véase tabla 3). En estos trabajos la pectina está referida al MIE (5, 7) o fue determinada por técnicas colorimétricas (8, 9). Se observa que los rendimientos obtenidos en el presente estudio son considerablemente mayores a los registrados previamente, lo cual confirma la bondad del proceso enzimático utilizado. Sin embargo, debe tenerse en cuenta también la posible variación que se puede generar en el contenido de pectina debido a cambios en la variedad del limón. De particular importancia es la confirmación del efecto que tiene el uso de buffer citrato sobre la extracción de pectina (8).

Otros informes bibliográficos indican que la extracción de pectina a partir de cítricos y otras especies vegetales, usando procesos químicos, origina rendimientos menores o equivalentes a los obtenidos en este trabajo (incluso para tejidos con contenido de pectina mayor que el limón) (27, 28).

Tabla 3. Antecedentes de rendimientos en la extracción de pectina. Rendimiento: g de pectina/100 g de tejido (base seca).

Sustrato empleado	Método	Especificaciones	Rendimiento (g de pectina/100 g de material seco)	Referencia
Albedo de limón	Químico	-	20,2	(5)
Albedo de limón	Enzimático	Poligalacturonasa de <i>A. kawachii</i>	27	(5)
Albedo de limón	Enzimático	Poligalacturonasa de <i>A. Níger</i>	17,6	(5)
Albedo de limón	Microbiológico	<i>G. klebahnii</i>	2,9 (base húmeda de albedo de limón)	(7)
Protopectina de limón	Químico	-	22	(8)
Protopectina de limón	Enzimático	PPasa-SE de <i>G. klebahnii</i> en buffer acetato (100 mM)	26,5	(8)
Albedo de limón	Enzimático	PPasa tipo B	10,9	(9)

CONCLUSIONES

El CitB, como medio de reacción enzimática, promueve una mayor solubilización de pectina a partir de protopectina de limón, usando PPasa-SE. Este resultado puede ser explicado con base en la capacidad quelante del ácido cítrico a cationes divalentes, especialmente Ca^{2+} , facilitando la separación de las cadenas de HG.

El pH, la concentración de CitB y la temperatura ejercieron un efecto significativo sobre el proceso de solubilización de pectina. El diseño experimental 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 informados por

otros autores, usando el mismo sustrato. Además, se obtuvieron pectinas de alto metoxilo, con un contenido de ácidos urónicos de 65%.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización del presente trabajo se contó con el apoyo financiero de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, en el marco del proyecto de investigación “Estudio de la expresión de protopectinasa de *Geotrichum klebahnii* y evaluación de algunas variables que afectan su acción enzimática en la extracción de pectina de frutas”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Buren JP. Function of pectin in plant tissue structure and firmness. En: Walter RH, editor. The chemistry and technology of pectin. San Diego: Academic Press; 1991. p. 1-22.
2. Baciú J, Jördening H. Kinetics of galacturonic acid release from sugar-beet pulp. *Enz Microb Tech.* 2005; 34 (5): 505-512.
3. Aspinall GO. Chemistry of cell wall polysaccharides. En: Stumpf CPK, Conn EE, editors. Biochemistry of plants. New York: Academic Press; 1980. p. 473-500.
4. Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme EJ. Pectin, pectinase, protopectinase: production, properties, and applications. En: Laskin AI, Neidleman S, editors. Advances In Applied Microbiology. Vol. 39. New Jersey: Elsevier Science; 1993. p. 213-294.
5. Contreras Esquivel JC, Hours RA, Aguilar C, Reyes-Vega ML, Romero J. Revisión: Extracción microbiológica y enzimática de pectina. *Arch Lat Nut.* 1997; 47 (3): 208-216.
6. Schroder R, Christopher JC, Sharrock K, Hallett IC, MacRae EA. Pectins from the albedo of immature lemon fruitless have high water binding capacity. *J Plant Physiol.* 2004; 161 (4): 371-379.
7. Sakai T, Okushima M. Microbial production of pectin from citrus peel. *Appl Environ Microb.* 1980; 39 (4): 908-912.
8. Sakamoto T, Hours RA, Sakai T. Enzymatic pectin extraction from protopectins using microbial protopectinases. *Process Biochem.* 1995; 30 (5): 403-409.
9. Sakamoto M, Shirane Y, Naribayashi I, Kimura K, Morishita N, Sakamoto T, Sakai T. Purification and characterization of a rhamnogalacturonase with protopectinase activity from *Trametes sanguinea*. *Eur J Biochem.* 1994; 226 (2): 285-291.
10. Sakai T. Protopectinase from yeast and yeast-like fungus. En: Wood WA, Kellogs ST, editores. Methods in enzymology Vol. 161. San Diego: Academic Press; 1988. p. 335-350.
11. Sakai T, Okushima M. Protopectin solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric Biol Chem.* 1978; 42 (12): 2427-2429.
12. Sakai T, Okushima M. Purification and crystallization of protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric Biol Chem.* 1982; 46 (3): 667-676.
13. Da Silva EG, Borges M, Medina C, Piccoli RH, Schwan RF. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Res.* 2005; 5 (9): 859-865.
14. Servicio Internacional de Comercio Exterior (SICEX). [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.sicex.com>. Consultado: 3 de noviembre de 2008.
15. Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF. Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. *J Ind Microb Biotech.* 2000; 25 (5): 260-265.
16. Ferreyra OA, Cavalitto SF, Hours RA, Ertola RJ. Influence of trace elements on enzyme production: protopectinase expression by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Enz Microb Tech.* 2002; 31 (4): 498-504.
17. Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF. Quantification of pectin-releasing activity of protopectinase-SE from *Geotrichum klebahnii*. *Biotech Tech.* 1997; 11 (5): 331-334.
18. Taragano VM, Pilosof AMR. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enz Microb Tech.* 1999; 25 (3-5): 411-419.
19. Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF. Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotech Tech.* 1999; 13 (6): 385-390.
20. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem.* 1973; 54 (2): 484-489.
21. Kim DH, Kim DG, Lee DY, Kim KE, Kim CW. Physicochemical characterization of pectin extracted from cheju mandarin (*Citrus unshiu*) peels with citric acid. *Food Sci Biotech.* 2000; 9 (2): 95-98.
22. De Bruijn J, Bickman E. Enzymatic maceration of potatoes: influence of reaction conditions. *Agro-Ciencia.* 1998; 14(2): 245-250.
23. Sato S. Enzymatic maceration of plant tissue. *Plant Physiol.* 1968; 21: 1067-1075.
24. Chesson A. A Review. Maceration in relation to the post-harvest handling and processing of plant material. *J Appl Bact.* 1980; 48 (1): 1-45.
25. Bateman DF. The enzymatic maceration of plant tissue. *Neth J Pl Path* 1968; 74 (S1): 67-80.
26. Sinclair WB, Crandall PR. Carbohydrate fractions of lemon peel. *Plant Physiol.* 1941; 24 (4): 681-705.
27. Meseguer I, Aguilar V, González MJ, Martínez C. Extraction and colorimetric quantification of uronic acids of the pectic fraction in fruits and vegetables. *J Food Comp Anal.* 1998; 11 (4): 285-291.
28. Canteri-Schemin MH, Ramos Fertoni HC, Waszczynskij N, Wosiacki G. Extraction of pectin from apple pomace. *Braz Arch Biol Technol.* 2005; 48 (2): 259-266.