



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación del uso de pectinasas obtenidas de *Aspergillus flavipes* FP-500 para la producción de jugo de naranja y su comparación con preparaciones enzimáticas comerciales

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

PAULINA OLLIN MOLINA MUÑOZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Ortegón Ávila Aurora Irma
VOCAL	Aguilar Osorio José Guillermo de Jesús
SECRETARIO	Giles Gómez Martha
1ER. SUPLENTE	Ruiz Villafan Beatriz
2o. SUPLENTE	Aburto Anell Jorge Arturo

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Grupo de Fisiología de Hongos Filamentos del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E Laboratorio 312, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Guillermo Aguilar Osorio.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Guillermo Aguilar Osorio

SUSTENTANTE:

Paulina Ollin Molina Muñoz

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres, que han sido un apoyo constante en mi vida, y que gracias su esfuerzo y trabajo diario han sustentado mi carrera universitaria. Ustedes me han alentado siempre para hacer mi mejor esfuerzo ante cualquier reto o circunstancia de la vida, muchas gracias, este es el primer fruto de todo el trabajo y perseverancia que ustedes siempre fueron los primeros en alentar.

Tambien agradezco a mi querida UNAM que me ha honrado con el privilegio de pertenecer a su comunidad universitaria abiéndome las puertas de la superación y tambien ha inculcado en mi la tenacidad y la seguridad para afrontar mi vida profesional con la certeza de contar con las mejores herramientas para mi desarrollo.

Agradecimientos

Mamá y papá, gracias por ser un ejemplo de perseverancia y motivarme en todo momento, por enseñarme con el ejemplo lo que es la constancia y por apoyar mis decisiones. Los amo.

Hermanos, Désirée, Jair y Manuel, gracias por toda la experiencia que directa o indirectamente han depositado en mi, ya sea en consejos o como lecciones de vida. Siempre han despertado mi admiración y respeto, los quiero mucho.

Héctor, tu me has enseñado la importancia de escuchar al corazón y a ser constante en todos los ámbitos de la vida. Gracias por darme tu amor, por multiplicar mis sonrisas, por ser mi mejor amigo, mi confidente, por ser la mejor compañía y por ser maravillosamente único. Te amo.

Dr. Guillermo gracias por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y sobre todo quiero reconocer su paciencia, compromiso y apoyo durante el tiempo que estuve bajo su asesoría. Admiro su vocación, ha sido una gran inspiración para mi el amor con el que realiza su trabajo.

Queridos amigos y amigas de la facultad: Mayleth Domínguez a ti, por tu invaluable amistad, por la entrega incondicional y el hombro irremplazable que fue mi apoyo en momentos importantes, a Veronica Camarillo que con su alegría, constancia y fortaleza me dejó claro que cuando se quiere se puede, a Sonia Martinez que se encargó de mantener presente la fortaleza espiritual y que compartió conmigo sus palabras de aliento, a Alicia Villaseñor que me hizo sonreír y que siempre realizó lo necesario para seguir adelante, a Erika Rodriguez que me enseñó disciplina y compromiso, a Karina Torres que me contagió su sonrisa y me recordó siempre el gran valor de la familia, a Viridiana Calzada que siempre tuvo una actitud positiva y que es un ejemplo de organización y e iniciativa y a Paola Domínguez a quien admiro por su renovación constante que vence el miedo a los cambios. De todos ustedes he aprendido algo y hemos compartido experiencias inolvidables, felices y

divertidas, pero también de responsabilidad y trabajo en equipo, siento por todos ustedes un profundo cariño, muchas gracias por todo, los quiero.

Gracias a mis compañeras del laboratorio 312, Ruth por ser una conciencia amiga, mi guía incondicional y excelente compañía, Brenda gracias por tu asesoría y ayuda a mi llegada al laboratorio y por hacer tan buena elección con los pasteles de cumpleaños, Yanira y Gina gracias por las conversaciones amenas y por los momentos alegres que compartimos durante las horas de laboratorio.

A mis revisores de tesis, Aurora Ortégón y Martha Giles muchas gracias por los comentarios que hicieron al revisar mi trabajo, por su profesionalismo y aceptar ser parte de un momento tan significativo en mi vida.

Gracias a mis siempre amigos Ángel, Catalina, Eunice, Luis, Ximena, Manuel, y Jorge por acompañarme a lo largo de esta etapa de mi vida y por los buenos y valiosos momentos que pasamos juntos siempre que nos reunimos.

Le agradezco también a todas las personas que iluminaron mi camino con su luz dejándome alguna enseñanza.

ÍNDICE

RESUMEN	1
CAPÍTULO 1. Introducción	2
CAPÍTULO 2. Generalidades	4
2.1 Los cítricos	4
2.1.1 <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck : Naranja dulce	4
2.1.1.1 Composición fisicoquímica de la naranja	5
2.1.1.2 Producción de naranja en México	7
2.1.1.3 Consumo de naranja en México	8
2.1.2 El jugo de naranja y su proceso de obtención	9
2.2 Polisacáridos en la pared celular de las plantas	11
2.2.1 Celulosa	12
2.2.2. Hemicelulosa	13
2.2.3. Pectinas y sustancias pécticas	13
2.2.3.1 Estructura de la pectina (modelos)	14
2.2.3.2 Propiedades y aplicaciones de las pectinas	16
2.3 Los hongos y la biotecnología	16
2.3.1 El género <i>Aspergillus</i>	17
2.3.1.1 Morfología e identificación	18
2.3.1.2 Características fisiológicas	19
2.3.1.3 <i>Aspergillus flavipes</i>	19
2.4 Enzimas usadas para la degradación de la pared celular	21
2.4.1 Pectinasas	21
2.4.1.1 Clasificación	21
2.4.1.2 Producción de pectinasas por fermentación sumergida	22
2.4.1.3 Pectinasas comerciales	23
2.4.1.4 Aplicaciones de las pectinasas	23
2.4.2 Hemicelulasas	24
2.4.3 Celulasas	25
2.4.4 Importancia de las enzimas en la industria	26
2.4.5 Importancia de las enzimas en el mercado mundial	27
CAPÍTULO 3. Justificación	28
CAPÍTULO 4. Objetivos	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos particulares	29

CAPÍTULO 5. Materiales y métodos	30
5.1 Microorganismo	30
5.1.1 Preparación del inóculo: Suspensión de esporas	30
5.2 Composición del medio y condiciones de cultivo	30
5.3 Obtención y concentración del filtrado libre de células	30
5.4 Métodos de análisis: Caracterización de los concentrados enzimáticos	31
5.4.1 Cuantificación de proteína por el método de Bradford	31
5.4.2 Cuantificación de actividad exopectinasa	31
5.4.3 Ensayo viscosimétrico para medir actividad endopectinasa	31
5.4.4 Cuantificación de actividad xilanólítica	32
5.4.5 Cuantificación de actividad de carboximetilcelulasas	33
5.4.6 Cuantificación de actividad de pectin y pectatoliasas	33
5.4.7 Obtención de geles de SDS-PAGE y zimogramas	34
5.5 Métodos: Caracterización del jugo de naranja	35
5.5.1 Obtención del jugo de naranja	35
5.5.2 Determinación de pH	35
5.5.3 Determinación de acidez total	35
5.5.4 Cuantificación de azúcares reductores directos	35
5.5.5 Cuantificación de azúcares totales	36
5.5.6 Determinación de sólidos solubles	36
5.5.7 Determinación de la claridad del jugo	36
5.5.8 Determinación de la viscosidad	36
5.5.9 Determinación de los sólidos insolubles en alcohol	37
5.5.10 Determinación del peso residual	37
5.6 Esquema general de la metodología	38
CAPÍTULO 6. Resultados y discusión	39
6.1 Evaluación preliminar de los parámetros de cultivo para la producción de pectinasas....	40
6.2 Caracterización y evaluación de los concentrados enzimáticos	44
6.3 Aplicación de los extractos enzimáticos en el jugo de naranja	52
6.3.1 Evaluación de las características del jugo de naranja	52
6.3.2 Pruebas de filtración y análisis del jugo de naranja	55
6.4 Discusión general	66
CAPÍTULO 7. Conclusiones	68
CAPÍTULO 8. Perspectivas	69
CAPÍTULO 9. Bibliografía	70
CAPÍTULO 10. Anexos	76
10.1 Anexo A: Preparación de soluciones	76
10.2 Anexo B: Composición proximal de la cáscara de limón deshidratada	77
10.3 Anexo C: Curvas estándar	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática simplificada de los componentes principales de las frutas....	7
Figura 2. Productos de mayor producción en México en el 2008	8
Figura 3. Extractor de jugo de cítricos de FMC	10
Figura 4. Estructura de la pared celular	12
Figura 5. Representación esquemática de la pectina	15
Figura 6. Estructuras morfológicas del género <i>Aspergillus</i>	18
Figura 7. Imagen de una colonia de <i>A. flavipes</i> FP-500 sembrada en medio PDA e incubada a 37°C por 5 días	20
Figura 8. Morfología de una cabeza conidial de <i>A. flavipes</i>	20
Figura 9. Micrografía de una cabeza conidial de <i>A. flavipes</i>	20
Figura 10. Estructura principal de la molécula de pectina y sitios de acción de las enzimas pectinolíticas	22
Figura 11. Estructura hipotética del xilano y las enzimas requeridas para su completa hidrólisis ...	25
Figura 12. Representación hipotética de la degradación de la celulosa	26
Figura 13. Evaluación del pH de producción de exo y endo-pectinasas en medio con cáscara de limón al 2%, 37°C, 200 rpm con agitación recíprocante por 72h	41
Figura 14. Actividad exopectinolítica específica de los diferentes concentrados enzimáticos para una incubación a 45°C durante 20 min	44
Figura 15. Actividad endopectinolítica específica de los diferentes concentrados enzimáticos determinada a 30°C	45
Figura 16. Actividad xilanolítica específica de los diferentes concentrados enzimáticos para una incubación a 50°C durante 20 min	46
Figura 17. Actividad específica de pectin y pectatoliasas de los diferentes concentrados enzimáticos cuantificadas para su incubación a 40°C durante 60 min	47
Figura 18. Actividad específica de carboximetilcelulasas de los diferentes concentrados enzimáticos para una incubación a 50°C durante 60 min	47
Figura 19. Cuantificación de proteína de los concentrados enzimáticos por el método de Bradford	48
Figura 20. Geles SDS-PAGE	51

Figura 21. Actividad exopectinolítica y xilanolítica de enzimas presentes de forma natural en el jugo de naranja	53
Figura 22. Exploración de 3 diluciones del control de jugo de naranja tratado por 3h a 45°C	53
Figura 23. Exploración de 3 diluciones de jugo de naranja tratado enzimáticamente por 3 h a 45°C	54
Figura 24. Resultados de las pruebas de filtración	55
Figura 25. Cinética de tiempo de filtración del jugo de naranja con tratamiento enzimático a 45°C	56
Figura 26. Azúcares reductores directos del jugo de naranja a diferentes tiempos de tratamiento enzimático	57
Figura 27. Pruebas de filtración del jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min.....	58
Figura 28. Determinación de la reducción de viscosidad del jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min	59
Figura 29. Determinación de la claridad del jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min	60
Figura 30. Determinación del pH del jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min	61
Figura 31. Efecto del tratamiento con los concentrados enzimáticos a 45°C durante 90 min sobre la acidez total del jugo de naranja	61
Figura 32. Determinación de los azúcares reductores liberados por la actividad enzimática para el jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min	62
Figura 33. Determinación de los azúcares totales del jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min	63
Figura 34. Determinación del % de los residuos sólidos del jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min	63
Figura 35. Determinación de los sólidos solubles del jugo tratado con los extractos enzimáticos a 45°C por 90 min	64
Figura 36. Determinación de los sólidos insolubles en alcohol del jugo tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición proximal de las naranjas de la variedad valencia	5
Tabla 2. Composición química promedio de la porción comestible de la naranja	6
Tabla 3. Actividades exo y endo pectinolíticas de los FLC obtenidos en diferentes condiciones	40
Tabla 4. Efecto del almacenamiento en las actividades endo y exo-pectinolíticas del CE	42
Tabla 5. Resumen de las actividades enzimáticas específicas y cantidad de proteína del CE de <i>A. flavipes</i> y de las preparaciones enzimáticas comerciales	48
Tabla 6. Estandarización de los concentrados enzimáticos utilizados	57
Tabla 7. Constituyentes proximales de la cáscara de limón deshidratada	77

ABREVIATURAS USADAS

<i>A. flavipes</i>	<i>Aspergillus flavipes</i> FP-500
°C	Grados Celsius
cm	Centímetros
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
CE	Concentrado enzimático de <i>A. flavipes</i> FP-500
FLC	Filtrado Libre de Células
PEC-A	Preparación Enzimática Comercial A
PEC-B	Preparación Enzimática Comercial B
PEC-C	Preparación Enzimática Comercial C
FS	Fermentación Sumergida / Fermentación en Medio Líquido
g	Gramos
h	Horas
KDa	Kilodaltons
m	Metros
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
T	Temperatura
U	Unidades enzimáticas
mV	Milivolts
µg	Microgramos
µL	Microlitros

Resumen

Se comparó el Concentrado Enzimático (CE) de *A. flavipes* obtenido por Fermentación Sumergida (FS), empleando cáscara de limón como fuente de carbono, con 3 preparaciones enzimáticas comerciales usadas industrialmente para la despectinización de jugo de naranja.

Una vez obtenido el CE, se cuantificó la actividad enzimática de todos los concentrados, encontrando actividad endopectinolítica, exopectinolítica y xilanolítica principalmente, pero también están presentes las actividades de pectin y pectatoliasas y la de carboximetilcelulasas.

Se prepararon geles SDS-PAGE para conocer los perfiles electroforéticos de proteína, y zimogramas de actividad pectinolítica y xilanolítica donde se identificó la presencia de bandas de actividad características en cada uno de los concentrados analizados.

Posteriormente se caracterizaron lotes de 1 L de jugo provenientes del prensado de naranjas maduras y frescas tratadas enzimáticamente durante 90 min con la adición de 1.0 mL de los concentrados enzimáticos estandarizados a 267.8 U endopectinolíticas/mL. Se hicieron pruebas de filtración a los lotes de jugo tratado y se utilizaron controles para verificar que los resultados estuvieran dados únicamente por el tratamiento enzimático. También se hizo el análisis de la cantidad de azúcares reductores, azúcares totales, sólidos totales en solución, claridad y azúcares insolubles en alcohol, entre otros, y se encontró que la cantidad de azúcares reductores aumenta con el tratamiento enzimático lo que es congruente por la liberación de monosacáridos debida la actividad enzimática. De la misma forma se incrementaron los azúcares totales y los sólidos totales en solución, la claridad aumentó y los azúcares insolubles en alcohol disminuyeron.

Las pruebas de filtración muestran que el CE mejoró la filtración en un 46.61%, mientras que las preparaciones enzimáticas A, B y C mejoraron la filtración en un 54.24%, 37.29%, y 38.98 % respectivamente, lo que coloca al CE en el segundo lugar de mejoramiento en el rendimiento de extracción de jugo de naranja con respecto a las preparaciones enzimáticas comerciales y sin embargo todos los concentrados enzimáticos cumplieron con su función de aumentar el rendimiento de obtención de jugo de naranja.

Por los resultados obtenidos, el concentrado enzimático de *A. flavipes* FP-500 tiene potencial para ser utilizado en el procesamiento industrial del jugo de naranja.

CAPÍTULO 1. Introducción

Las sustancias pécticas se producen a partir de una sustancia insoluble en agua llamada protopectina (Venkatesh y Umesh-Kumar, 2006) y su presencia en el zumo de frutas origina problemas importantes durante el procesamiento industrial, debido a que por su escasa solubilidad, retienen el jugo y disminuyen el rendimiento de su extracción. (Yegres, et al. 2001).

Actualmente, la industria de alimentos utiliza preparaciones enzimáticas de pectinasas, un grupo heterogéneo de enzimas que degradan a la pectina, (Dhillon, et al. 2004) extensamente usadas por las ventajas que aportan al procesamiento, porque además de incrementar la extracción de jugo a partir de la materia prima, mejoran la eficiencia del proceso (Höhn, et al. 2005) facilitando el prensado y ayudando a la separación del precipitado floculado por sedimentación, filtración o centrifugación para la extracción de jugo clarificado (Pandey y Ramachandram, 2006), considerado un producto final más atractivo (Höhn, et al. 2005).

Industrialmente, se usan hongos del género *Aspergillus* para producir pectinasas tanto por fermentación en fase sólida como por fermentación sumergida y frecuentemente, las preparaciones comerciales contienen más de una enzima debido a que la degradación de los polisacáridos de origen vegetal, entre ellos la pectina, involucra una gran variedad de enzimas (Venkatesh y Umesh-Kumar, 2006). Las especies más usadas para la obtención de pectinasas son: *A. niger*, *A. carbonarius* y *A. foetidus* (Pandey y Ramachandram, 2006).

Para el género *Aspergillus*, la producción de pectinasas extracelulares por FS está inducida por la presencia de material péctico en la composición del medio de cultivo (Venkatesh y Umesh-Kumar, 2006), e influye sobre la diversidad y cantidad de enzimas pécticas, sabiendo además que la producción de pectinasas es inducible y no constitutiva (Arroyo, 2002). Por ello, los inductores que se añaden a los medios de cultivo incluyen fuentes ricas en pectina como cáscara de cítricos, pulpa de remolacha y de manzana (Venkatesh y Umesh-Kumar, 2006).

Siendo México un país rico en productos agrícolas, es importante aprovechar los subproductos remanentes de la industria, desarrollando bioprocesos orientados al aprovechamiento integral de dichos recursos, disminuyendo el impacto en el ambiente por el desecho de residuos provenientes de estas fuentes mediante su uso para la obtención de subproductos o como sustrato para la obtención de enzimas con aplicaciones industriales.

El presente trabajo realiza una evaluación del tipo de enzimas presentes en un CE de *A. flavipes* y tres preparaciones enzimáticas comerciales para determinar si existe la presencia de la actividad de enzimas pectinolíticas y otras enzimas involucradas en la degradación de la pared celular y por tanto, en el aumento del rendimiento de la filtración del jugo de naranja.

Se determinaron las condiciones de mayor producción de enzimas pectinolíticas a partir de *A. flavipes* usando cáscara de limón deshidratada como fuente de carbono compleja, rica en pectina.

Posteriormente, se caracterizaron tanto el CE de *A. flavipes* como las 3 preparaciones enzimáticas comerciales en cuanto a los niveles de producción de exopectinasas, endopectinasas, xilanasas, celulasas, y las pectin y pectatoliasas.

Una vez identificadas las actividades enzimáticas de mayor importancia de los concentrados enzimáticos, se corrieron geles SDS-PAGE y zimogramas de actividad pectinolítica y xilanolítica, para permitir la visualización idónea de las bandas de proteínas constitutivas del CE de *A. flavipes* y de las preparaciones enzimáticas comerciales, logrando la identificación de actividad pectinolítica y xilanolítica por la presencia de bandas características en los zimogramas de actividad.

Por último, se hicieron pruebas de filtración de jugo de naranja para observar el efecto del tratamiento enzimático con cada uno de los concentrados y se analizaron algunos parámetros del jugo para evaluar la actividad de las enzimas presentes y explicar cómo influyen dichas enzimas en el aumento del rendimiento de extracción del jugo de naranja.

CAPÍTULO 2. Generalidades

2.1 Los cítricos

Se le da el nombre de cítricos a todas las especies de los géneros *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus*. De estos tres géneros el que ha alcanzado mayor importancia comercial es el *Citrus* (Baraona y Sancho, 2000). Son árboles o arbustos de hoja perenne, excepto las del género *Poncirus* (Augustí, 2003), y su crecimiento aunque intermitente, presenta alternancia de un periodo de crecimiento con uno de reposo.

El género *Citrus* se subdivide en dos subgéneros: *Eucitrus* y *Papeda*; todas las especies cultivadas pertenecen al género *Eucitrus* ya que las especies de *Papeda* no presentan frutos comestibles (Baraona y Sancho, 2000).

El fruto de los cítricos es un hesperidio (baya comestible) con 1) una cáscara protectora (exocarpo) llamada flavedo de color verde-amarillo-anaranjado que presenta vesículas con aceites esenciales característicos, 2) albedo (mesocarpo) o parte blanca y pomposa que a veces es amarga y sus restos se utilizan para obtener subproductos, y 3) la pulpa (endocarpo) compuesta de varios segmentos o gajos divididos por una membrana (típicamente son diez u once) (Consejo Citrícola Mexicano, 2009), las semillas se ubican en el ángulo interior y cada segmento está lleno de pelos vesiculares, pedunculares, fusiformes llenos de jugo (Baraona y Sancho, 2000) que están unidos por un filamento vascular a las paredes dorsales de los segmentos (Augustí, 2003).

Los frutos cítricos de mayor interés comercial son los siguientes: *Citrus medica* (cidra), *Citrus limón* (limón agrio), *Citrus aurantifolia* (lima), *Citrus aurantium* (naranja agria), *Citrus sinensis* (naranja dulce), *Citrus reticulata* (mandarina) y *Citrus grandis* (toronja) (Baraona y Sancho, 2000). De entre los cítricos la naranja es el fruto más común y la más conocida en el ámbito mundial.

2.1.1. *Citrus sinensis* L. Osbeck : Naranja dulce

La naranja es un fruto cítrico comestible proveniente del sureste asiático (Consejo Citrícola Mexicano, 2000) perteneciente a la familia de las *Rutáceas*, que abarca a las especies de cítricos de mayor interés comercial (Augustí, 2003).

Existen muchas variedades de naranja alrededor del mundo, pero las más comunes son las naranjas redondas: “Valencia”, “Hamlin”, “Pineapple” y “Shamouti”; las naranjas de ombligo como las “Moro” o “Tarocco”; y las naranjas de baja acidez como las “Succari”. Dependiendo de la variedad cultivada, la forma de la naranja será redonda u oblonga y el fruto tendrá o no semillas. El color de la cáscara del fruto maduro cambiará de verde a naranja pálido o naranja

intenso. Una naranja de calidad debe estar madura, su cáscara debe ser firme, turgente, tener una textura suave, y su color naranja característico debe estar distribuido uniformemente a través de toda la superficie del fruto. (Do Nascimento, 2008).

La naranja es una especie subtropical y no resiste los fríos extremos. El factor limitante más importante para su producción es la temperatura mínima, ya que no tolera temperaturas inferiores a -3°C. Necesita temperaturas cálidas y humedad en el suelo durante el verano para la correcta maduración de los frutos (Consejo Citrícola Mexicano, 2009).

La fruta madura experimenta un incremento gradual de contenido de jugo, un declive en la acidez y sustancias pécticas, además de un incremento del contenido de sólidos solubles. (Do Nascimento, 2008) De hecho, dependiendo de la variedad, los criterios de madurez de la naranja están definidos por una coloración típica y por el contenido de jugo mínimo extraíble en una prensa manual que debe representar del 30 - 45% del peso de la fruta (FAO y OMS, 2007). En cambio, los atributos físicos y sensoriales, tales como la jugosidad, la calidad de la cáscara, el dulzor, y la textura son considerados como los más importantes al comprar naranjas.

El desarrollo de tecnología de producción citrícola aunado a las propiedades nutricionales de la naranja y a las cualidades de su sabor y aroma, hacen de esta una fruta muy apreciada, posicionándola en la preferencia de los consumidores a escala mundial.

2.1.1.1 Composición Físicoquímica de la Naranja

La composición de las frutas puede estar muy influenciada por la variedad y por su madurez, por lo que los datos de las tablas que se muestran a continuación deben usarse como una guía.

Tabla 1. Composición proximal de las naranjas de la variedad valencia.

Nutrimiento	Unidades	Valor por 100 g
Agua	g	86.34
Energía	kcal	49
Proteínas	g	1.04
Lípidos totales	g	0.30
Cenizas	g	0.42
Carbohidratos por diferencia	g	11.89
Fibra, dietética total	g	2.5

Adaptado de: (USDA, 2010).

Tabla 2. Composición química promedio de la porción comestible de la naranja.

Medición	Valor
Materia seca	14.3%
Azúcares totales	8.3%
Acidez titulable ^a	1.1
Fibra Dietética	1.6%
Pectina ^b	0.59%
Cenizas	0.5%
pH	3.3

^aSuma de ácidos: cítrico + málico + tartárico ^bLos resultados se expresan como pepectato de calcio
(Adaptado de: Berlitz, *et al.* 2009 y Sandhu y Minhas, 2006).

La mayor parte del agua de la fruta (75 - 90%) se encuentra en las vacuolas, dando turgencia (rigidez de textura) al tejido de la fruta (Lozano, 2006). Las tablas 1 y 2 muestran que el contenido de materia seca de los cítricos está entre el 10 y 20%. La mayor proporción de los componentes está dada por los azúcares, polisacáridos y ácidos orgánicos, mientras que los compuestos nitrogenados y los lípidos están presentes en cantidades menores. Los constituyentes en menor proporción incluyen a los pigmentos, a los compuestos que dan el aroma que son muy importantes para la calidad organoléptica, y a las vitaminas y minerales de gran importancia nutricional (Berlitz, *et al.* 2009).

Los betacarotenos y algunos carotenoides, así como los precursores de la vitamina A están presentes en las frutas de color amarillo-naranja y es bien conocido que los cítricos son excelentes fuentes de vitamina C (Lozano, 2006). Dependiendo de la variedad cultivada, las condiciones de cultivo y las condiciones de manipulación de postcosecha, las naranjas pueden tener entre 31 - 79 mg de vitamina C y 71 microgramos de betacaroteno por cada 100 g de fruta fresca (Do Nascimento, 2008).

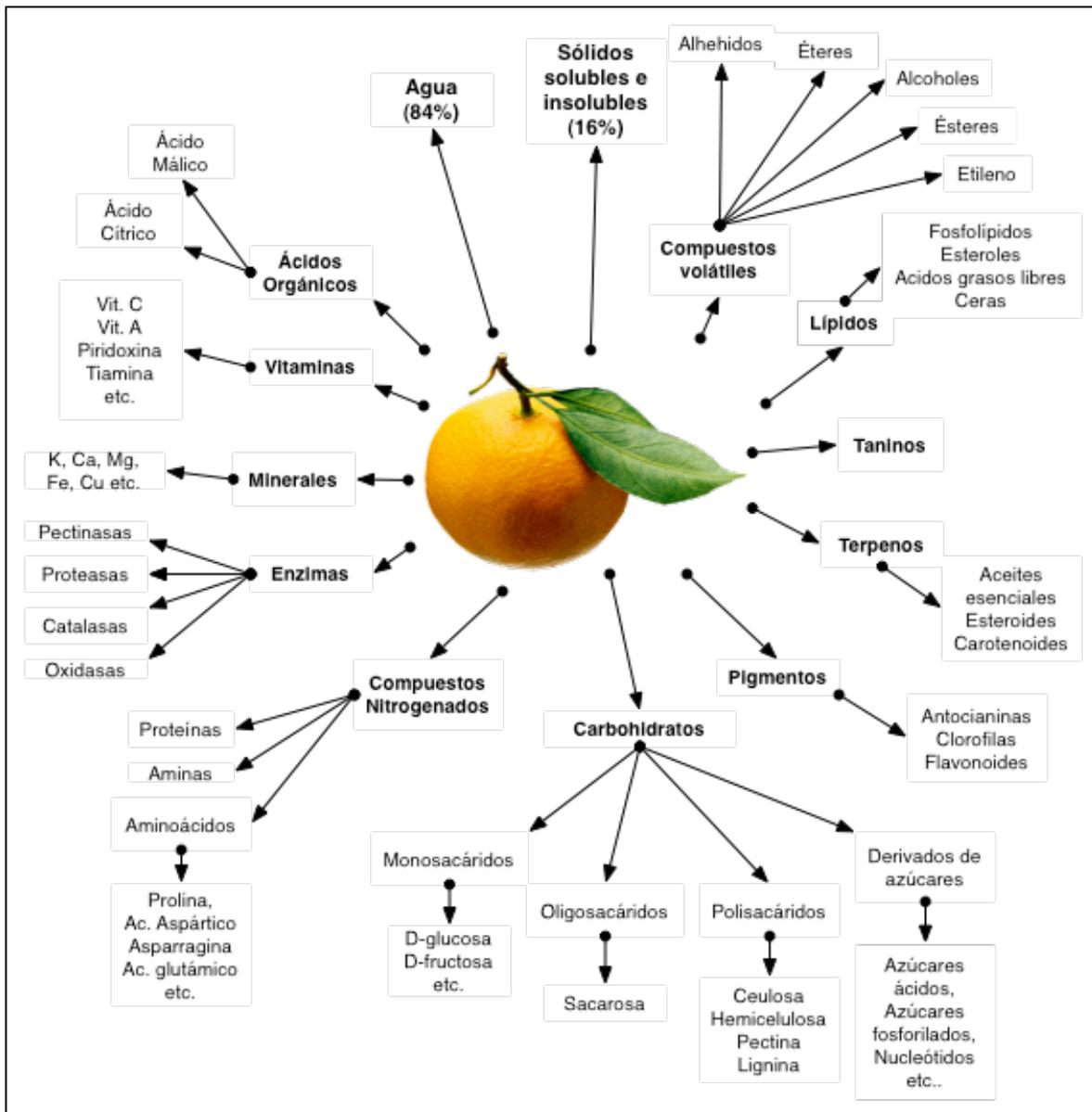


Figura 1. Representación esquemática simplificada de los componentes principales de las frutas (Adaptado de: Lozano, 2006).

2.1.1.2 Producción de naranja en México

México es el quinto productor de cítricos en el mundo. Tiene una extensión de 520 mil hectáreas establecidas en 23 estados del país, en los que se producen, aproximadamente, 6.7 millones de toneladas anuales con un valor superior a los 8,050 millones de pesos (SAGARPA, 2009).

La citricultura mexicana se encuentra concentrada en la región Golfo-Norte del país, particularmente en lo referente a la naranja (Consejo Citrícola Mexicano, 2009). Es el tercer cultivo perenne de mayor importancia por su superficie cultivada después del café y de la caña de azúcar y se obtiene en su mayor parte (cerca del 70%) en Veracruz, San Luis Potosí y Tamaulipas (INEGI, 2007), y como se puede observar en la Figura 2, es el cuarto producto de mayor producción en México.

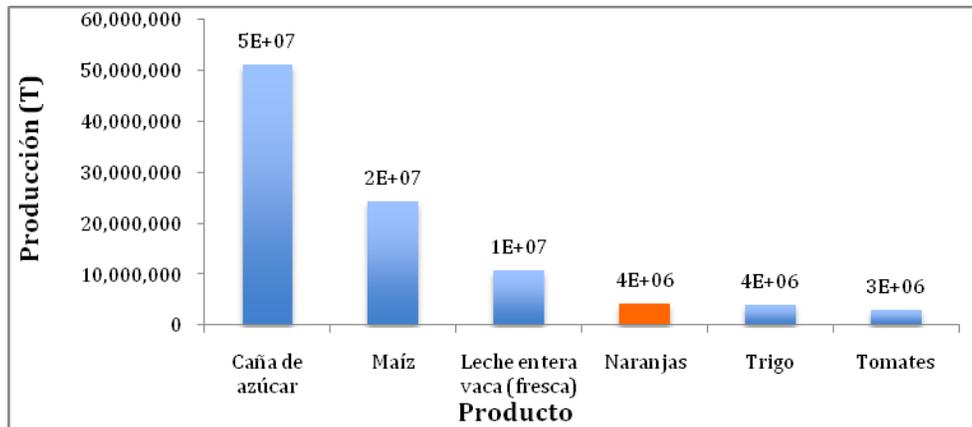


Figura 2. Productos de mayor producción en México en el 2008 (Adaptado de: FAO, 2008)

La naranja “Valencia” es una de las variedades dulces más apreciada comercialmente para la extracción de jugo porque produce un jugo de calidad muy superior al de otras naranjas. En el año 2007 representó el tercer cultivo de mayor importancia en el estado de Veracruz (Consejo Citrícola Mexicano, 2009).

2.1.1.3 Consumo de naranja en México

En México, el consumo per cápita de la naranja por día es de 101.7 g, colocándose entre los 20 países de mayor consumo en el mundo.

El 80% de la producción de naranja obtenida se canaliza al mercado de fruta fresca debido a que el mercado mexicano consume la naranja principalmente para extraer el jugo en casa, lo que causa una depresión en los precios. Aunado a esto, la sobreoferta estacional de producción agravada por el dominio de la variedad “Valencia” y la concentración regional, permiten que siempre existan excedentes baratos que la industria suele utilizar y como la producción de México es casi univarietal por esta variedad, se asegura que el jugo mexicano

sea de buena calidad (Consejo Citrícola Mexicano, 2009).

El jugo es el líquido extraído de las células de frutas maduras (Lozano, 2006). Y representa una categoría creciente en el mercado de bebidas. En México, el consumo de jugo de frutas y bebidas funcionales aumenta de 6 a 7% cada año, cerca de 16 litros per cápita (Cano, 2006). El jugo de naranja es el jugo más popular con el 60% del jugo total consumido (Boylston, 2007), ya que está posicionado en la mayoría de los consumidores como un producto saludable y lo incorporan a la dieta diaria. Representó el 60% del volumen de ventas en el año 2008 dentro del segmento “100% jugo”, aunque las mezclas comienzan a ganar popularidad (Consejo Citrícola Mexicano, 2009).

2.1.2 El jugo de Naranja y su Proceso de Obtención

El jugo de frutas el producto líquido sin fermentar, pero fermentable obtenido al exprimir frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados, inclusive por tratamientos de superficie aplicados después de la cosecha, clarificado o no, y sometido al tratamiento adecuado que asegura su conservación en el envase. No debe contener corteza y semillas, ni materia extraña objetable. Dentro de las características sensoriales se debe cumplir con un color característico semejante al de la variedad empleada, olor característico a jugo de naranja, sabor característico, sin sabores extraños (Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, 2009).

El jugo está compuesto por agua, sólidos solubles (azúcares y ácidos orgánicos), compuestos del aroma y del flavor, vitaminas y minerales, sustancias pécticas, pigmentos y en un grado menor de proteínas y grasas. Los azúcares como la fructosa, glucosa y sacarosa combinados con ácidos orgánicos (siendo los más importantes el cítrico, el málico y el tartárico) le dan a la fruta su dulzor y acidez característicos (Lozano, 2006). La calidad y estabilidad de anaquel del jugo de naranja para la industria se evalúa como la razón entre los sólidos solubles (grados Brix) entre el nivel de acidez (Consejo Citrícola Mexicano, 2009), y entre más bajo sea el valor obtenido, el jugo será de mejor calidad.

El proceso de obtención de jugo inicia con la preparación de la fruta, que involucra el lavado, el secado y la selección. Posteriormente se hace la extracción del jugo.

Hay tres tipos principales de extractores: (Lozano, 2006)

(1) El extractor de jugo de cítricos de FMC Technologies, en el que el jugo se extrae de la fruta entera sin cortar a la fruta en mitades. El flujo de salida transporta el jugo de la cáscara, la parte central y la emulsión de aceite.

(2) El extractor de Brown, en el que la fruta se corta por la mitad. Los flujos de salida son el jugo de alto rendimiento y calidad, y el bagazo y la cáscara.

(3) La prensa rotatoria, en la que se corta la fruta por la mitad y el jugo extraído en cilindros rotatorios.

Más del 75% de procesadores del mundo utilizan la tecnología FMC, que funciona de la siguiente forma: cuando las copas superiores e inferiores comienzan a acercarse la una a la otra, las cuchillas superior e inferior cortan dos agujeros en la fruta (Fig. 3a). Mientras las copas superiores e inferiores siguen llegando juntas, se separa la cáscara del fruto (Fig. 3b). Las frutas peladas se mueven en el tubo de filtro en el que se separan de forma instantánea el jugo de las semillas y el resto de la fruta (Fig. 3c).

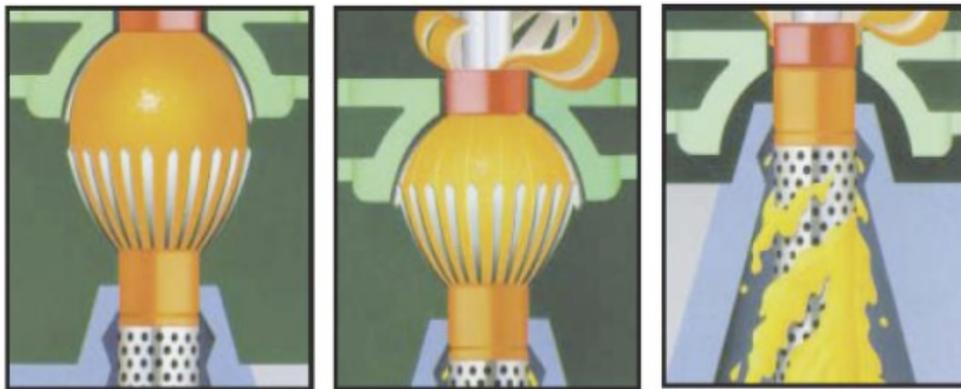


Figura 3. El extractor de jugo de cítricos FMC (Fuente: Lozano, 2006).

El producto obtenido por prensado es viscoso -debido a la pectina disuelta- y persistentemente turbio -por los fragmentos de paredes celulares en suspensión-. Cuando se añaden pectinasas, la viscosidad disminuye y las partículas pueden eliminarse fácilmente, dejándolas sedimentar, centrifugando el líquido o filtrándolo. Por otra parte, el tratamiento aumenta el rendimiento en jugo de la fruta prensada, pues al apretarla se forma una masa semigelificada que carece de microcanales por los que pueda fluir el zumo. Las pectinasas destruyen el gel y dan lugar a que el líquido corra libremente, mientras los sólidos remanentes, insolubles, forman una pulpa que es fácil de prensar. Los jugos de cítricos, deben llegar turbios al consumidor, por lo que se usan

las mismas enzimas para causar un efecto contrario al aclaramiento. Con el tiempo, las pectinas de alto peso molecular tienden a precipitar (Camperi, et al. 1996), a causa de la pectinesterasa endógena que produce ácido péctico que se agrega y flocula en presencia de Ca^{2+} presente en el jugo, pero si se trata de manera controlada con poligalacturonasa (Berlitz, et al. 2009) que reduce el peso molecular del ácido péctico se evita que se precipite en presencia de iones divalentes, estabilizado la turbidez del jugo (Camperi, et al. 1996).

Finalmente se preserva el jugo por pasteurización, congelación, almacenamiento en atmósfera modificada o concentración y secado.

Los concentrados de jugos de fruta son química y microbiológicamente más estables que los jugos, y los costos de almacenamiento y transporte son menores. Se pueden obtener por evaporación, congelamiento o por filtración a altas presiones. Sin embargo para poder hacer la concentración del jugo hasta un 36-48% de materia seca se debe degradar a la pectina para evitar altas viscosidades y estancamiento del gel (Berlitz, et al. 2009).

Por lo tanto, de forma general, la fruta puede ser convertida en jugo de acuerdo con el siguiente esquema: preparación → lavado → extracción → tratamiento enzimático → filtración → pasteurización/concentración → llenado/transporte.

2.2 Polisacáridos en la pared celular de las plantas

Las paredes celulares forman una matriz extracelular única y continua a través del cuerpo de la planta, y las paredes de muchas células forman el esqueleto de los tejidos vegetales (Schols y Voragen, 1996). La matriz celular está compuesta de varios tipos de polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y sustancias pécticas (Lozano, 2006), así como de proteínas y lignina en cantidades variables, organizados de tal manera que la pared celular es químicamente más estable y físicamente robusta, pudiéndose describir como un gel reforzado, de varios componentes. Las paredes celulares controlan el crecimiento celular y actúan como una barrera estructural a la invasión de microorganismos (Schols y Voragen, 1996).

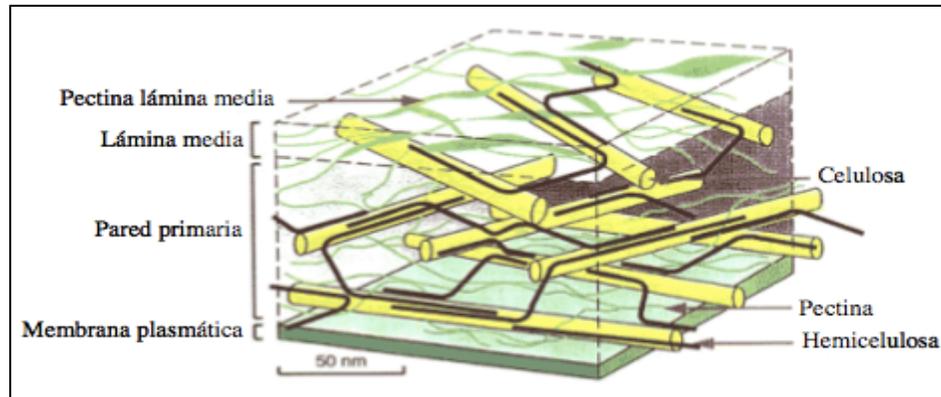


Figura 4. Estructura de la pared celular (Fuente: Soriano, 2004)

Los atributos de calidad de frutas y hortalizas frescas (ej. madurez, textura) y sus características de proceso en la fabricación de alimentos (jugos, néctares, purés, conservas) se determinan en gran medida por las paredes celulares de las materias primas vegetales, porque influyen en las características de extracción de los componentes importantes como la pectina, azúcares, aceites, proteínas, etc. El conocimiento detallado de los principales componentes que conforman las paredes celulares y de la ultra-estructura de la pared celular es importante para controlar y mejorar el procesamiento y la utilización de productos vegetales (Schols y Voragen, 1996).

2.2.1 Celulosa

La celulosa es el biopolímero más abundante sobre la tierra. Se produce principalmente por las plantas superiores. y forma parte de la pared celular primaria y secundaria. De hecho, la pared celular de las plantas es referida como pared celulósica aunque sólo representa el 20% de la pared primaria, pero su función es muy importante ya que todas las paredes celulares dependen de las microfibrillas de celulosa para mantener la fuerza de tensión (Albersheim, et al. 1996).

Químicamente es un homopolímero que consiste hasta de 1000 unidades de anhidroglucopiranosido unidos por enlaces β -(1,4). Sin embargo, su estado físico lo hace un sustrato muy difícil para las enzimas. Los polímeros de glucosa están empaquetados uno sobre el otro formando un material fibrilar altamente cristalino en el que las cadenas de celulosa individuales se mantienen juntas por puentes de hidrogeno. Las microfibrillas de celulosa

también contienen regiones amorfas y su cantidad depende de la fuente (Tenkanen, et al. 2003).

2.2.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa esta formada por una serie de matrices con entrecruzamientos de heteropolisacáridos. que incluyen una variedad de glucanos, mananos, arabinanos, galactanos, xilanos y lignina, un polifenol complejo (Biely, 2003). El xiloglucano y el arabinoxilano son dos hemicelulosas que forman parte de los componentes de la pared celular primaria, aunque su proporción varía de planta a planta. La tercer hemicelulosa es el glucomanano o galacturomanano (Albersheim, et al. 1996).

Las microfibrillas de la pared celular no pueden agregarse debido a que su superficie está cubierta por hemicelulosas que se unen estrechamente a la superficie de las microfibrillas de celulosa por medio de múltiples puentes de hidrógeno, creando una red, que le da muchas propiedades físicas y biológicas a la pared celular. (Albersheim, et al. 1996).

Después de la celulosa, el xilano es el polisacárido más abundante en la naturaleza. Forma parte de componentes de la pared celular de las plantas y es un polímero natural.

Muchas especies de hongos son capaces de degradar xilano ya que producen y secretan las enzimas xilanasas que degradan la hemicelulosa de la pared celular (Biely, 2003).

2.2.3 Pectinas y sustancias pécticas

Las pectinas o sustancias pécticas son nombres colectivos para un grupo de polisacáridos estrechamente asociados y de carácter aniónico (Schols y Voragen, 2003) que tienen en común una alta proporción de residuos de ácido galacturónico (Schols y Voragen, 1996). Están formadas por 150-1500 unidades de ácido galacturónico (Barret, 2005) unidas mediante enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ y los grupos carboxilo están parcialmente esterificados por grupos metoxilo o neutralizados por iones sodio, potasio o amonio. (Kashyap, et al. 2001).

Forman la segunda red de polisacáridos presente en la pared celular de las plantas coexistiendo con la red de celulosa-hemicelulosa y sus proporciones varían de lugar a lugar, incluso dentro de una misma célula (Albersheim, et al. 1996).

Son los componentes principales de la lámina media, una capa delgada de material adhesivo extracelular que se encuentra entre la pared celular primaria de células jóvenes adyacentes, manteniéndolas unidas (Alkorta, et al. 1998).

Las sustancias pécticas comprenden del 0.5 - 4.0% del peso seco de la planta (Singh, et al. 2005).

2.2.3.1 Estructura de la pectina (Modelos)

Después de muchos años de investigación, la estructura de la pectina aún está en bajo debate. Sin embargo existen dos modelos principales, los más aceptados, que describen su estructura: el modelo de las regiones lisas y ramificadas, y el modelo de la columna de ramnogalacturonano. (Gruben y Vries, 2009).

En el primer modelo, la pectina está conformada por regiones ramificadas muy complejas que están compuestas de ramnogalacturonano-I, formado por ácido galacturónico parcialmente metil-esterificado (Wainwright, 1995), con cadenas laterales de azúcares neutros (Gruben y Vries 2009) como ramnosa, arabinano, galactonano, xilosa y fucosa (Kashyap, et al. 2001) y ácidos urónicos (Wainwright, 1995), intercaladas con regiones lisas de homogalacturonano-I metil-esterificado (Gruben y Vries, 2009).

Existe otro modelo que coloca al homogalacturonano, formado por unidades lineales de ácido galacturónico, como una cadena lateral del ramnogalacturonano, al igual que las cadenas de azúcares neutros. La localización de xilogalacturonano con respecto de la del ramnogalacturonano-I es indistinta, pero puede considerarse como intercambiable con el homogalacturonano. La principal diferencia entre estos modelos es la relación del homogalacturonano con respecto al ramnogalacturonano-I (Gruben y Vries, 2009).

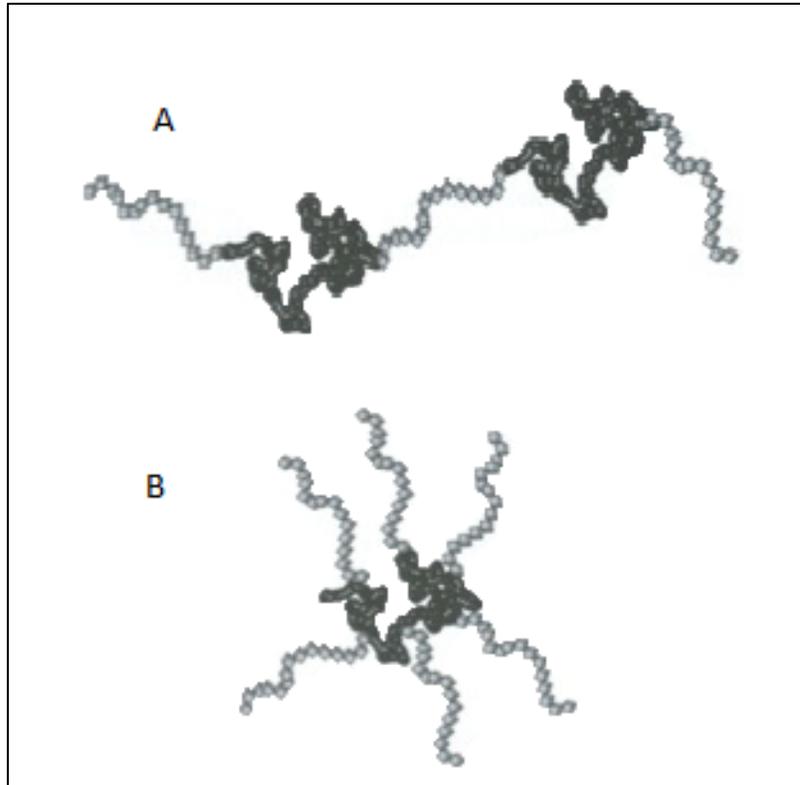


Figura 5. Representación esquemática de la pectina. A) En el modelo de las “regiones lisas y ramificadas” la estructura de sostén alterna el homogalacturonano y/o xilgalacturonano (gris claro) con el ramnogalacturonano (gris oscuro). Las cadenas laterales de azúcares neutros (que no están representadas en la figura) constituyen la parte ramificada de la molécula. B) En el modelo de la estructura de soporte del ramnogalacturonano-I, el ramnogalacturonano-I (gris oscuro) está decorado no sólo con cadenas laterales de azúcares neutros (que no están representadas en la figura), sino también de homogalacturonano y/o xilgalacturonano (gris claro). (Fuente: Ralet y Thibault, 2009).

La relación de ramnosa-ácido galacturónico de la pectina proveniente de la cáscara de cítricos es de 1:31, por lo que es muy evidente que existe un exceso de ácido galacturónico, y en consecuencia, debe haber más unidades de homogalacturonano por unidad de ramnogalacturonano-I. (Gruben y Vries, 2009).

La pectina actúa como inductor en la producción de enzimas pectinolíticas y, debido a que la cascara de cítricos contiene una cantidad apreciable de pectina puede ser usada como sustrato para la producción de enzimas pectinolíticas por los microorganismos (Dhillon, et al. 2004).

2.2.3.2 Propiedades y aplicaciones de las pectinas

Tradicionalmente, las sustancias pécticas han encontrado aplicaciones en la industria alimentaria al ser los componentes gelificantes más usados (Alkorta, et al. 1998) debido a su capacidad de formar geles en determinadas circunstancias, aumentan la viscosidad de las bebidas y también se aplican extensamente como estabilizadores en los productos lácteos ácidos. Los especialistas en alimentos están interesados en las pectinas porque se les considera como fibra dietética y se ha demostrado que pueden reducir los niveles de colesterol en sangre (Schols y Voragen, 1996).

En las células, aparte de su función como lubricante, o de agente “adhesivo” de la pared celular de plantas superiores, las sustancias pécticas también están involucradas en las interacciones de los hospederos de las plantas, en sus patógenos, y en la textura de frutas y vegetales durante su crecimiento, maduración y almacenamiento (Alkorta, et al. 1998).

Las pectinas se extraen a escala industrial de residuos convenientes de las plantas como de la pulpa y la cáscara de los cítricos (Schols y Voragen, 1996).

2.3 Los hongos y la biotecnología

Los hongos son los organismos más útiles en la biotecnología, por su importancia económica. Los hongos filamentosos son quimioheterótrofos estrictos, incapaces de fotosintetizar y por consiguiente, necesitan sustratos ricos en energía para alcanzar sus requerimientos de energía y biomasa. Producen una amplia variedad de enzimas extracelulares y pueden utilizar la mayor parte de los sustratos orgánicos que existen naturalmente. Los carbohidratos son las principales fuentes de carbono, siendo metabolizados para proporcionar energía y también actúan como precursores para síntesis de material celular (Wainwright, 1995).

En general, el uso comercial de los hongos en diversos sistemas alimentarios involucra la cosecha de las conidiosporas asexuales para ser usadas como inóculo lo que permite la adición de una cantidad precisa de esporas por unidad de volumen. Por razones físicas obvias, es más difícil utilizar el micelio como inóculo porque se complica la determinación directa de la cantidad de células (Venkatesh y Umesh-Kumar, 2006).

2.3.1 El género *Aspergillus*

Desde tiempos ancestrales las especies del género *Aspergillus* se han utilizado para la preparación de alimentos fermentados por su habilidad de producir ácidos orgánicos, por lo que no es de sorprenderse que juegue un papel tan importante en la biotecnología. Fueron de los primeros organismos fúngicos cultivados en medios artificiales, y que se estudiaron por sus propiedades bioquímicas, además de ser la especie de hongos más común en el medio ambiente del hombre (Samson, 1994).

Los miembros del género *Aspergillus* se producen en diversos hábitats. Los más comunes son saprofitos del suelo, pero también se encuentran en los productos alimenticios, en los alimentos almacenados y en la vegetación en descomposición, siendo el género dominante de contaminación, junto con *Penicillium*, por su capacidad de desarrollarse en condiciones de baja actividad de agua y altas temperaturas (Smith, 1994).

Frecuentemente secretan enzimas extracelulares que rompen las moléculas complejas en formas más simples que puedan ser absorbidas por la hifa (Hogg, 2005). Gracias al elevado número de enzimas que producen, son capaces de utilizar una gran variedad de sustancias para alimentarse. Desde luego, es difícil encontrar alguna sustancia que contenga materia orgánica y una baja humedad donde no puedan crecer (Díaz, 2001).

Al ser hongos filamentosos, los factores extrínsecos como el agua, la temperatura, el pH y la composición de gases del medio, tienen una gran influencia sobre su crecimiento y en la biosíntesis de micotoxinas, que está limitada a algunas especies. El estudio del efecto de los parámetros fisiobioquímicos puede proveer la metodología para prevenir su crecimiento y la producción de micotoxinas en los alimentos (Smith, 1994).

Las especies de *Aspergillus* spp. que producen micotoxinas de mayor preocupación para la salud y repercusión económica son: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, y *A. fumigatus*. Las micotoxinas producidas por estas y otras especies pueden ser tóxicas, mutagénicas, o carcinogénicas (Calvo, 2005).

Aspergillus es el género de hongos más estudiado con respecto a las enzimas pectinolíticas y a sus genes. Produce un amplio rango de actividades pectinolíticas y tiene múltiples genes que codifican para dichas actividades (Gruben y Vries, 2009).

Aunque las pectinasas son producidas tanto por bacterias, como por hongos filamentosos y levaduras, las enzimas producidas por el género *Aspergillus* son las más importantes (Venkatesh y Umesh-Kumar, 2006).

2.3.1.1 Morfología e Identificación

Típicamente las especies de *Aspergillus* producen el aspergillum, un conidióforo de hifa aseptada que termina en una vesícula, sobre la que nacen las células del conidióforo (fiálides y métulas). Las fiálides producen conidios en seco, formando diversas ornamentaciones con cadenas largas de pigmentaciones variadas. Adicionalmente, existen otras estructuras típicas como los esclerocios, los cuerpos fructíferos y las células de Hülle que pueden ser producidas por algunas especies del género *Aspergillus* (Samson, 1994). Se puede observar estas estructuras haciendo una preparación en fresco y observándolas por medio de un microscopio óptico.

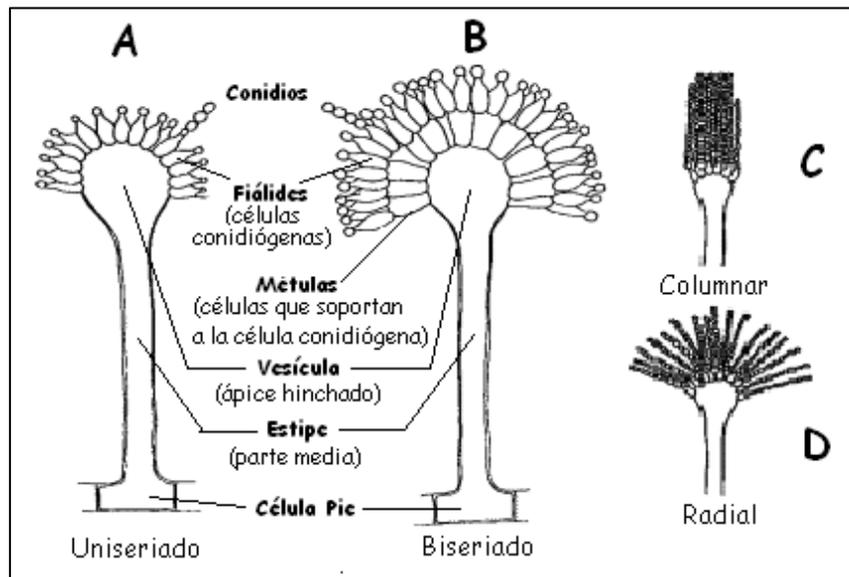


Figura 6. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus*. A-B: conidióforos; C-D: cabezas conidiales (Adaptado de: Abarca 2000).

Frecuentemente se utiliza el color y el diámetro de la colonia para la delimitación de las especies, así como las características del micelio vegetativo, el exudado (gotitas sobre la superficie de la colonia), y el pigmento soluble o reverso de la colonia (coloración del agar circundante a la colonia) (Samson, 1994). Aunque, además de las características de las colonias

y de la morfología convencionales, se ha utilizado el estudio de perfiles enzimáticos para algunas especies aisladas, y los perfiles de los metabolitos secundarios que han sido muy útiles para la sistemática de *Aspergillus*.

Sin embargo, para determinar la relación entre diversas especies del género *Aspergillus*, resolver ciertas disputas taxonómicas y para diferenciar algunas especies de características morfológicas muy similares, se realizan estudios por métodos moleculares y se aplican sistemas de inmunoensayos enzimáticos muy sensibles (Samson, 1994).

2.3.1.2 Características fisiológicas

Los ascomicetos (tanto hongos como levaduras) incluyen a los hongos que producen ascosporas. Los hongos de esta clase tienen paredes cruzadas completas en sus hifas y por ello no presentan flujo protoplásmico. Todos los ascomicetos producen conidioesporas características, que se producen en cadenas o racimos. La coloración característica (amarilla, café, verde) de las especies del género *Aspergillus* se debe a la coloración de las conidioesporas (Levin, 2006).

El criterio principal para la organización del género y especies de esta clase es, la coloración de la colonia, la observación del crecimiento en masa, junto con la apariencia microscópica y la vista tridimensional de las hifas y de las conidioesporas. La mayoría de los ascomicetos produce ascas con ascosporas internas, dentro de la estructura fructífera conocida como cleistotecio o como un peritecio (Levin, 2006).

2.3.1.3 *Aspergillus flavipes*

El grupo de los *Aspergillus flavipes* está conformado de una sola especie, sin variedades. No representa una de las especies más estudiadas, pero entre de las enzimas degradadoras de polisacáridos que producen las cepas de esta especie, se han reportado las α -galactosidasas y pectinasas, destacando las poligalacturonasas del tipo endo y exo, y las pectinliasas (Martínez, 2009).

La cepa *A. flavipes* FP-500 fue aislada por el Grupo de fisiología de hongos filamentosos de la FQ de la UNAM, a partir de tomates en descomposición. Es un hongo que forma colonias blancas (sin pigmento) de 2 - 3 cm de diámetro, con aspecto aterciopelado y se adhiere al agar formando estriaciones y relieves en el medio de cultivo.



Figura 7. Imagen de una colonia de *A. flavipes* FP-500 sembrada en medio PDA e incubada a 37°C por 5 días.

Diversos proyectos de investigación han demostrado que esta cepa produce xilanasas, α - y β -galactosidasas, así como diversos tipos de pectinasas, con productividades y características que las hacen competitivas con respecto a las obtenidas de otras especies del género *Aspergillus* (Martínez, 2009).

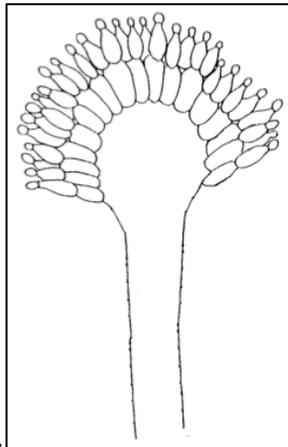


Fig. 8.

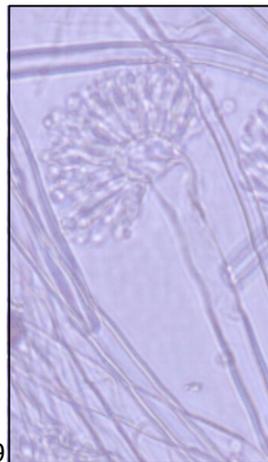


Fig.9

Figuras 8 y 9. 8) Morfología de una cabeza conidial de *A. flavipes*. 9) Micrografía de una cabeza conidial de *A. flavipes*

2.4 Enzimas usadas para la degradación de la pared celular

2.4.1 Pectinasas

Las sustancias pécticas son degradadas de forma natural por las enzimas pectinolíticas. La clasificación de las enzimas pectinolíticas está basada en su “ataque” sobre la estructura base de galacturonano de la molécula de pectina (Alkorta, et al. 1998).

2.4.1.1 Clasificación

En general, las enzimas que actúan sobre las sustancias pécticas se pueden dividir en dos categorías: las enzimas despolimerizantes y las desesterificantes. (Venkatesh y Umesh-Kumar, 2006).

Las enzimas despolimerizantes rompen los enlaces α -(1,4)-glicosídicos entre los monómeros de ácido galacturónico en las sustancias pécticas por hidrólisis (hidrolasas) o por β -eliminación (liasas) (Alkorta, et al. 1998), despolimerizando la cadena a fracciones más cortas hasta llegar al monómero de ácido poligalacturónico (Vasquez, et al. 2007).

Las hidrolasas han sido divididas en 4 grupos: Las endo- y exo- poligalacturonasas que actúan principalmente sobre los pectatos y las endo- y exo- polimetilgalacturonasas que actúan principalmente sobre la pectina (Alkorta, et al. 1998) Los prefijos endo- y exo- denotan un patrón de acción aleatorio o terminal, respectivamente.

Las enzimas desesterificantes, pectinesterasas son responsables de la hidrólisis de grupos éster-metílicos que inducen la formación de metanol y por ende, también se producen pectinas de menor metoxilo (Vasquez, et al. 2007).

Las pectinas saponificantes comúnmente referidas como pectinmetilesterasas, catalizan la desesterificación de los grupos metoxilo de la molécula de pectina haciéndolas susceptibles a la acción de enzimas hidrolíticas (Venkatesh y Umesh-Kumar, 2006).

Las pectinacetilesterasas remueven los grupos acetilo del O-2 y/o O-3 de los residuos del ácido galacturónico tanto en el homogalacturonano como en el ramnogalacturonano (Benen, et al. 2003)

Muchas pectinasas como las ramnogalacturonasas, arabinofurosidasas e hidrolasas del xilogalacturano han encontrado aplicaciones específicas en la industria de procesamiento de

alimentos debido a su habilidad de actuar sobre ciertas regiones de la pectina (Venkatesh y Umesh-Kumar, 2006).

En las frutas no maduras, la pectina existe en forma de protopectina, dándole a la fruta una estructura firme/dura. Durante la maduración, las protopectinas son metabolizadas en moléculas más pequeñas (Nip, 2006) por las protopectinasas, enzimas que solubilizan a la protopectina, es decir, liberan pectina polimerizada altamente soluble de la protopectina dándole a las frutas una textura más suave (Alkorta, et al. 1998). Están clasificadas en dos tipos, las de tipo A que reaccionan con la región de ácido poligalacturónico de la protopectina y las del tipo B que reaccionan con las cadenas de polisacárido que pueden estar unidas a la cadena de ácido galacturónico y a los constituyentes de la pared celular.

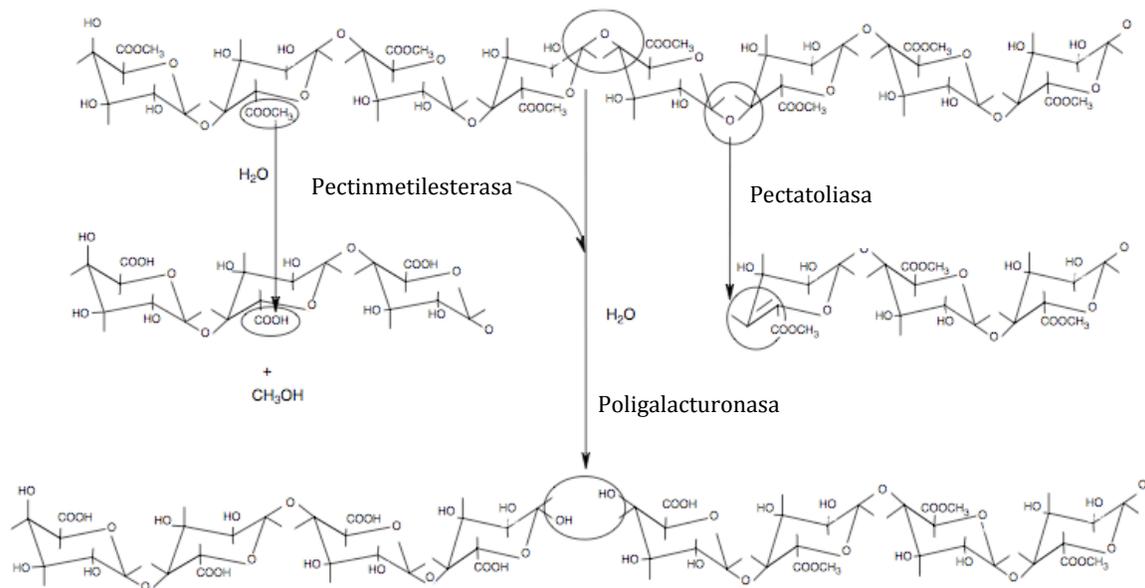


Figura 10. Estructura principal de la molécula de pectina y sitios de acción de las enzimas pectinolíticas (Fuente: Venkatesh y Umesh-Kumar, 2006).

2.4.1.2 Producción de Pectinasas por Fermentación Sumergida (FS)

La FS es la técnica más utilizada para producir una gran variedad de productos partir de una amplia gama de microorganismos disponibles.

La actividad de agua del medio es alta, haciéndola vulnerable a la contaminación si no se mantiene un ambiente aséptico adecuado. Si se utilizan altas concentraciones de sustrato se pueden presentar problemas reológicos. La transferencia de gases a la fase líquida es

usualmente un factor limitante, pero debido a una buena homogeneización, la limitación de la difusión de nutrientes no se considera en la FS (Levin, 2006).

El medio usado para la FS contiene una cantidad de ingredientes relativamente grande, se utilizan medios de cultivo sintéticos o medios basados en sustratos naturales complejos con una alta concentración de pectina como la pulpa de remolacha, cáscara de limón, pulpa de henequén, desechos de manzana, etc. (Díaz, 2001).

Los residuos agroindustriales tales como la pulpa de manzana, residuos de cítricos (cáscara de limón y de naranja), fibra de soya, bagazo de caña de azúcar, salvado de trigo, pulpa de café, entre otros, son usados como sustratos para la producción de enzimas pectinolíticas (Pandey y Ramachandram, 2006).

2.4.1.3 Pectinasas Comerciales

Las enzimas pécticas comerciales (pectinasas) y otras enzimas son ahora parte integral de la tecnología de jugos de frutas. Las preparaciones de pectinasas comerciales disponibles usadas en el procesamiento de frutas, a menudo contienen una mezcla de enzimas: pectinesterasas, poligalacturonasas, y pectinliasas (Lozano, 2006). Aunque por razones económicas obvias, es muy difícil encontrar información confiable acerca de la producción de enzimas pécticas (Alkorta, et al. 1998). Sin embargo, las preparaciones enzimáticas comerciales pueden tener actividades pécticas de PG, PL, PE y otras como las hemicelulasas, celulosas, proteasas y amilasas (Mutlu, et al. 1999).

2.4.1.4 Aplicaciones de las pectinasas

Las pectinasas están involucradas en la degradación de la pared celular. Por lo que estas enzimas proveen una buena alternativa al procesamiento químico. Sus mayores aplicaciones involucran a la industria de las bebidas debido a su habilidad de mejorar el prensado de las frutas y la clarificación de los jugos de frutas (Venkatesh y Umesh-Kumar, 2006).

En el tratamiento enzimático de clarificación de jugos, se lleva a cabo la despectinización para poder concentrar el jugo sin interferencia de agentes gelificantes y sin desarrollo de turbidez (Lozano, 2006). La pectina forma un recubrimiento sobre las proteínas en suspensión. En un ambiente ácido, las moléculas tienen una carga negativa lo que causa que se repelan unas a otras. Las enzimas pectinolíticas degradan a la pectina y exponen parte de las proteínas que

posiblemente están cargadas positivamente. Mientras la repulsión electrostática de las partículas que causan la turbidez disminuye, se van agrupando y, eventualmente se sedimentan (Lozano, 2006) y así es más fácil producir concentrados de alta densidad.

El tratamiento enzimático de la pulpa de frutas blandas permite una mejor liberación del jugo y también se utiliza para incrementar el rendimiento de obtención de aceite, en el olivo y en el coco.

En la maceración de frutas y vegetales se utilizan para obtener las bases de néctar y alimentos para bebé (Lozano, 2006).

En la licuefacción de frutas y vegetales se usa para obtener productos con un alto contenido de sólidos solubles. Se aplasta el material para obtener una pulpa que es tratada con una combinación de pectinasas y celulasas, después de cierto tiempo de incubación, el material se convierte en un líquido y el jugo se recupera por decantación. Después de obtener un jugo claro por ultrafiltración (Beldman, et al. 1996).

Otras aplicaciones en las frutas cítricas son la preparación de los agentes de enturbiamiento a partir de la cáscara de los cítricos, la limpieza de cáscaras antes de su uso en la producción de dulces y mermeladas, la recuperación del aceite de la cáscara de los cítricos, y la despectinización durante el lavado de la pulpa de cítricos. (Lozano, 2006).

También se utilizan para la producción de pectina de bajo metoxilo para alimentos de diabéticos y para la eliminación de la “turbidez” de los vinos.

2.4.2 Hemicelulasas

La degradación de la hemicelulosa se lleva a cabo por hidrolasas tanto por vía endo como por vía exo. La especificidad del sustrato dependerá del tipo de monosacáridos que constituyan las uniones y el tipo de enlace. Estas enzimas están presentes en las plantas y en los microorganismos, y actúan frecuentemente junto con celulasas (Berlitz, et al. 2009). Como el xilano es el constituyente más importante de las hemicelulosas, nos referiremos a las enzimas hemicelulasas como a las enzimas xilanolíticas.

Fisiológicamente las enzimas xilanolíticas están presentes en las plantas participando en el proceso de extensión de la pared celular, división celular y germinación principalmente. Además son componentes importantes de los sistemas enzimáticos para la licuefacción de

frutas y vegetales, y para la clarificación de jugos, aunque también tienen aplicaciones en otras industrias como en la del papel (Biely, 2003).

El sistema de degradación xilanolítico requiere de la acción de muchas enzimas que en conjunto se llaman sistema xilanolítico, y entre más compleja sea la estructura del xilano se requerirá de una mayor cantidad de enzimas para degradarlo. La enzima crucial para la despolimerización del xilano es la endo- β -1,4-xilanasa que ataca la cadena principal más rápidamente en regiones no sustituidas generando oligosacáridos ramificados y esterificados. Los sustituyentes de la cadena principal son liberados por glicosidasas o esterasas como las α -L-arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas. La β -xilosidasa ataca los oligosacáridos de xilosa de los extremos no reductores liberando xilosa. Asimismo, las hidrolasas que remueven las cadenas laterales de xilano se denominan enzimas xilanolíticas accesorias (Biely, 2003).

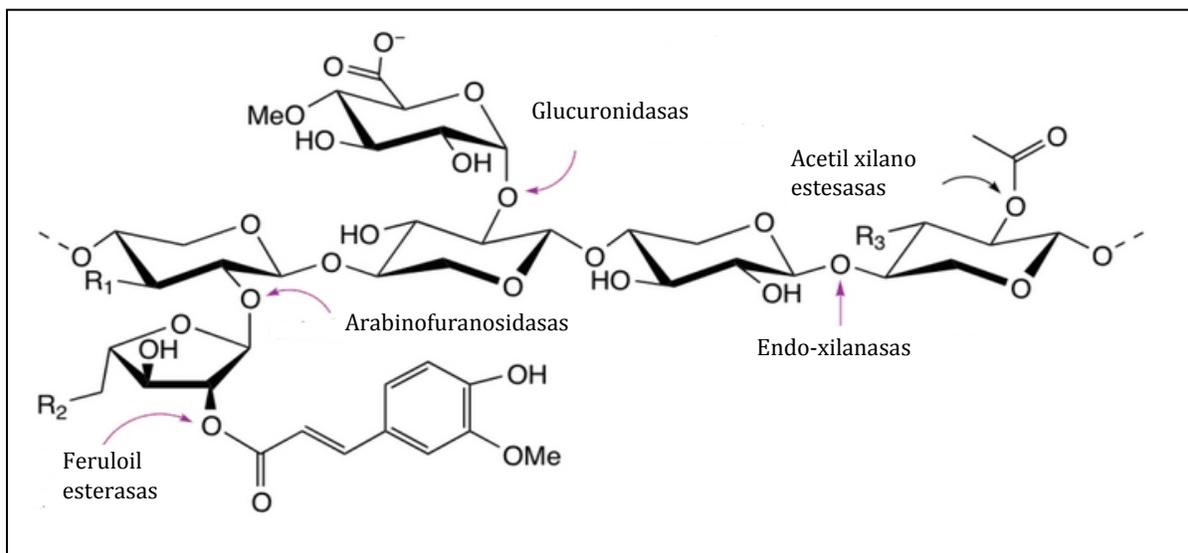


Figura 11. Estructura hipotética del xilano y las enzimas requeridas para su completa hidrólisis (Fuente: DeBoy, et al. 2003).

2.4.3 Celulasas

Los animales no poseen enzimas digestivas capaces de degradar la celulosa. Sin embargo, muchos microorganismos, incluyendo a los hongos filamentosos son capaces de hidrolizar la celulosa a oligosacáridos y eventualmente a glucosa, que pueden usar como fuente de carbono. Para lograr la degradación de la celulosa cristalina insoluble en agua, los microorganismos producen una mezcla muy compleja de enzimas que actúan sinérgicamente.

Todas las celulasas actúan en el mismo enlace β -1,4 entre dos unidades de glucosa anhidra, pero difieren en el sitio de ataque a la cadena de celulosa. Las endoglucanasas actúan en medio de la cadena de celulosa, mientras que las exoglucanasas actúan en cualquiera de los extremos de la cadena de celulosa. De cualquier forma esta clasificación no es muy satisfactoria porque algunas exoglucanasas poseen actividad endoglucanasa (Tenkanen, et al. 2003).

La adición de celulasas se utiliza para licuar por completo el tejido de las plantas haciendo posible el filtrado del jugo sin necesidad de aplicar presión sobre la pulpa (Lozano, 2006).

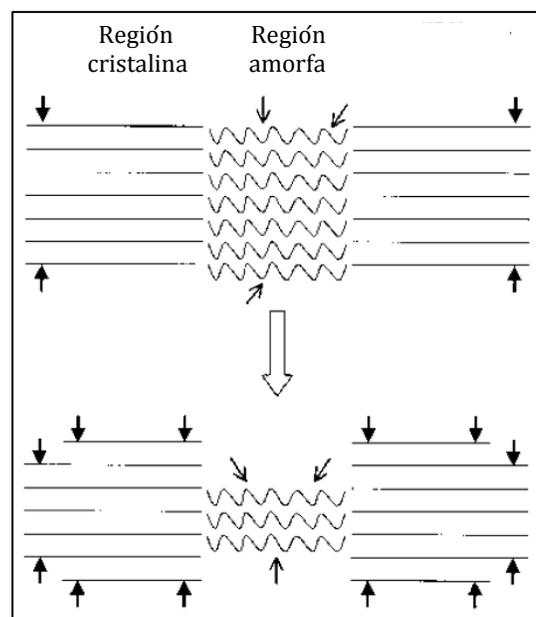


Figura 12. Representación hipotética de la degradación de la celulosa (Fuente: Tenkanen, et al. 2003)

2.4.4 Importancia de las enzimas en la industria

Las enzimas de origen microbiano presentan aplicación industrial debido a su elevada eficiencia catalítica, a que su uso no daña el medio ambiente y a su alta rentabilidad económica. Por este motivo existe un renovado interés en sustituir los procesos productivos convencionales por procesos biotecnológicos en los que están involucrados microorganismos y enzimas microbianas tales como pectinasas, xilanasas, celulasas, mananasas, amilasas, lacasas y ligninasas; los cuales no sólo proporcionan alternativas económicas viables, sino que además permiten el desarrollo de tecnologías respetuosas con el medio ambiente (Soriano, 2004).

Aspergillus muestra algunas ventajas para la producción industrial de enzimas: tiene un alto nivel de producción, presenta buenas propiedades para el cultivo, lo que posibilita la producción a gran escala, sus productos son generalmente considerados como GRAS (Generally Regarded As Safe), lo que permite su aplicación en la industria de alimentos (Contreras, 2003). *Aspergillus* sp. también produce enzimas como lipasas, pentosanasas, proteasas, β -glucanasas, glucoamilasas y glucosa oxidasa (Wainwright, 1995).

2.4.5 Importancia de las enzimas en el mercado mundial

Se sabe que la venta de las enzimas industriales representó un billón de dólares en el mercado mundial en 1995, de los cuales, 75 millones fueron generados por pectinasas, y para 2005 se estimó que el mercado mundial de enzimas industriales alcanzaría los 1.7 – 2 billones de dólares (Kasyap, et al. 2000) dejando muy clara la creciente aplicación e importancia la de la producción enzimas para el sector industrial.

Este desarrollo ha disparado la creación de leyes y regulaciones para asegurar tanto la seguridad del consumidor como el comercio justo. (Praaning, 2003).

CAPÍTULO 3. Justificación

Debido a la importancia del procesamiento de frutas para su preservación y posterior consumo, y a la necesidad de la industria por hacer más eficientes los procesos, se utilizan enzimas que permiten obtener mayores rendimientos durante la extracción de jugos y néctares, y para mejorar sus características físicas, químicas y organolépticas.

Las pectinasas son ampliamente usadas para hidrolizar a la pectina, así como flocular y sedimentar las sustancias que causan la turbidez, mejorando la filtración y estabilidad de los zumos y de sus concentrados. Su aplicación es de tal importancia, que continuamente se estudian y mejoran los microorganismos responsables de su producción, obteniendo actividades enzimáticas cada vez más altas y mezclas más específicas, lo que aumenta el valor comercial de las preparaciones enzimáticas disponibles en el mercado.

A. flavipes ha demostrado tener una gran capacidad de producción de enzimas pectinolíticas, convirtiéndose en un productor potencial, que con estudios y mejoras futuras podría adquirir importancia en la industria de producción de enzimas de gran valor económico en la industria de procesamiento de jugos y frutas.

CAPÍTULO 4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar efecto de las pectinasas producidas por *A. flavipes* FP-500 en el tratamiento de jugo de naranja y comparación con tres preparaciones enzimáticas comerciales.

4.2 Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto del pH sobre la producción de pectinasas producidas por *A. flavipes*.
- Evaluar los niveles de producción de exo- y endo-pectinasas, xilanasas, pectinliasas, y carboximetilcelulasas producidos por *A. flavipes*.
- Comparación de los perfiles electroforéticos del CE de *A. flavipes* con el de las preparaciones enzimáticas comerciales.
- Comparar el efecto producido por el tratamiento de jugo de naranja con pectinasas producidas por *A. flavipes* y con preparaciones enzimáticas comerciales usadas en la industria de procesamiento de cítricos.

CAPÍTULO 5. Materiales y métodos

5.1 Microorganismo

Se usó la cepa de *Aspergillus flavipes* FP-500 y se incubó en agar dextrosa y papa (PDA) adicionado con agar bacteriológico al 0.5% (p/v) a 37°C por 96 horas, resemebrando cada tres semanas por picadura y extensión masiva para su conservación y posteriormente se mantuvo en refrigeración a 4°C.

5.1.1 Preparación del inóculo: suspensión de esporas

Para la preparación de la suspensión de esporas se utilizaron cajas de medio PDA resemebradas con el microorganismo *A. flavipes* FP-500, incubadas a 37°C por 96 horas. Se usó una solución isotónica al 0.9% de NaCl (p/v) con Tween 80 al 0.05% (v/v) para liberar mecánicamente las esporas mediante un raspado superficial de las colonias con un asa Drigalsky estéril. La suspensión obtenida se centrifugó a 500 rpm, descartando el sobrenadante y posteriormente se adicionó un volumen de solución salina-Tween 80 equivalente a desechado y se agitó para resuspender el botón de esporas. Se hicieron dos lavados más, centrifugando y resuspendiendo en nueva solución salina-tween 80, todo en condiciones asépticas. Una vez resuspendido el botón tras del tercer lavado, se tomó una alícuota, se hizo una dilución 1/100 y se determinó la concentración de esporas de la suspensión, contando al microscopio el número de esporas en una cámara de Neubauer.

5.2 Composición del medio y condiciones de cultivo

Se usó un medio de cultivo líquido compuesto por medio basal (ver anexo A) con cáscara de limón al 2% (p/v) como fuente de carbono compleja, ajustando el pH a 3.0 antes de esterilizar a 121°C, 15 psi por 20 min.

Se hizo una fermentación en lote de 10 matraces de 500 mL con 100 mL medio de cultivo líquido (medio basal con cáscara de limón al 2% (p/v)), inoculando para una concentración final de 1×10^6 [esporas/mL de medio de cultivo], e incubando a temperatura de 37°C con agitación de movimiento recíprocante a 200 rpm.

5.3 Obtención y concentración del filtrado libre de células

Una vez finalizado el tiempo de la fermentación, se filtró el caldo de cada uno de los matraces

por separado a través de algodón separando así la biomasa y obteniendo el filtrado libre de células.

Se ultrafiltraron 805 mL del FLC (provenientes de los 10 matraces de la FS) en una celda de ultrafiltración de 400 mL usando una membrana de 10,000Da, con una presión de 40 psi obteniendo 37.5 mL de concentrado enzimático libre de células.

5.4 Métodos de análisis: Caracterización de los concentrados enzimáticos

5.4.1 Cuantificación de proteína por el método de Bradford

En tubos de ensaye de 13X100 mm se agregaron 50 μ L de muestra, 150 μ L de agua destilada y 1mL de reactivo de Bradford. Después de agitar en el vórtex se hicieron las lecturas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 495 nm, calculando la cantidad de proteína total por medio de una curva patrón de 0 - 250 μ g/mL de albúmina bovina sérica.

5.4.2 Cuantificación de actividad exo-pectinasa

Se preparó la mezcla de reacción en tubos de 16x150 mm con 0.5 mL de solución de pectina de frutas cítricas al 1% p/v, 0.4 mL de solución amortiguadora de acetatos 100 mM (pH=5) y 100 μ L de FLC. La reacción enzimática se inició adicionando los 100 μ L de FLC e incubando durante 20 min a una temperatura de 45°C. Una vez transcurrido el tiempo se detuvo la reacción adicionando 2 mL de reactivo 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Se incubó en un baño de agua a ebullición por 5 min y se añadieron 5 mL de agua destilada. Se centrifugaron las muestras a 500 rpm durante 5 min. Se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 575 nm. En el caso de los blancos se incubaron sin muestra y al término de los 20 minutos se incubación se añadieron primero los 2 mL de DNS y después los 100 μ L de FLC. Se determinó la actividad exo-pectinolítica partir de la cuantificación de grupos reductores liberados por la actividad enzimática empleando una curva patrón de 0 - 1000 μ g de ácido galacturónico. La actividad se expresa en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima que produce un micromol de ácido D-galacturónico en dichas condiciones.

5.4.3 Ensayo viscosimétrico para medir actividad endo-pectinasa

Se instaló un viscosímetro tipo Cannon-Fenske No. 200 limpio y seco en un baño de agua a

30°C en posición vertical. Posteriormente se pipetearon 10 mL de sustrato en el viscosímetro y se mantuvieron a 30°C durante 5 min. A tiempo cero se adicionaron 0.5 mL de solución de enzima en el matraz de sustrato, oprimiendo el cronómetro (1) y se mezcló vigorosamente. De inmediato se pipeteó la mezcla de reacción. Se aplicó succión por el tubo conectado al capilar del viscosímetro, hasta que la solución quedó arriba del menisco superior. Se midió el tiempo de eflujo de la solución al atravesar los meniscos con el cronómetro (2). Al mismo tiempo se registró la lectura en el cronómetro para el tiempo de reacción. Se succionó inmediatamente la mezcla de reacción sobre el menisco superior y se midió nuevamente el tiempo que tarda la solución en atravesar los meniscos con el cronómetro (2). Se registró de nuevo la lectura en el cronómetro (1) al pasar por el menisco superior. Se repitió la operación hasta obtener 4 determinaciones del tiempo de reacción.

Se preparó un blanco de sustrato pipeteando 0.5 mL de agua destilada en el matraz de sustrato y se tomaron las mismas mediciones que cuando se agregó la solución enzimática, calculando el promedio de los cuatro valores obtenidos.

También se preparó un blanco de agua pipeteando 10.5 mL de agua destilada equilibrada a 30°C y se midió el tiempo de eflujo cuatro veces, calculando el promedio de los valores obtenidos.

Se calculó la fluidez relativa (Fr) y el tiempo de reacción (Tn) en minutos para cada tiempo de reacción, así como las pendientes entre las 4 determinaciones y se hizo un promedio que dio como resultado las UFR/min. Las U/mL se calcularon multiplicando el dato anterior por un factor de 20.

5.4.4 Cuantificación de actividad xilanólítica

Se determinó a partir de la cuantificación de azúcares por la técnica DNS empleando una curva patrón de 0 - 1000 µg xilosa. La mezcla de reacción se preparó con 0.5 mL de solución de xilano de abedul al 1% (p/v), 0.4 mL de solución amortiguadora de acetatos 100 mM pH=5.0 y 1 mL del FLC. La reacción enzimática se inició adicionando 100 µL de FLC e incubando durante 20 min a una temperatura de 50°C. Una vez transcurrido el tiempo se detuvo la reacción adicionando 1 mL de reactivo DNS. Se incubó en baño de agua a ebullición por 5 min y se añadieron 5 mL de agua destilada. Se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 575 nm en el espectrofotómetro. En el caso de los blancos, se incubaron sin

muestra y al término de los 20 minutos de incubación se añadió primero 1 mL de DNS y después los 100 μ L del FLC. Se definió como una unidad enzimática xilanolítica (U) la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de un micromol de xilosa 20 minutos de las condiciones del ensayo.

5.4.5 Cuantificación de actividad de carboximetilcelulasas

Se determinó a partir de la cuantificación de azúcares reductores por la técnica DNS empleando una curva patrón de 0 - 1000 μ g de D-glucosa. La mezcla de reacción se preparó con 0.5 mL de solución de carboximetilcelulosa al 1% (p/v), 0.4 mL de solución amortiguadora de acetatos 100 mM pH=5.0 y 1 mL de FLC libre de células. La reacción enzimática se inició adicionando 100 μ L de FLC e incubando durante 1 h a una temperatura de 50°C. Una vez transcurrido el tiempo se detuvo la reacción adicionando 1 mL de reactivo DNS. Se incubó en baño de agua a ebullición por 5 min y se añadieron 5 mL de agua destilada. Se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 575 nm en el espectrofotómetro. En el caso de los blancos, se incubaron sin muestra y al término de la incubación se añadió primero 1 mL de DNS y después los 100 μ L de FLC. Se definió como una unidad enzimática de carboximetilcelulasas (U) a la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de un micromol de CMC en 1 hora de las condiciones del ensayo.

5.4.6 Cuantificación de actividad de pectin y pectato liasas

Agregar a un tubo de ensayo, 0.5 mL de solución amortiguadora tris-acetatos 100 mM pH=9.5 con CaCl_2 24 mM y 0.5 mL de solución de pectina 1% (p/v) pH=5.0, el pH de la mezcla de reacción será 8.8. Atemperar por 5 minutos a 40°C y enseguida añadir 200 μ L del FLC libre de células, mantener la reacción en un baño de agua a 40°C durante 1h. Inmediatamente transcurrido el tiempo detener la reacción con 100 μ L de HCl 1N. Posteriormente hacer una dilución 1/10, tomando 200 μ L de la mezcla de reacción y 1.8 mL de solución HCl 10 mM, la cual se lee a una longitud de onda de 235 nm en el espectrómetro. Con las absorbancias obtenidas se determinan las unidades enzimáticas (U), como la cantidad de enzima necesaria para formar un micromol de producto por minuto de reacción. En el caso de los blancos, el filtrado enzimático se agregó después de transcurrida la hora de incubación, todo lo demás se hizo de la misma manera que para la muestra.

5.4.7 Obtención de geles de SDS-PAGE y zimogramas

La preparación de los geles de poliacrilamida con SDS de 8 x 8 cm se realizó en condiciones desnaturalizantes. La electroforesis se corrió con 5 µL de muestra estandarizadas a 50 µg de proteína para las preparaciones enzimáticas comerciales y con 101 µg de proteína para el CE de *A. flavipes*. Se corrió a corriente constante (15 mA por gel) por 66 min a través de la unidad de geles verticales de 1.5 mm Mighty Small SE-245 (Hoefer Sci Ins USA). Después de ese tiempo, los geles de proteína (con el marcador de peso molecular) se sumergieron en una disolución de azul de coomasie R-2050 al 0.025%, metanol al 40% v/v y ácido acético al 7% v/v durante 30 min para teñir la proteína y se destiñeron con una solución de ácido acético al 10% (v/v). En cambio, los zimogramas de actividad no se tiñeron con azul de coomasie sino que se incubaron a 37°C en 100 mL de buffer de renaturalización sin agitación durante 1h. Se decantó el buffer y se adicionaron 100 mL de solución amortiguadora de acetatos 100 mM pH=5 incubándose a 37°C por 30 min. Nuevamente se decantó el buffer y el zimograma de actividad pectinolítica se sumergió en 100 mL de solución de pectina 1% (p/v) en buffer de acetatos 100 mM pH=5 mientras que el zimograma de actividad xilanolítica se sumergió en 100 mL de solución de xilano de abedul 1% (p/v) en buffer de acetatos 100 mM pH=5, ambos se incubaron a 37°C durante 30 minutos más. Se decantó el buffer, se eliminó el exceso de pectina o de xilano con agua destilada y se incubaron los geles por separado en 40 mL de etanol al 96% a temperatura ambiente durante 15 min. Se retiró el etanol y se lavó el exceso con agua destilada. Se rehidrataron en 100 mL de agua destilada durante 10-15 min. Para la tinción se sumergió el gel de actividad pectinolítica en 100 mL de una solución de rojo de rutenio durante 20 min y después se lavó en agua destilada dejándolo en agitación suave para facilitar el lavado del colorante haciendo cambios de agua periódicamente hasta que las bandas fueron visibles. Para el zimograma de actividad xilanolítica se sumergió el gel en 100 mL de solución de rojo congo durante 20 min y después se decantó la solución de rojo congo y se le adicionaron 100 mL de solución NaCl 1M durante 15 min aprox. ya que las bandas se hicieron visibles en este tiempo y se capturó su imagen en rojo dentro de la siguiente media hora. Se sumergió en una solución de ácido acético 10% (v/v) para su mantenimiento.

NOTA: Las muestras cargadas en los geles fueron el CE de *A. flavipes* dializado durante 3 horas, y las preparaciones enzimáticas comerciales que no fueron dializadas.

5.5 Métodos: Caracterización del jugo de naranja

5.5.1 Obtención del jugo de naranja

Las naranjas fueron adquiridas en la central de abasto del D.F. comercialmente maduras y libres de daños físicos, pertenecientes a la variedad “Valencia” y provenientes del estado de Veracruz. El jugo se obtuvo por presión manual de al menos 17 kg de naranja. Se mezcló bien y se dividió en lotes de 1 L para su tratamiento posterior.

5.5.2 Determinación de pH

Se midió el pH usando un potenciómetro con electrodo de vidrio Marca Corning 320 previamente calibrado con soluciones amortiguadoras de referencia marca Hysel (México) pH 4.0 ± 0.01 y pH 7 ± 0.01 .

5.5.3 Determinación de acidez total

Se realizó la titulación volumétrica ácido-base de 7 mL de jugo de naranja filtrado con una solución valorada de NaOH 0.0903N usando dos gotas de azul de bromotimol como indicador. Se expresó la concentración de ácido cítrico en %, siendo el ácido que se encuentra en mayor proporción.

$$\% \text{ acido Z} = \frac{\text{Vol}_{\text{KOH}} \times N_{\text{KOH}} \times \text{meq}_{\text{ácido Z}}}{\text{peso muestra (g)}} \times 100$$

donde los meq del ácido cítrico para los frutos cítricos es de 0.070

5.5.4 Cuantificación de azúcares reductores directos

En tubos de 16 x 150 mm se adicionaron 100 μL de jugo diluido 1/10 y 900 μL de agua destilada. Se agregó 1 mL de reactivo DNS, se incubó en baño maría a ebullición por 5 min y se añadieron 5 mL de agua destilada. Se centrifugaron las muestras a 500 rpm durante 5 min. Se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 575 nm. No se requiere de la preparación de blancos. Se determinó cantidad de grupos reductores empleando una curva patrón de 0 - 1000 μg de ácido galacturónico.

5.5.5 Cuantificación de azúcares totales

En tubos de ensaye de 22x175 mm se agregaron 0.5 mL de la solución problema cuidando de que se tuviera una concentración máxima de 0.1 mg/mL. Se agregaron 0.5 mL de fenol al 5% (p/v). Se adicionaron 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado con una pipeta de vidrio permitiendo que el ácido cayera vigorosamente sobre la mezcla de solución de azúcares y fenol. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y después de agitó en vórtex. Se leyó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 490 nm. Se determinó la cantidad de azúcares por medio de una curva patrón de 0 - 100 µg de ácido galacturónico.

5.5.6 Determinación de sólidos solubles

Según la NOM-173-SCFI-2009 los sólidos solubles provenientes de fruta son cuantificados como grados Brix, por lo que se efectuó la lectura de las muestras de jugo filtrado estabilizadas a 20°C con un refractómetro de mano Atagon 1-E de escala 0-32°Bx.

5.5.7 Determinación de la claridad del jugo

Se determinó la absorbancia de las muestras del jugo filtrado, centrifugado 10 mL de jugo a 500 rpm por 5 min y luego se midieron las muestras a una longitud de onda de: 660 nm, en un espectrofotómetro.

5.5.8 Determinación de la viscosidad

Se midió la viscosidad del jugo en un viscosímetro tipo Cannon-Fenske No. 200 limpio y seco en baño de agua a 30°C en posición vertical. Se pipetearon 10 mL de substrato y 0.5 mL de HCl-agua 50:50 en el viscosímetro y se equilibró a 30°C durante 5 min. Se midió el tiempo de eflujo cuatro veces y se calculó el promedio.

Se calculó la velocidad de reducción de la viscosidad de acuerdo con la siguiente fórmula propuesta por (Singh, et al. 2005):

$$A = (t_a - t) / (t_a - t_0) * 100$$

Donde, A=velocidad de reducción de la viscosidad, t es el tiempo de eflujo de la muestra, t_a es el tiempo de eflujo de jugo al tiempo cero y t₀ es el tiempo de eflujo del agua.

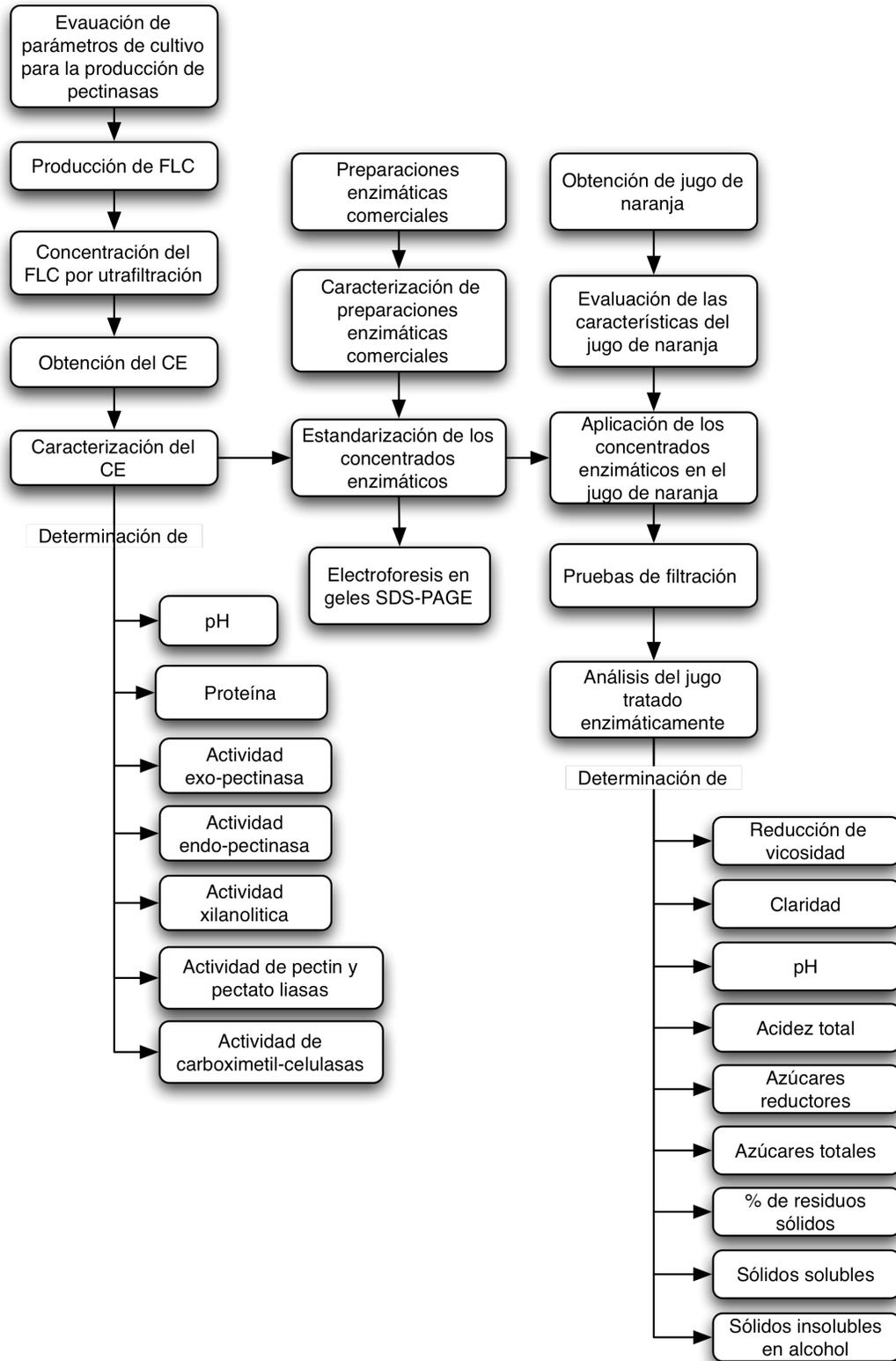
5.5.9 Determinación de los sólidos insolubles en alcohol

Se pesaron 20 g de jugo con pulpa (sin filtrar) y se le agregaron 300 mL de agua destilada para después cocerlo a fuego bajo por 30 min. Se filtró sobre papel filtro a peso constante y se lavó con 10 mL de etanol-agua 80:20. Se seó el residuo a 37°C por 12 h. Se expresó el resultado como porcentaje en peso % (p/p).

5.5.10 Determinación del peso residual

Se secó el residuo de las pruebas de filtración por corriente de flujo de aire hasta alcanzar peso constante (se usó filtro a peso constante) y se expresó el resultado como porcentaje en peso % (p/p).

5.6 Esquema general de la metodología



CAPÍTULO 6. Resultados y Discusión

El presente trabajo se desarrolló en tres partes. Durante la primera parte (ver sección 6.1) se obtuvo un Filtrado Libre de Células (FLC) por Fermentación Sumergida (FS) en lote con el valor de actividad enzimática más elevado posible utilizando a *A. flavipes* como productor de enzimas pectinolíticas. Una vez obtenido, el filtrado se concentró por ultrafiltración. En la segunda parte (ver Sección 6.2) se hizo la caracterización del concentrado enzimático (CE) obtenido en la etapa anterior y de las preparaciones enzimáticas comerciales (cuyos nombres comerciales no son mencionados para resguardar el trato de confidencialidad del proveedor); durante esta etapa se midieron cinco actividades enzimáticas relacionadas con la transformación de carbohidratos complejos presentes en la pared celular y también se realizó la electroforesis de los concentrados enzimáticos para conocer el perfil de sus proteínas constitutivas. Asimismo, con la elaboración de zimogramas se identificaron las proteínas del perfil electroforético de los concentrados que presentaron actividad pectinolítica o xilanolítica. Finalmente, durante la tercera etapa (ver Sección 6.3) se creó una metodología que permite analizar el jugo tratado enzimáticamente con el CE de *A. flavipes*, así como responder si se facilita la filtración del jugo de naranja y en qué medida lo hace en comparación con enzimas pectinolíticas comerciales.

6.1 Evaluación preliminar de los parámetros de cultivo para la producción de pectinasas.

Se produjeron varios filtrados enzimáticos por medio de fermentación sumergida conteniendo cáscara de limón como fuente de carbono a diferentes concentraciones y también a diferentes valores de pH. Se utilizaron condiciones de incubación predefinidas por el grupo de Fisiología de Hongos Filamentos que han demostrado dar valores óptimos de crecimiento y de producción de pectinasas: temperatura de incubación 37°C, agitación recíprocante a 200 rpm, inóculo de 1×10^6 esporas/mL y tiempo de incubación de 72 h.

A continuación se muestran las condiciones y los resultados obtenidos de la determinación de la capacidad enzimática de los filtrados para las diferentes fermentaciones realizadas.

Tabla 3. Actividades exo y endo pectinolíticas de los FLC obtenidos en diferentes condiciones.

% Cáscara de limón	3%	3%	2%	2%
pH inicial del Medio Líquido	4.5	4.2	4.0	3.8
Actividad Exopectinolítica Filtrado [U/mL]	0.138	0.018	3.008	8.51
Actividad Endopectinolítica Filtrado [U/mL]	0.305	0.468	0.142	1.095

De acuerdo a la tabla anterior, la cantidad de cáscara de limón agregada al medio pareció facilitar la producción de pectinasas cuando se añadió en una proporción del 2%. Durante la fermentación se observó que los matraces con 3% de cáscara de limón causan problemas de heterogeneidad en el medio por la adhesión y retención del sustrato en la parte superior de los matraces obstaculizando parcialmente la aireación y por tanto la oxigenación del medio. Por esta razón se disminuyó la producción de enzimas pectinolíticas, y además se podría favorecer la formación de otro tipo de estadíos fisiológicos del hongo utilizado.

Las actividades obtenidas fueron en general bajas, por lo que se disminuyó aún más el pH de producción de pectinasas. Se probaron dos nuevos valores de pH, 3.0 y 3.5 y se compararon con los valores anteriores utilizados de 4.0 y 4.2. Esta vez se utilizó un nuevo lote de cáscara de limón deshidratada debido a que el primer lote utilizado se terminó. Debido a la naturaleza de las frutas el nuevo lote debió tener características ligeramente distintas al lote utilizado anteriormente en cuanto a su composición, lo que repercutió en el pH natural del medio, la cantidad de pectina que contiene y por tanto la capacidad que tiene de inducir la producción de enzimas pectinolíticas. En otros trabajos (Venkatesh y Umesh-Kumar 2006) se ha

encontrado que la mayoría de las pectinasas de origen microbiano se producen por debajo de pH=5.0, y el grupo de Fisiología y Hongos Filamentosos ha utilizado un pH de 4.2 para la producción de pectinasas con *A. flavipes* en trabajos previos (Victoria, 2007; García, 2009).

La mayor actividad exopectinolítica en el rango de pH evaluado se encuentra en pH 3.0 (Figura 13). Las actividades exopectinolíticas en otros valores de pH son cercanas pero inferiores a las del pH 3.0. En cambio, la actividad endopectinolítica en pH 3.0 es muy superior a las de otros valores de pH, y siendo ésta la de mayor interés por estar relacionada con la disminución de la viscosidad, se utilizó un pH de 3.0 para producir el siguiente CE.

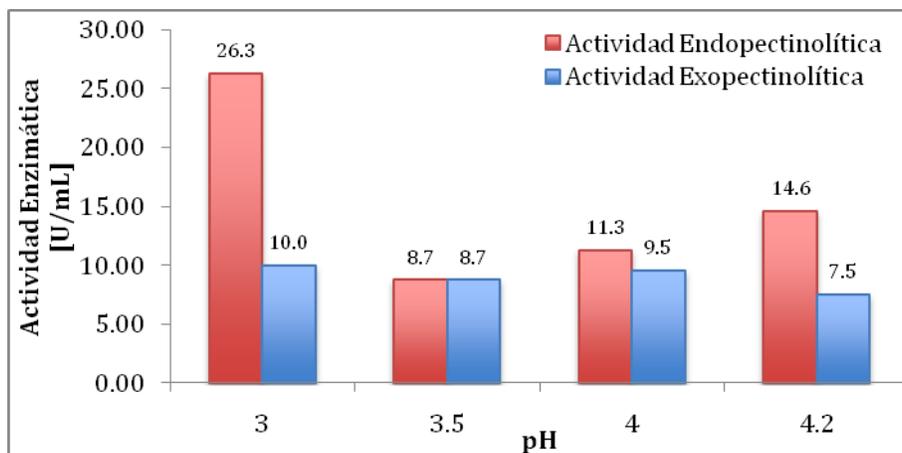


Figura 13. Evaluación del pH de producción de exo y endo-pectinasas en medio con cáscara de limón al 2%, 37°C, 200 rpm con agitación recíprocante por 72h (Cada barra del gráfico representa el promedio de datos por duplicado).

Por los resultados obtenidos es posible afirmar que el pH inicial del medio influyó en la producción de la actividad exo pero particularmente en la producción de la actividad endopectinolítica. Según (Martínez, 2009) los valores de pH más ácidos favorecen la producción de enzimas exo-pectinolíticas, sin embargo esto no se apreció de forma determinante en la evaluación del pH realizada en este trabajo, en cambio la actividad endopectinolítica es claramente superior en los valores de pH cercanos a 3.0.

Este comportamiento es congruente con las pectinasas producidas por los hongos saprofitos que se caracterizan por tener pH óptimos ácidos, y se producen y secretan preferencialmente a condiciones ácidas de crecimiento (Martínez, 2009).

A partir de las fermentaciones realizadas con anterioridad se dedujo que la cantidad de cáscara de limón utilizada sería del 2% y que el pH del medio sería ajustado a 3.0. Se llevó a cabo una fermentación con estas nuevas condiciones. Cabe mencionar que el medio fue ajustado a 3.0, sin embargo el pH final del medio para la inoculación después de la esterilización en autoclave fue de 3.2.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos de las actividades endo y exo-pectinolíticas del filtrado obtenido, concentrado 21.5x veces por ultrafiltración. Se incluyen los resultados del monitoreo a lo largo de su almacenamiento en congelación a -18°C hasta su utilización.

Tabla 4. Efecto del almacenamiento en las actividades endo- y exo-pectinolíticas del CE.

	Días de almacenamiento a -18°C		
	0	17	82
Actividad endopectinolítica del CE [U/mL]	585.53	407.52	267.76
Actividad exopectinolítica del CE [U/mL]	225.23	132.45	588.44

Nota: El CE fue obtenido por ultrafiltración a partir de un filtrado libre de células con 12.08 U/mL de actividad exopectinolítica y 20.68 U/mL de actividad endopectinolítica.

Las actividades pectinolíticas obtenidas para el nuevo CE de *A. flavipes* fueron muy elevadas, tomando en cuenta que el CE de las primeras fermentaciones realizadas tuvo una actividad endopectinasa de 6.5 U/mL y ahora el nuevo CE obtenido presentó una actividad endopectinasa de 585.5 U/mL, es decir, noventa veces más actividad. Por ello, se decidió que fuera usado para las pruebas de aplicación en jugo de naranja y también fue caracterizado junto con las preparaciones enzimáticas comerciales. Sin embargo, se observa que durante el almacenamiento tanto la endopectinasas como la exopectinasas van perdiendo actividad a pesar de que el concentrado se mantuvo en congelación a -18°C hasta su uso. Con respecto a la actividad exopectinolítica determinada en el día 82 de almacenamiento, que evidentemente se sale de la tendencia, se asume que pudo haberse incrementado por la sedimentación de una fracción desconocida de sólidos que probablemente inhibieron parcialmente la actividad durante los primeros días de almacenamiento y que una vez removidos permitieron recuperar la actividad.

En un futuro sería interesante evaluar el efecto del almacenamiento en ultracongelación para estudiar cómo es que se modifica la estabilidad y actividad de las enzimas producidas.

Se sabe que la limitada estabilidad al almacenamiento de las enzimas en formulaciones acuosas líquidas debe considerarse como el factor limitante principal para la aplicación más extendida de las enzimas (Luppo, et al. 2005) y es frecuente que las preparaciones comerciales que contienen enzimas aprovechen la ventaja de la estabilidad al almacenamiento de una enzima en estado seco como es el caso de la PEC-A.

Si en un futuro se quisiera conservar el filtrado crudo enzimático como formulación líquida se requeriría de la adición de altas concentraciones de estabilizadores miscibles con el agua destinados a rebajar la actividad de agua de la formulación, ya que una baja actividad de agua en una composición acuosa también es ventajosa para prevenir el crecimiento microbiano en la composición (Luppo, et al. 2005).

6.2 Caracterización de los concentrados enzimáticos

Durante la segunda etapa se llevó a cabo la caracterización del CE de *A. flavipes* y de las preparaciones comerciales para conocer las actividades enzimáticas que presentan cada una de ellas. Se cuantificó la proteína y se estandarizó su concentración para comparar el perfil de proteína de los concentrados mediante la preparación de geles de electroforesis. También se comparó el efecto de la aplicación de los concentrados enzimáticos para el tratamiento de jugo de naranja. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

6.2.1 Determinación de actividades enzimáticas

Se ha demostrado que la pectina es un excelente inductor de actividad exopectinolítica en diversos tipos de cultivos, sin embargo la naturaleza de las exopectinasas es constitutiva (Martínez, 2009). Debido a que la cáscara de limón tiene un alto contenido de pectina (15-21% en base seca según (Madrigal, et al. 1996) se espera que al utilizarla como única fuente de carbono en un medio de FS se presenten buenas actividades exopectinolíticas para el CE.

En la Figura 14 se observó la actividad exopectinolítica medida por la liberación de grupos reductores (ácido galacturónico) debido a la actividad enzimática. La PEC-B es la que presentó mayor actividad, seguido de la PEC-A y por último de encuentran la PEC-C y el CE de *A. flavipes*. Cabe mencionar que esta determinación no permite conocer cuántas y cuáles con las enzimas exopectinolíticas que están presentes en cada uno de los concentrados enzimáticos.

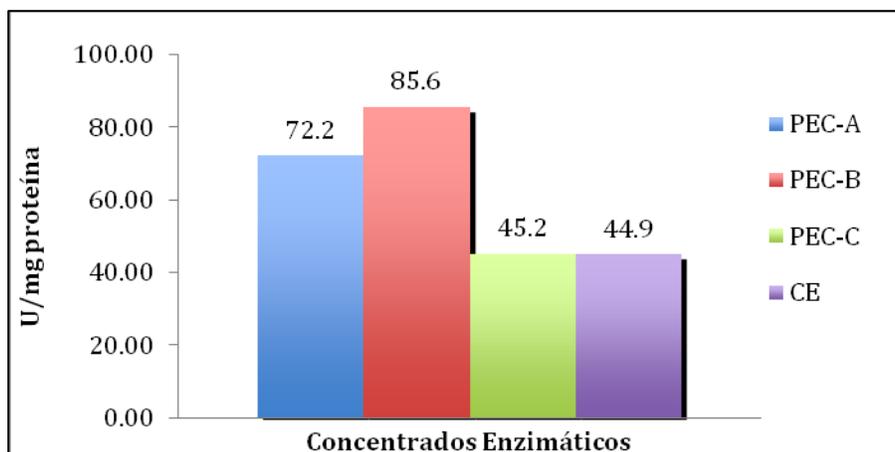


Figura 14. Actividad exopectinolítica específica de los diferentes concentrados enzimáticos para una incubación a 45°C durante 20 min.

Con respecto a la producción de endopectinasas, se sabe que es inducible y que la pectina es el principal inductor (Martínez, 2009). Como la pectina está presente en buena cantidad en la cáscara de limón, se esperaba que hubiera una elevada producción de endopectinasas en el CE de *A. flavipes* aunado a que hay una influencia clara de los valores más ácidos de pH sobre dicha producción.

Como se puede observar en la figura 15, la PEC-C tuvo una gran actividad endopectinolítica dominando a todos los concentrados enzimáticos. Dado que esta actividad enzimática es la más importante en la reducción de la viscosidad de los jugos de frutas, se esperaría que su aplicación en el jugo de naranja fuera muy positiva para el aumento del rendimiento. El CE de *A. flavipes* se encontró prácticamente a la par con la PEC-A y tuvieron actividades endopectinolíticas muy aceptables, mientras que la PEC-B y la PEC-C presentaron actividades endopectinolíticas sobresalientes.

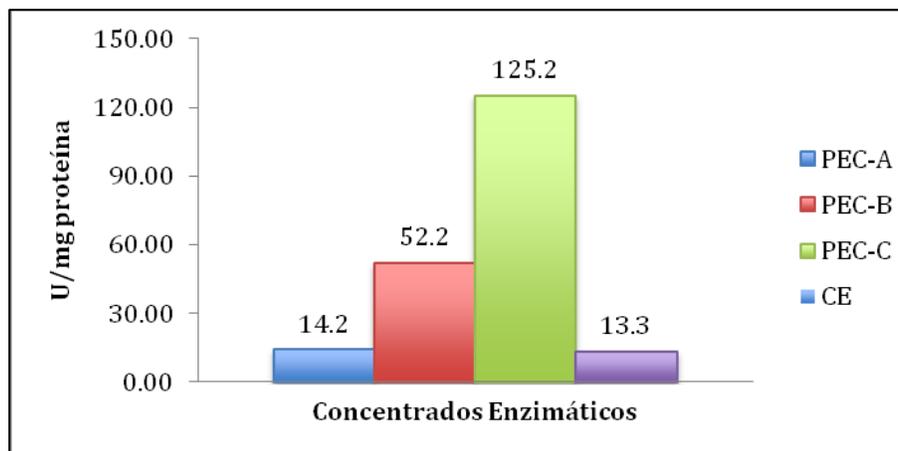


Figura 15. Actividad endopectinolítica específica de los diferentes concentrados enzimáticos determinada a 30°C.

A. flavipes es capaz de producir enzimas xilanolíticas con fuentes de carbono complejas, y la síntesis de estas enzimas se ve fuertemente influenciada por los componentes presentes en el medio de cultivo (Álvarez, et al. 2003). Debido a que existen hemicelulosas en la pared celular de la cáscara de limón y que la producción de xilanasas es inducida por el sustrato, se esperaba que hubiera producción de este tipo de enzimas en el CE de *A. flavipes*.

Como se muestra en la figura 16 se observó que la actividad xilanolítica fue mejor para la PEC-B seguida de la CE. Posteriormente se encontraron la PEC-C y por último la PEC-A. Cabe

mencionar que esta determinación no permite conocer cuántas ni qué enzimas xilanolíticas están presentes en cada uno de los concentrados enzimáticos, sino la liberación de grupos reductores (xilosa) liberados por dicha actividad enzimática.

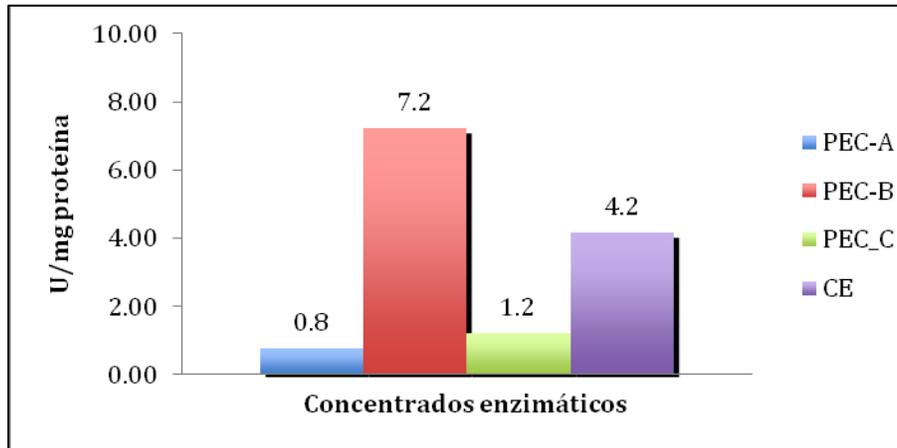


Figura 16. Actividad xilanolítica específica de los diferentes concentrados enzimáticos cuantificada para una incubación a 50°C durante 20 min.

La producción constitutiva de pectin y pectatoliasas no se ha reportado explícitamente en los trabajos que estudian la producción de pectinasas por diversos hongos. Por otro lado se considera a la pectina y al ácido galacturónico como inductores de esta actividad (Martínez, 2009). Las pectin y pectatoliasas son de gran valor para la despectinización de las bebidas debido a que no producen metanol como las pectinesterasas que llevan a cabo la demetoxilación de la pectina.

La medición de las pectin y pectatoliasas fue determinada por medio de la formación de dobles ligaduras entre el C-5 y el C-6 de las unidades de ácido galacturónico que forman la molécula de pectina. En la Figura 17 se observó la presencia de actividad conjunta de pectin y pectatoliasas en todos los concentrados enzimáticos, siendo el CE de *A. flavipes* el que presenta hasta 10 veces más actividad y por tanto, el que domina a todos los concentrados enzimáticos.

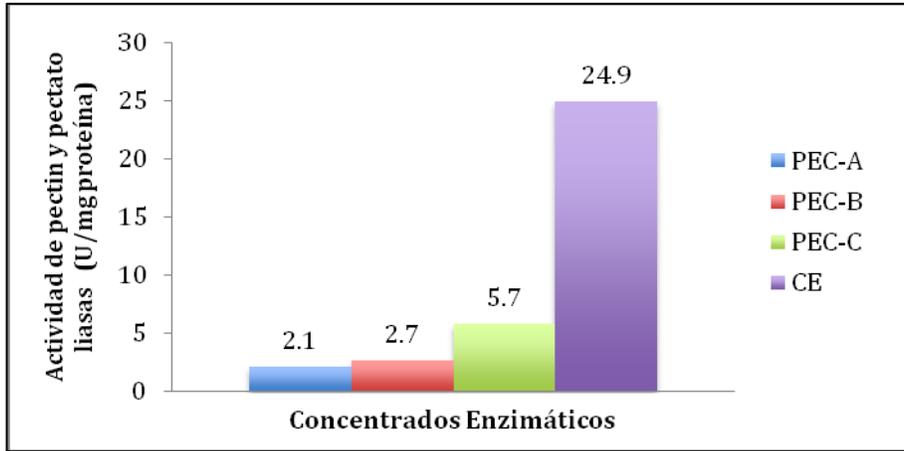


Figura 17. Actividad específica de pectin y pectato liasas de los diferentes concentrados enzimáticos cuantificadas para una incubación a 40°C durante 60 min.

Fue posible determinar la actividad celulolítica de carboximetilcelulasas en los concentrados enzimáticos por medio de la cuantificación de la liberación de azúcares reductores (dextrosa) como resultado de la actividad enzimática.

En la Figura 18 se observó que la actividad de las carboximetilcelulasas presentes en los concentrados enzimáticos es poco relevante para la PEC-A, PEC-B y el CE, mientras que para la PEC-C no se detectó actividad.

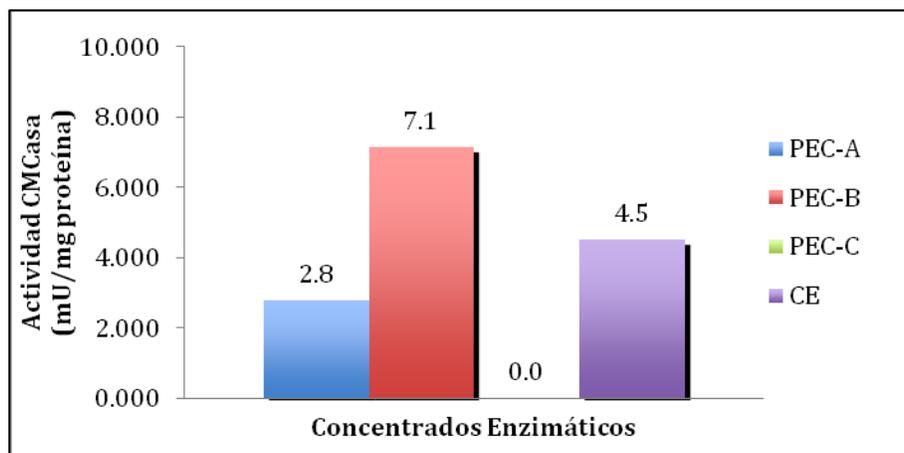


Figura 18. Actividad específica de carboximetilcelulasas de los diferentes concentrados enzimáticos cuantificada para una incubación a 50°C durante 60 min.

Para calcular la actividad específica (Unidades enzimáticas por mg de proteína) fue necesario cuantificar la proteína. Se utilizó el método de Bradford que es muy sensible y tiene como

ventaja el ser rápido y práctico.

Los resultados que se muestran en la Figura 19 indicaron que la concentración de proteína de los concentrados enzimáticos es suficiente grande como para añadir microvolúmenes a los geles SDS-PAGE y para ser suministrados en proporciones de ppm al jugo de naranja para su tratamiento.

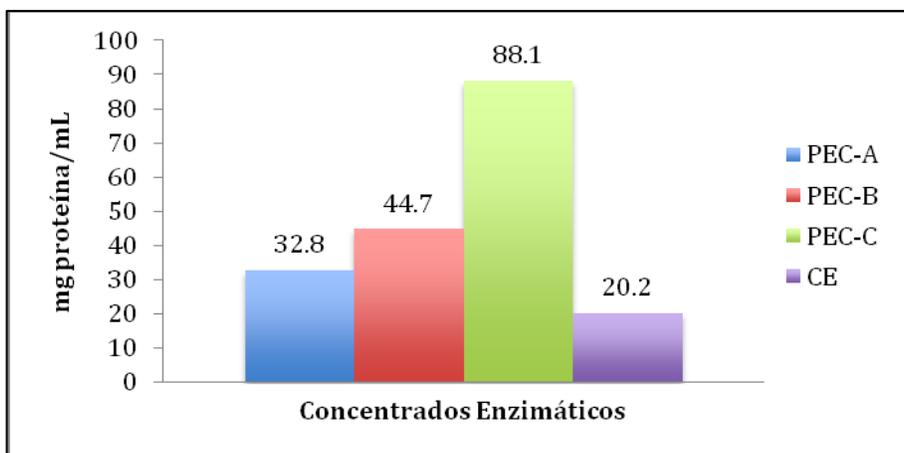


Figura 19. Cuantificación de proteína por el método de Bradford de los concentrados enzimáticos.

Tabla 5. Resumen de las actividades enzimáticas específicas y cantidad de Proteína del CE de *A. flavipes* y de las Preparaciones Enzimáticas Comerciales

Enzima	CE de <i>A. flavipes</i> FP-500	PEC-A	PEC-B	PEC-C
Endopectinólítica	13.3	14.2	52.2	125.2
Exopectinólítica	44.9	72.2	85.6	45.2
Pectin y pectatoliasa	24.9	2.1	2.7	5.7
Xilanasa	4.2	0.8	7.2	1.2
Carboximetilcelulasa	4.5	2.8	7.1	0.0
Proteína	20.2	32.8	44.7	88.1

Según se describe en la Tabla 5, el CE de *A. flavipes* tuvo actividades enzimáticas cercanas y en algunos casos incluso mayores que las preparaciones enzimáticas comerciales, por lo que se esperaba que al aplicarlo en jugo de naranja pudiera tener un buen desempeño para el aumento del rendimiento de filtración del jugo, lo que se estudió posteriormente en la Sección 6.3. De las preparaciones enzimáticas comerciales, la que parece que podría tener el mejor

desempeño en la aplicación de jugo de naranja en la PEC-C por su alta actividad endopectinolítica.

6.2.2 Perfiles Electroforéticos

Se corrieron geles SDS-PAGE al 12% de acrilamida para analizar los concentrados enzimáticos. El CE de *A. flavipes* fue dializado contra buffer de acetatos pH=5 para mejorar su estabilidad durante el corrimiento del gel. Los carriles de la PEC-A, PEC-B y PEC-C se corrieron con 50 microgramos de proteína y el del CE de *A. flavipes* se corrió con 101 microgramos de proteína para permitir la visualización de las bandas menos evidentes. Se cargaron 3 series de las muestras, la primera se utilizó para la visualización de las bandas de proteína constitutivas de los concentrados enzimáticos. La segunda y la tercera serie fueron tratadas para observar las bandas de actividad pectinolítica y xilanolítica, es decir, se elaboraron zimogramas de actividad *in situ*.

La Figura 20a corresponde al perfil electroforético de proteína por lo que se observan las proteínas constitutivas de los diferentes concentrados enzimáticos. Los concentrados enzimáticos son diferentes y por lo tanto tienen perfiles de proteína distintos debido a que provienen de diferentes microorganismos y es muy probable que hayan sido producidos con diferentes fuentes de carbono. Sin embargo, podrían tener algunas proteínas en común debido a que hay compatibilidad en los pesos moleculares de algunas de las bandas.

El carril 1 representa al marcador de peso molecular de bajo espectro con proteínas puras ubicadas en un rango de 14.4 - 97.4 KDa. En el carril 2 se presentó un barrido lo que indica que hubo una gran cantidad de proteínas presentes, y se logró observar que hubo al menos 5 bandas suficientemente definidas en un rango 35-60 KDa, en el carril 3 hubo una banda intensa alrededor de los 46 - 47 KDa y muchas más poco intensas a lo largo de todo el carril, en el carril 4 hubo al menos tres bandas muy intensas en el rango de 31 - 55 KDa, pero también hubo otras menos intensas a lo largo del carril, finalmente en el carril 5 hubo una banda muy intensa en 46 - 47 KDa y otras más mucho menos intensas pero muy bien definidas por debajo de los 43 KDa.

Fue notable que la mayor parte de las proteínas presentes se encontraron en un rango de 30 a 60 KDa, ya que las enzimas de mayor interés de este estudio oscilaron precisamente en ese intervalo. Se pudo observar también un número variable de proteínas constituyentes debido a que los concentrados tuvieron diferentes orígenes y los microorganismos utilizados para su

obtención también fueron distintos, sin embargo, hubo correspondencia entre algunas de las proteínas presentes en dos o más concentrados enzimáticos lo que podría indicar que pueden estar presentes el mismo tipo de proteínas en algunos casos o simplemente tienen el mismo peso molecular o uno muy aproximado.

En la figura 20b se muestra el zimograma de actividad pectinolítica. En todos los carriles se observan bandas de actividad de pectinasas hidrolíticas características entre los 30 - 50 KDa (halos por degradación del sustrato, es decir degradación de pectina). Asimismo, la presencia de bandas de tipo "mancha oscura" presentes en los carriles 6, 7 y 8 con pesos moleculares aproximados entre 20 - 30 KDa podrían indicar la presencia de pectinesterasas debido a que es característico del ácido poligalacturónico el teñirse más intensamente que la pectina. En el carril 9 no parece haber presencia de pectinesterasas.

Observando la figura 20c se aprecia que sí existe actividad xilanolítica en los concentrados enzimáticos por que están presentes algunas bandas de actividad características. En el carril 10, hubo una o varias bandas intensas arriba de los 50 KDa. En el carril 11 hubo bandas tenues alrededor de los 33 KDa y alrededor de los 67 KDa, también se identifica una banda más oscura en alrededor de los 46 KDa y que se desconoce el motivo de su coloración intensa pero podría tratarse de una glicoproteína. En el carril 12 también se aprecian bandas en 25, 47, 58 - 67 KDa. Finalmente en el carril 13 se observan bandas en 25 y 46 KDa. A continuación se muestran las imágenes de los geles obtenidos.

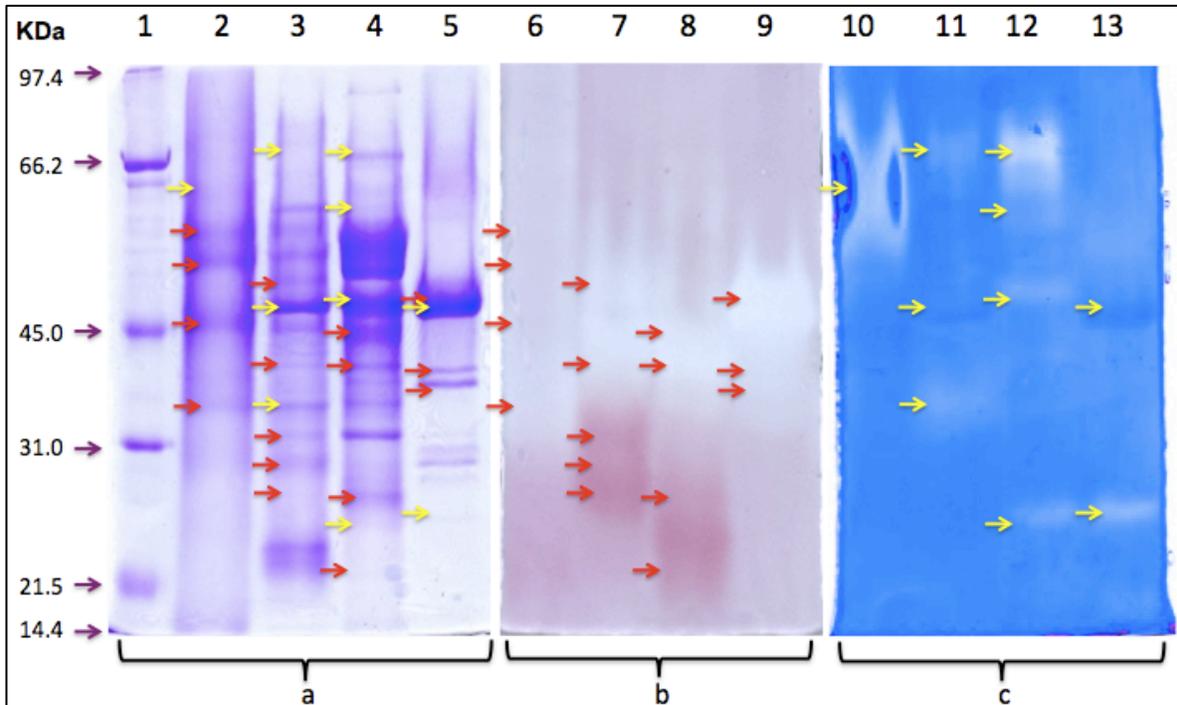


Figura 20. Geles SDS-PAGE. **a)** Electroforesis SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie. **b)** Zimograma de actividad pectinolítica teñido con rojo de rutenio. **c)** Zimograma de actividad xilanólítica teñido con rojo congo.

1) Marcador de peso molecular; 2,6,10) PEC-A; 3,7,11) PEC-B; 4,8,12) PEC-C; 5,9,13) CE de *A. flavipes*.

6.3 Aplicación de los extractos enzimáticos en el jugo de naranja

Se realizó una evaluación de las características del jugo de naranja sin adición de enzimas para conocer el comportamiento de las enzimas endógenas que se liberan de forma natural con la extracción del jugo.

Posteriormente se hizo el tratamiento del jugo de naranja con los diferentes concentrados enzimáticos para compararlos entre sí y se analizó el jugo resultante de dicho tratamiento.

6.3.1 Evaluación de las características del jugo de naranja

Se midió la actividad pectinolítica y xilanolítica de las enzimas presentes de forma natural en el jugo de naranja para definir si tendrían algún impacto en los resultados de las pruebas realizadas después del tratamiento enzimático del jugo.

En la figura 21 se observa que las enzimas presentes de forma natural en el jugo de naranja tuvieron una actividad exopectinolítica de 16.5 U/mL y una actividad xilanolítica de 5.8 U/mL. Estas determinaciones se hicieron en las condiciones estándar del Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos que comprenden un tiempo de incubación de 20 min. Sin embargo, se hizo la determinación de las mismas actividades en un tiempo de 60 min para conocer su comportamiento en un tiempo de incubación más prolongado. Para esas determinaciones la actividad exopectinolítica fue de 19.1 U/mL y la actividad xilanolítica es de 7.9 U/mL, que son valores que representan menos del 3% y 28% respectivamente de la actividad de las preparaciones enzimáticas comerciales con menor actividad.

Con estos resultados se demuestra que las enzimas endógenas de la naranja pudieron haber tenido un impacto moderado en los resultados de las actividades exopectinolítica y xilanolítica en las pruebas posteriores.

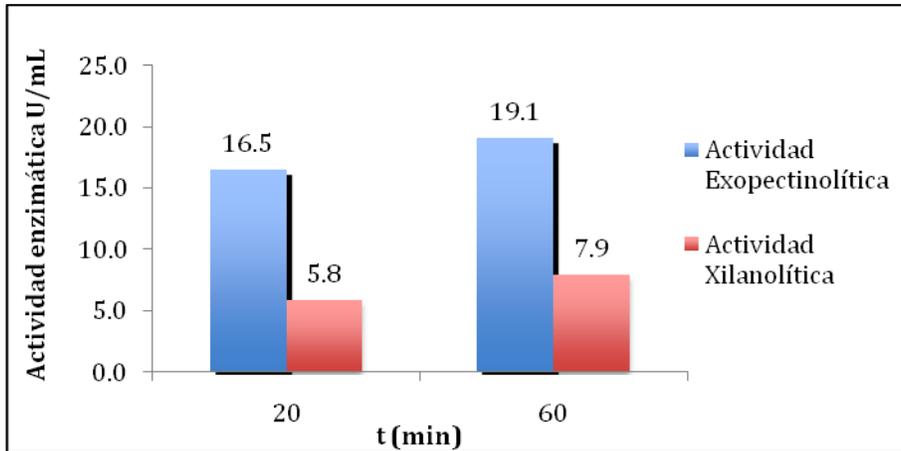


Figura 21. Actividad exopectinolítica y xilanolítica de enzimas presentes de forma natural en el jugo de naranja.

Adicionalmente, se encontró una longitud de onda adecuada para realizar las lecturas de las pruebas de claridad en el jugo de naranja. Se hizo una exploración espectrofotométrica de dos muestras de jugo en diferentes diluciones, una tratada enzimáticamente por 3 horas y un control tratado con agua por el mismo tiempo y ambos a una temperatura constante de 45°C. Esta exploración se corrió a través del espectro en un rango de 200 nm hasta 800 nm, y según lo que se aprecia en las figuras 22 y 23 se comprobó que a 660 nm no existen especies presentes que absorban cumpliendo con lo reportado por Rai, et al. 2004. Se utilizó una longitud de onda de 660 nm para hacer las mediciones evitando que haya interferencias y que los valores de absorbancia sólo estén dados por la cantidad de solutos presentes en las muestras.

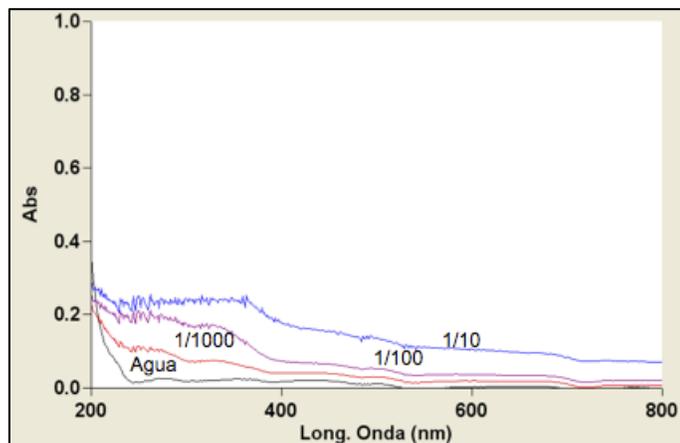


Figura 22. Exploración de 3 diluciones del control de jugo de naranja tratado por 3h a 45°C.

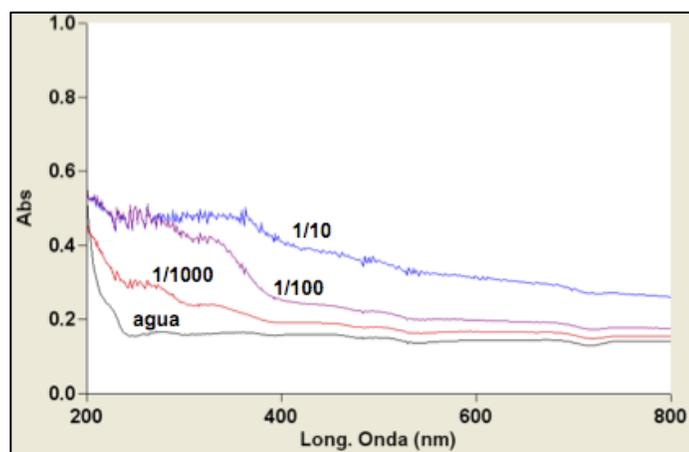


Figura 23. Exploración de 3 diluciones de jugo de naranja tratado enzimáticamente por 3 h a 45°C.

También fue posible observar un incremento en los valores de absorbancia en las muestras de jugo tratado enzimáticamente con respecto al control, lo que es indicio de que la concentración de los azúcares en solución aumenta debido al tratamiento enzimático.

6.3.2 Pruebas de filtración y análisis del jugo de naranja

Como primer experiencia con la filtración del jugo de naranja se hizo una prueba para observar el impacto que tiene el tratamiento enzimático sobre el tiempo de filtración y así poder establecer un tiempo de filtración fijo para las pruebas posteriores.

Se exprimieron naranjas maduras y libres de daños físicos partidas por la mitad para obtener jugo. El jugo se dividió en dos lotes con el mismo volumen y uno se trató con la PEC-C (200ppm) y al otro se le agregó un volumen equivalente de agua. Ambos fueron tratados por 90 min. Al jugo tratado con agua se le considera el control. Una vez terminado el tratamiento del jugo, se filtraron por duplicado 100 mL de jugo de cada uno de los lotes a través de papel filtro de cafetera hasta obtener 20 mL de jugo filtrado.

Como se puede observar en la figura 24, el jugo tratado con 200ppm de enzima por 90 min tuvo una filtración 3.28 veces más rápida que el control, dejando claro que sí hubo un impacto positivo con el tratamiento enzimático porque se disminuye el tiempo de filtración de jugo de naranja en un 66.89% utilizando una de las preparaciones enzimáticas comerciales.

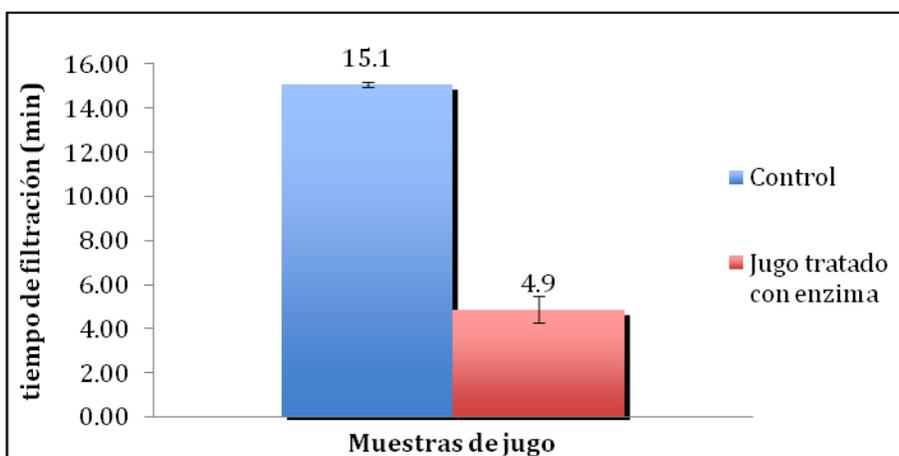


Figura 24. Resultados de las pruebas de filtración.

Con los resultados obtenidos de las pruebas de filtración, se sabe que el tratamiento enzimático con pectinasas disminuye el tiempo de filtración y con tales observaciones se optimizó la metodología de la siguiente parte experimental.

Se planteó una metodología para la medición de algunos factores como acidez total, claridad, azúcares totales, % de azúcares insolubles en alcohol, entre otros. Se utilizaron técnicas

confiables y reproducibles para su medición, tomando muestras a diferentes tiempos de tratamiento enzimático del jugo de naranja. Se hicieron algunas pruebas iniciales y se fue ajustando la metodología de acuerdo con las necesidades del experimento.

Como primer paso se hizo una cinética de 3 h de tratamiento enzimático muestreando cada 45 min para conocer el tiempo de tratamiento más adecuado.

En la figura 25 se puede observar que en el intervalo de 0 - 1.5 h de tratamiento hubo una tendencia lineal en el aumento de la cantidad de jugo filtrado con respecto al tiempo de tratamiento enzimático. Una vez que se sobrepasaban los 90 minutos de tratamiento la relación ya no fue lineal llegando a un valor máximo que se hace evidente a partir de las 2.25 h de tratamiento. Por el hecho de mantener cierta linealidad hasta los 90 min, se utilizó posteriormente ese tiempo de tratamiento para el jugo.

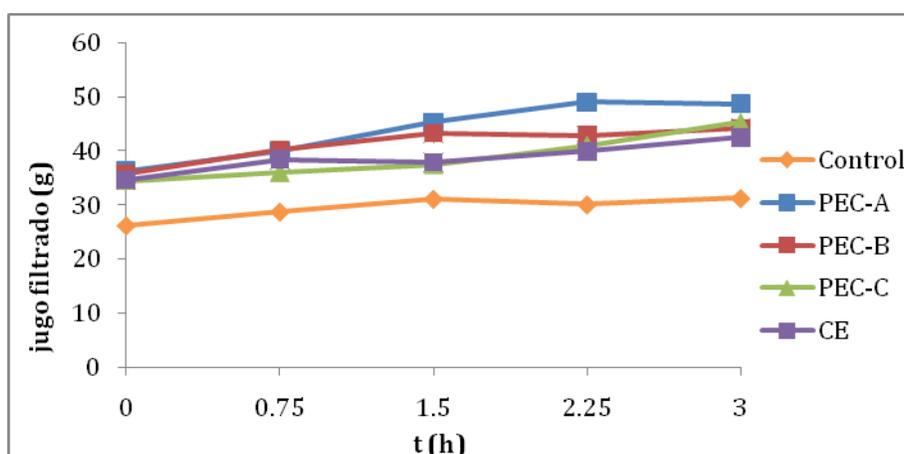


Figura 25. Cinética de tiempo de filtración del jugo de naranja con tratamiento enzimático a 45°C.

También se realizaron pruebas para verificar si las técnicas utilizadas para el análisis del jugo de naranja son útiles para este tipo de muestra. Por ejemplo, se midieron azúcares reductores directos a diferentes tiempos de tratamiento enzimático por el método descrito por (Dubois, et al. 1956) y se verificó si es que los polisacáridos fueron hidrolizados hasta azúcares reductores, lo que sería un indicador de que la pectina fue hidrolizada hasta ácido galacturónico.

En la Figura 26 se observó un aumento en la concentración de los azúcares reductores con respecto al tiempo de tratamiento enzimático lo que indica que el tratamiento sí generó azúcares reductores, principalmente ácido galacturónico, como resultado de la hidrólisis de la

pectina. En el caso del control se presentó un ligero aumento en la concentración de azúcares reductores que está dado por la presencia natural de enzimas pectinolíticas en la materia prima.

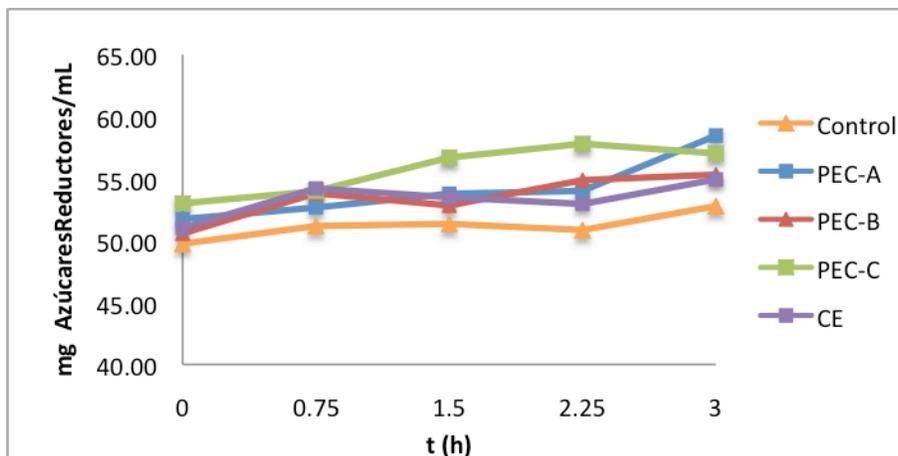


Figura 26. Azúcares reductores directos del jugo de naranja a diferentes tiempos de tratamiento enzimático.

Una vez definida la metodología y las técnicas de medición se llevó a cabo el tratamiento enzimático de cinco lotes de 1 L de jugo a una temperatura constante de 45°C durante 90 minutos.

Se estandarizó la cantidad de enzima usada para el tratamiento enzimático del jugo de acuerdo a la actividad endopectinasa de los concentrados enzimáticos, porque al ser la que despolimeriza la molécula de pectina y por tanto la que disminuye su tamaño, se esperaba que tuviera mayor impacto en el aumento del rendimiento de filtración del jugo.

Los volúmenes de enzima utilizados para el tratamiento enzimático de cada uno de los lotes de jugo se muestran a continuación:

Tabla 6. Estandarización de los concentrados enzimáticos utilizados

Enzima	Actividad Endo-pectinolítica* (U/mL)	Cantidad de enzima**	Volumen de agua (mL)	Volumen total usado para el tratamiento enzimático (mL)
PEC-A	466.36	0.831g	cbp 1 mL	1 mL
PEC-B	2334.4	159 µL	0.841	1 mL
PEC-C	11030.78	33.6 µL	0.966	1 mL
CE de <i>A. flavipes</i>	267.76	1000 µL	0	1 mL

*La actividad se estandarizó a 267.76 Unidades teniendo en cuenta la actividad del CE de *A. flavipes*

**Cantidad necesaria para tener 267.76 Unidades

Una vez estandarizada la cantidad de enzima de cada uno de los concentrados enzimáticos a una actividad endopectinolítica de 267.76 U/mL, se procedió a realizar las pruebas de filtración y el análisis del jugo de naranja para un tratamiento de 90 min a 45°C.

Durante la filtración del jugo no tratado se lleva a cabo una acumulación de sustancias pécticas, pero también de otras proteínas y fibras presentes en el jugo sobre el filtro bloqueando sus poros, por lo que se buscó reducir ese efecto por medio del uso de enzimas pectinolíticas para aumentar la cantidad de jugo filtrado.

En la figura 27 se puede observar que la cantidad de jugo filtrado después de 90 minutos de tratamiento enzimático fue mayor que la cantidad de jugo filtrado al tiempo cero. Según los resultados de esta prueba la PEC-A es la que proporcionó un mayor aumento en el rendimiento de jugo con un 54.24%, seguida del CE con un 46.61%, posteriormente el PEC-C con 38.98% y por último la PEC-B con un aumento en el rendimiento de 37.29%. El control sólo aumentó su rendimiento un 5.36% lo que es congruente debido a que no se le agregó enzima y ese pequeño incremento puede ser explicado por las enzimas naturales presentes en la naranja. Por lo que el aumento en el rendimiento puede ser atribuido principalmente al tratamiento enzimático con los concentrados añadidos.

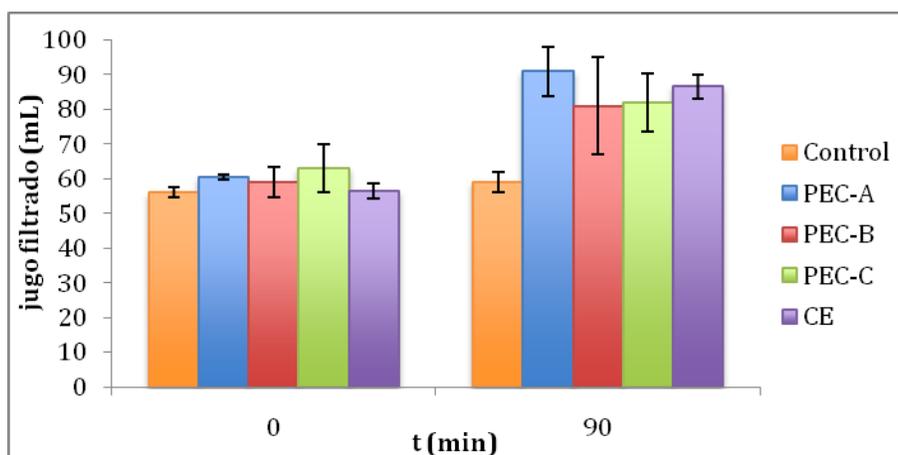


Figura 27. Pruebas de filtración del jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min. Cada valor es un promedio de 4 mediciones*.

* En las figuras 27 a 36, la línea ubicada en el extremo superior de cada barra representa la desviación estándar entre las réplicas.

Las condiciones óptimas de clarificación requeridas para el jugo son: la disminución de la viscosidad al mínimo, aumento de la claridad al máximo y la disminución de los sólidos insolubles en alcohol al mínimo (Rai y De, 2009) por lo que la optimización puede ser considerada como aceptable si se disminuyen los sólidos insolubles en alcohol y la viscosidad, y si se aumenta la claridad.

Una forma indirecta de saber si hubo un cambio favorable en la viscosidad del jugo de naranja es midiendo la velocidad de reducción de la viscosidad. Si hay un aumento en la velocidad de disminución de la viscosidad (A), entonces el jugo de naranja será cada vez menos viscoso y de ser así, la pectina que es la principal responsable de la viscosidad del jugo estaría siendo despolimerizada con el tratamiento enzimático. Según los resultados expuestos en la figura 28, sí hubo un aumento de la velocidad de disminución de la viscosidad para todos los concentrados enzimáticos lo que indica que hubo hidrólisis de pectina por la acción de endopectinasas presentes en los concentrados enzimáticos y que causaron un cambio favorable (disminución) de la viscosidad del jugo de naranja.

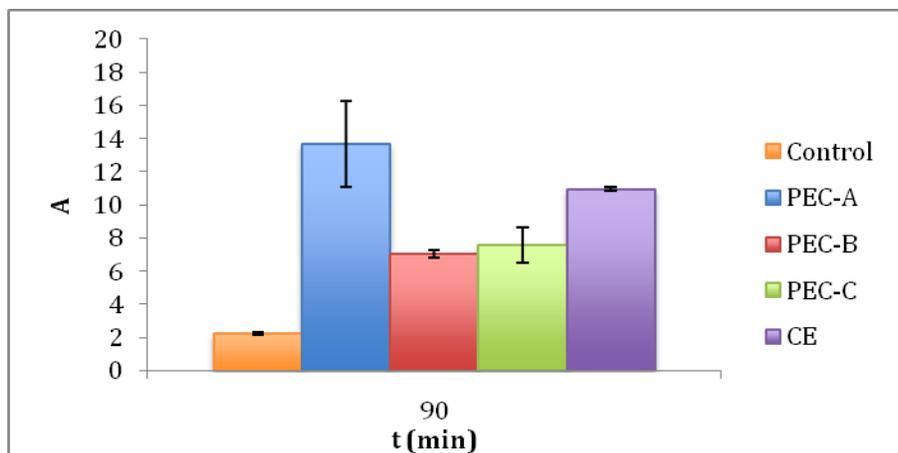


Figura 28. Determinación de la reducción de viscosidad del jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min. Cada valor es un promedio de 4 mediciones*.

Otra propiedad que define un tratamiento de jugo óptimo es la claridad. Los jugos extraídos son usualmente turbios debido a las partículas de la planta que no son solubles en agua (fibras, celulosa, hemicelulosa, protopectina, almidón y lípidos) y macromoléculas coloidales: pectina,

proteínas, fracciones de almidón soluble, etc. Dependiendo de el producto final, estas sustancias deben ser parcial o completamente eliminadas para evitar su precipitación o que sean causantes de turbidez, así como para mejorar los atributos sensoriales. La turbidez-opacidad de los jugos de fruta se puede disminuir mediante el tratamiento enzimático debido a la eliminación de la pectina cargada negativamente depositada en la materia en suspensión que podría causar turbidez debido a su coagulación (Raju y Bawa, 2006).

El jugo de naranja analizado se pudo considerar como clarificado debido a que tuvo un tratamiento enzimático previo a la filtración. Se midió la claridad del jugo tratado con los diferentes concentrados enzimáticos y se encontró que se aumentó la claridad del jugo con respecto a los controles en todos los casos (Figura 29), lo que indicó que se puede esperar una mayor estabilidad del jugo filtrado y también se obtiene un jugo homogéneo visualmente más atractivo.

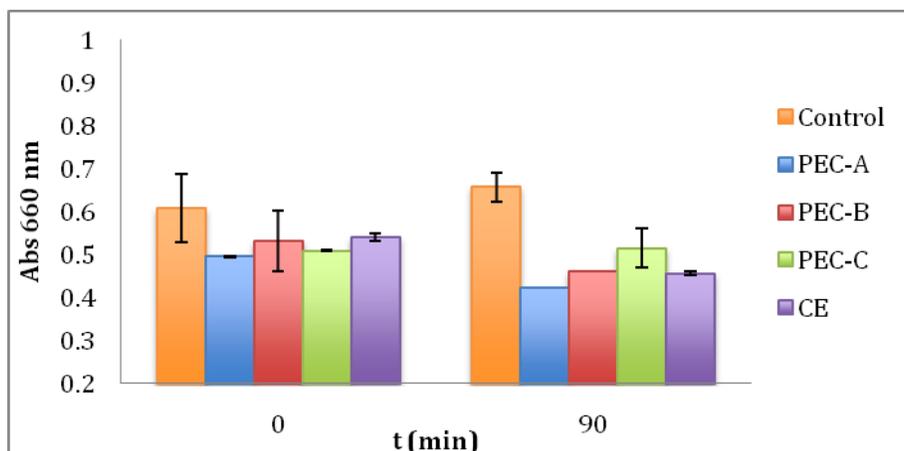


Figura 29. Determinación de la claridad del jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min. Cada valor es un promedio de 4 mediciones*.

Según (Berlitz, et al. 2009), el pH de la porción comestible de la naranja es de 3.3 y lo reportado por (Lozano 2006) es que el pH del jugo de naranja puede estar dentro de un rango de 3.2-3.8. Estos datos son congruentes con los resultados obtenidos para el jugo analizado. Según la Figura 30, aún cuando se aplica un tratamiento enzimático el pH no se modificó en ninguno de los casos.

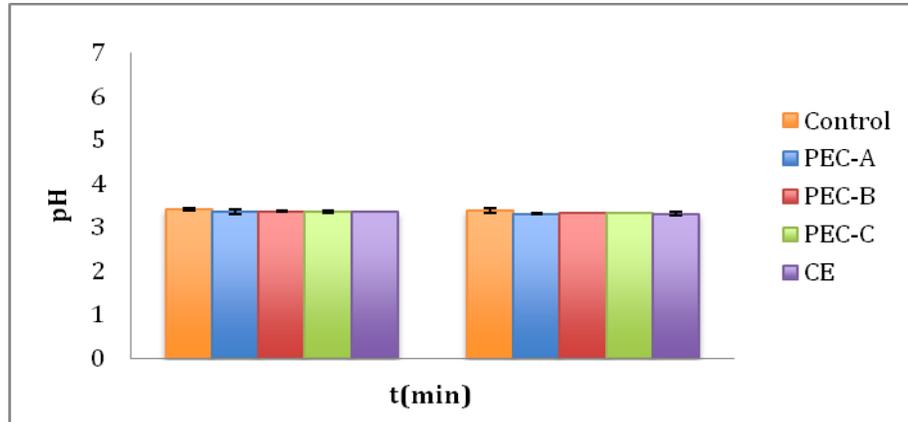


Figura 30. Determinación del pH del jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min. Cada valor es un promedio de 4 mediciones*.

Las frutas contienen ácidos orgánicos que dan el gusto ácido, y en combinación con los azúcares en solución le dan el sabor característico a las frutas. Las naranjas contienen ácido cítrico principalmente y una pequeña cantidad de ácido málico.

En la Figura 31 se observó un incremento en la acidez total, reportada como porcentaje de ácido cítrico y en definitiva este aumento no fue causado por una adición de ácido cítrico sino que hubo una liberación de ácidos compartimentalizados en el tejido de la fruta y que son disgregados por el tratamiento enzimático. También hubo liberación enzimática de algunos monosacáridos como el ácido galacturónico. En conjunto estas razones pueden explicar el ligero aumento en la acidez total del jugo después del tratamiento. Cabe mencionar, que a los resultados mostrados en la Figura 30 se les restó el control para observar únicamente el efecto del tratamiento enzimático.

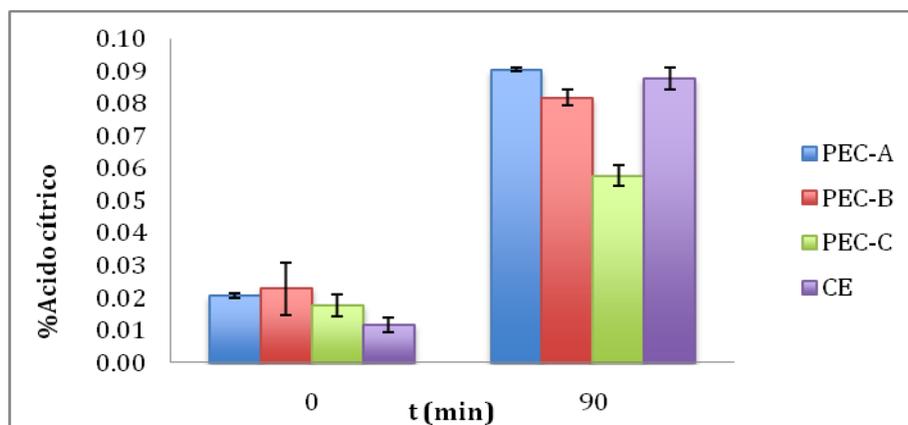


Figura 31. Efecto del tratamiento con los concentrados enzimáticos a 45°C durante 90 min sobre la acidez total del jugo de naranja. Cada valor es un promedio de 3 mediciones*.

Los concentrados enzimáticos utilizados para tratar el jugo de naranja contienen pectinasas y otras enzimas que degradan la pared celular. Las pectinasas tienen la capacidad de despolimerizar a la pectina así como de liberar residuos de monosacáridos de los extremos de la molécula. Por medio de esta catálisis se libera ácido galacturónico al medio. Se cuantificó la liberación de los azúcares reductores liberados por el tratamiento enzimático y los resultados se muestran en la Figura 32 donde se han restado los controles a todas las determinaciones para observar únicamente el efecto del tratamiento enzimático en el jugo filtrado. Es evidente que hubo una liberación importante de azúcares reductores y el CE de *A. flavipes* es el que muestra un mayor efecto de la actividad enzimática por la liberación de dichos azúcares.

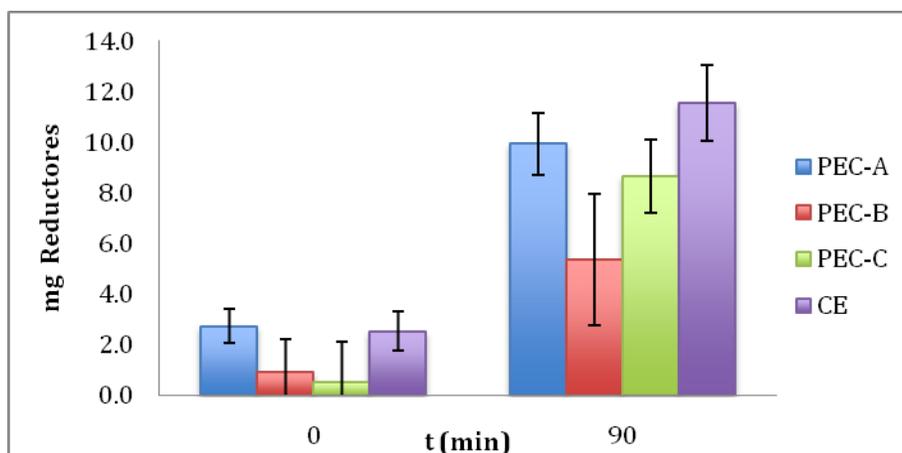


Figura 32. Determinación de los Azúcares reductores liberados por la actividad enzimática para el jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min. Cada valor es un promedio de 4 mediciones*.

Como resultado del incremento de los azúcares reductores en el jugo filtrado después del tratamiento enzimático se esperaba un incremento de los azúcares totales cuantificados, por lo que el aumento de la cantidad de azúcares totales en el jugo que se aprecia en la Figura 33 fue debido a la liberación de los azúcares de los polisacáridos despolimerizados por el tratamiento enzimático pero también por la liberación de azúcares contenidos en las células de la fruta que son disgregadas por las enzimas adicionadas. Cabe señalar que los azúcares totales mostrados están dados únicamente por el efecto del tratamiento enzimático porque les fueron restados los controles correspondientes.

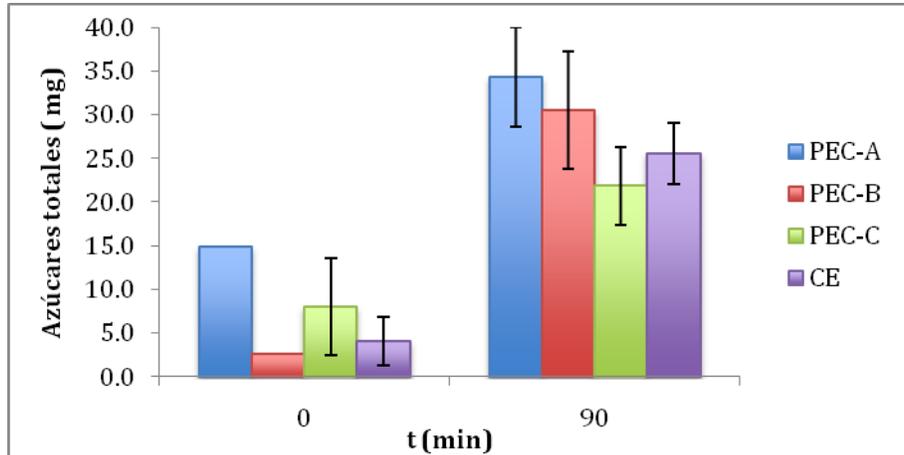


Figura 33. Determinación de los azúcares totales del jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min. Cada valor es un promedio de 4 mediciones*.

Se determinó el porcentaje de sólidos residuales de la filtración del jugo de naranja tratado enzimáticamente. Según se observa en la Figura 34, hubo una disminución de los sólidos residuales de la filtración de jugo de naranja, lo que indica que el tratamiento enzimático si tuvo efecto sobre los componentes de la pared celular, permitiendo una mayor filtración y por ende un aumento en el rendimiento de jugo obtenido.

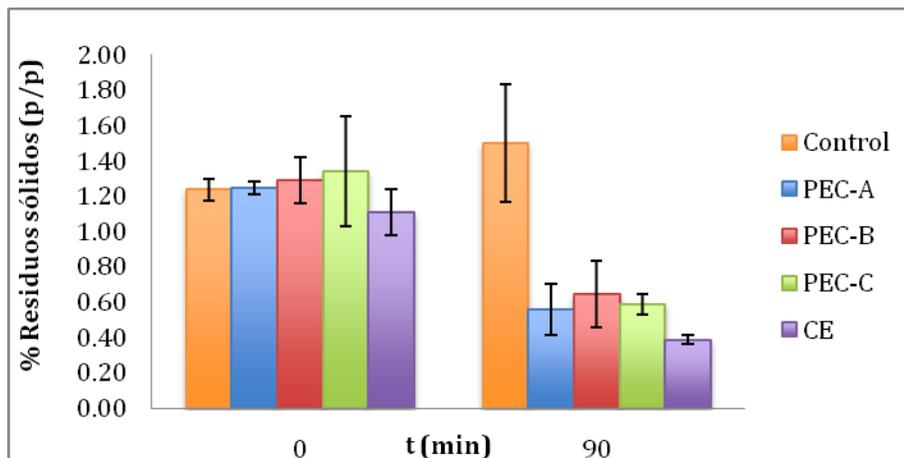


Figura 34. Determinación del % de los residuos sólidos del jugo de naranja tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min. Cada valor es un promedio de 2 mediciones*.

Se midió el porcentaje de sólidos solubles provenientes de la fruta del jugo de naranja filtrado y se expresaron como grados Brix (°Bx). En la Figura 35 se observaron los resultados de las

mediciones al tiempo cero y a los 90 min del tratamiento enzimático. Hubo un incremento moderado de los sólidos solubles después del tratamiento enzimático, este incremento fue dado por la solubilización del ácido galacturónico y otros azúcares como la xilosa y glucosa liberados por la actividad enzimática de los polisacáridos despolimerizados. El control se mantiene prácticamente constante lo que indica que el cambio está dado exclusivamente por el tratamiento con los concentrados enzimáticos.

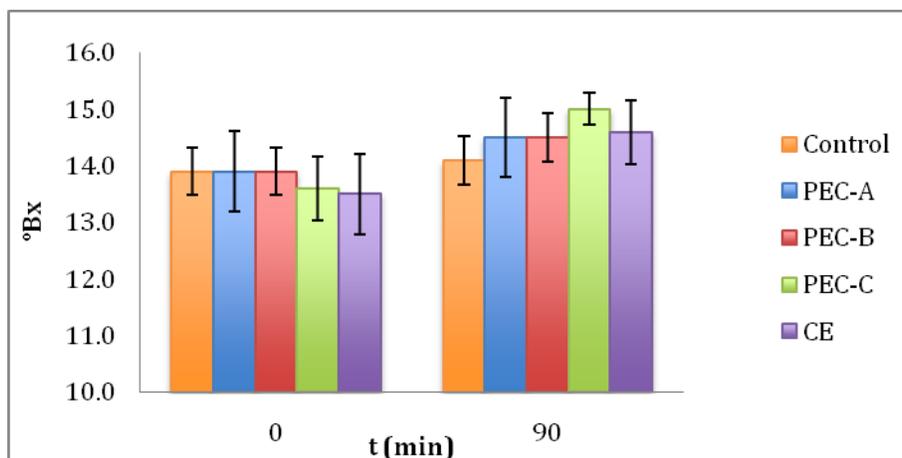


Figura 35. Determinación de los sólidos solubles del jugo tratado con los extractos enzimáticos a 45°C por 90 min. Cada valor es un promedio de 2 mediciones*.

La pectina puede ser extraída en agua caliente a ebullición de los sólidos insolubles en alcohol (Sinclair y Crandall, 1951) . Y como la mayor parte de la materia seca de la pulpa es soluble en alcohol al 80% y se hizo un lavado de las muestras con dicho reactivo, entonces la mayoría de los constituyentes solubles como los azúcares, aminoácidos, aceites esenciales, glucósidos fueron extraídos.

Debido a este tratamiento de la muestra de jugo, se podría considerar como pectina a los residuos obtenidos mediante la metodología utilizada, pero se reporta como sólidos insolubles en alcohol.

La Figura 36 muestra los resultados de la cuantificación de los sólidos insolubles en alcohol (AIS) después del tratamiento enzimático del jugo de naranja y se observa que disminuyeron en todos los casos , pero se favoreció un poco más con el tratamiento de la PEC-A, mientras que el EC de *A. flavipes*, la PEC-B y PEC-C también lo favorecen y se asemejan mucho entre sí. Es evidente que el control también muestra un ligera disminución lo que se puede explicar por

la actividad enzimática de las enzimas endógenas de la naranja.

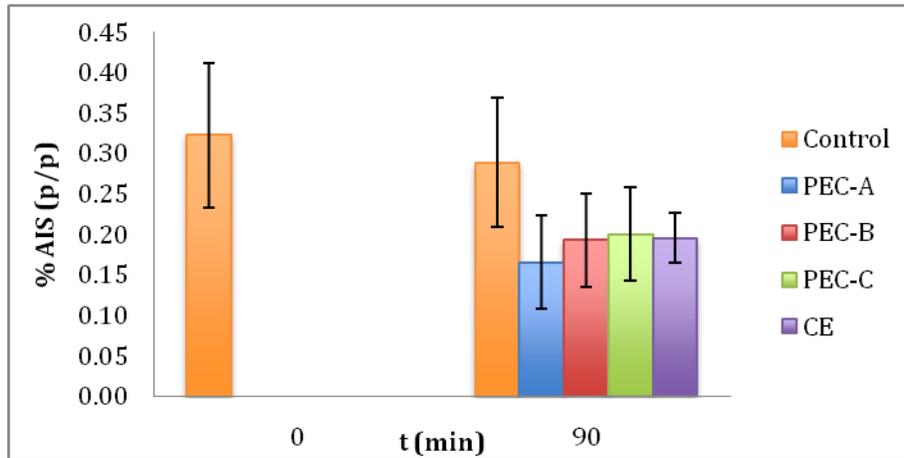


Figura 36. Determinación de los sólidos insolubles en alcohol del jugo tratado con los extractos enzimáticos a 45°C durante 90 min. Cada valor es un promedio de 2 mediciones*.

6.4 Discusión General

Se produjo un CE con suficiente actividad pectinolítica para el mejoramiento del rendimiento de filtración de jugo de naranja por tratamiento enzimático comparable con preparaciones enzimáticas disponibles comercialmente. Para obtenerlo, se desarrolló un proceso fermentativo en lote de producción de enzimas pécticas a expensas de la degradación de cáscara de limón deshidratada que constituye por sí misma un sustrato adecuado para la producción de enzimas pectinolíticas por *A. flavipes* en fermentación sumergida.

Se encontró que el pH es muy importante para la producción de pectinasas siendo mejor a condiciones de pH ácidos y la concentración de sustrato óptima es de 2%.

Los parámetros experimentales para el crecimiento del hongo y la producción de pectinasas en matraces de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo líquido fueron: pH = 3.2, inóculo de 1×10^6 esporas/mL con incubación a 37°C, 200 rpm en agitación recíprocante por 72 h.

El concentrado enzimático obtenido por ultrafiltración a partir del filtrado libre de células tuvo una actividad endopectinolítica de 585.5 U/mL que se deterioró por el almacenamiento hasta 267.8U/mL, pero que aún con el decaimiento de la actividad, tuvo cuarenta veces más actividad endopectinolítica que los primeros filtrados obtenidos en otras condiciones de producción.

Por medio de los geles de electroforesis se observó el perfil de proteína de cada uno de los concentrados enzimáticos estudiados, encontrando que son distintos, pero sin embargo, parecen compartir algunas proteínas en común. Hubo actividad pectinolítica y xilanolítica en todos los concentrados. Para el CE de *A. flavipes*, no se detectó actividad de pectinesterasas lo que puede ser positivo debido a que no se generaría metanol por la acción de dichas enzimas y esta particularidad es muy valorada en las preparaciones enzimáticas generadas por microorganismos.

Se agregó 1 mL de los concentrados enzimáticos, estandarizados a una actividad endopectinolítica de 267.8 U/mL, a los lotes de 1 L de jugo incubándolos a 45°C durante 90 min y se observó el efecto de tratamiento enzimático de cada uno de los concentrados sobre el jugo. Para ello se hicieron pruebas de filtración a los lotes de jugo tratado encontrando que la PEC-A es la que tuvo un mayor impacto en el mejoramiento del rendimiento con un 54.24% , y en segundo lugar se encuentra el CE de *A. flavipes* con un 46.61%. La PEC-B y la PEC-C tuvieron

un mejoramiento en el rendimiento de 37.29% y 38.98% respectivamente.

Con respecto a la velocidad de reducción de la viscosidad, que indica indirectamente la despolimerización de la pectina por el tratamiento enzimático, la PEC-A tuvo una reducción de la viscosidad mayor, y el CE lo secunda. La PEC-B y la PEC-C están a la par en tercer lugar, lo que fue congruente con los resultados de las pruebas de filtración.

La claridad es un parámetro de calidad importante, y debido al tratamiento enzimático se aumentó la claridad del jugo en todos los casos y se esperó que hubiera una mayor estabilidad del jugo filtrado.

El pH no se modificó con el tratamiento enzimático en ninguno de los casos. En cambio la acidez total aumentó ligeramente con el tratamiento de todos los concentrados enzimáticos y se asumió que el ligero incremento está dado por la liberación de unidades de ácido galacturónico.

Con respecto a la cuantificación de azúcares reductores liberados por la actividad enzimática, se encontró que se aumentó la cantidad de azúcares reductores después del tratamiento enzimático lo que indica que hubo liberación de azúcares reductores por la acción de las enzimas de los concentrados enzimáticos. El CE de *A. flavipes* parece ser el concentrado enzimático que más libera azúcares reductores por lo que podría haber contado con una buena actividad de enzimas de tipo exo.

Debido al aumento en la cantidad de los azúcares reductores por el tratamiento enzimático hubo una mayor cantidad de azúcares totales determinada en el jugo filtrado al finalizar el tratamiento enzimático con los concentrados.

Hubo una disminución notable de los sólidos residuales, lo que se comprueba con el aumento del rendimiento de la filtración de jugo de naranja por una menor retención de componentes de la pared celular en el filtro.

El porcentaje de sólidos solubles (°Bx) del jugo filtrado se incrementó moderadamente con el tratamiento enzimático, por la solubilización del ácido galacturónico y otros azúcares como la xilosa y glucosa liberados por la actividad enzimática.

Los sólidos insolubles en alcohol después del tratamiento enzimático del jugo disminuyeron en todos los casos, favoreciéndose un poco más con el uso de la PEC-A, lo que es congruente con el mejoramiento en el rendimiento de obtención de jugo por filtración.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

Para *A. flavipes* el pH inicial del medio de cultivo determina la producción de las pectinasas. Tanto las endo como las exo-pectinasas son producidas en mayor cantidad a un pH inicial de 3.0.

Se obtuvo la máxima actividad endopectinolítica de 585 U/mL por FS en medio líquido con cáscara de limón al 2% en condiciones de pH 3.2, 37°C, 200 rpm en movimiento recíprocante utilizando a *A. flavipes* como productor de pectinasas.

Se encontró una gran actividad enzimática de exo- y endo-pectinasas principalmente, pero también de xilanasas, pectinliasas, y carboximetilcelulasas tanto para el CE de *A. flavipes* como para las preparaciones enzimáticas comerciales. El CE de *A. flavipes* tuvo la producción de pectin y pectato liasas más elevada de todos los concentrados enzimáticos, siendo un recurso muy valioso por ser enzimas muy apreciadas comercialmente para el tratamiento de jugos.

Se observaron los perfiles electroforéticos de los concentrados enzimáticos y se puede afirmar que hubo actividad pectinolítica y xilanolítica en todos los concentrados enzimáticos por la presencia de bandas características en los zimogramas de actividad realizados. Se cree que hubo la presencia de algunas de las mismas enzimas en diferentes concentrados enzimáticos evaluados.

El CE de *A. flavipes* presentó actividades pectinolíticas muy elevadas y en las pruebas de filtración se encontró que, de los concentrados enzimáticos evaluados, fue el segundo mejor concentrado enzimático para aumentar el rendimiento de obtención de jugo de naranja después de la PEC-A. La PEC- B y la PEC-C fueron menos efectivas en ese sentido.

Todos los concentrados enzimáticos mejoraron características sensoriales como la claridad y la acidez, y aumentaron la cantidad de sólidos solubles. En cambio, disminuyeron la cantidad de azúcares insolubles en alcohol relacionados con la cantidad de pectina.

El tratamiento enzimático del jugo de naranja con las preparaciones enzimáticas comerciales tuvo un efecto positivo, pero tomando en cuenta que el CE de *A. flavipes* aún se puede optimizar, se concluye que tiene un gran potencial para aplicaciones en la industria de cítricos.

CAPÍTULO 8. PERSPECTIVAS

Con el presente estudio se ha determinado que las enzimas pectinolíticas de *A. flavipes* actúan eficientemente con respecto a las preparaciones enzimáticas disponibles comercialmente para llevar a cabo la degradación de la pectina, facilitando la filtración del jugo de naranja durante su procesamiento.

En un futuro se puede estudiar el efecto del almacenamiento de los CE a temperaturas de ultracongelación así como el uso de estabilizantes para evitar la pérdida de actividad enzimática por efecto del almacenamiento.

Sería también interesante realizar la purificación de las enzimas pectinolíticas de *A. flavipes* para determinar el efecto que tiene cada una en el jugo y luego hacer mezclas de enzimas bien identificadas para observar si existe un sinergismo que permita mejorar la eficiencia del tratamiento enzimático.

Asimismo, es posible hacer el tratamiento enzimático de otros jugos de cítricos, como el de limón o el de toronja, e incluso de otros frutos ricos en pectina para evaluar el efecto que tiene sobre ellos.

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abarca, Ma. Lourdes. "Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial". *Revista Iberoamericana de Micología*, no. 17 (2000): S79.
2. Albersheim, P.; Darvill, G.A.; O'Neil, M.A.; Schols H.A.; Voragen A.G.J. *An Hypothesis: The same Six Polysaccharides are Components of the Primary Cell Walls of All Higher Plants*. Vol. 14, de *Pectins and Pectinases*, edited by J. Visser y A.G.J. Voragen, 47-53. Elsevier Science, 1996.
3. Alkorta, Itziar; Garbisu, Carlos; Llama, María J.; Serra, Juan I. «Industrial applications of pectic enzymes: a review.» *Process Biochemistry* (Elsevier Science) 33 (1 1998): 21-28.
4. Álvarez, Elena Maria; Trejo-Aguilar, Blanca; Aguilar, Guillermo. «Utilización de residuos de Tamarindo como Fuente de Carbono para la producción de enzimas.» Cartel, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, Puerto Vallarta, 2003.
5. Arroyo Orbegoso, Alexis Germán. *Producción de enzimas Pectinasas por Actinomicetos en Cultivo Sumergido utilizando Pectina y Cáscara de Naranja*. Tesis de Maestría, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Tesis Digitales UNMSM, 2002.
6. Augustí Fonfría, Manuel. *Citricultura*. 2a. Edición. Madrid: Mundi-Prensa Libros, 2003.
7. Baraona Cockrell, Marcia; Sancho Barrantes, Ellen. *Cítricos Fruticultura Especial*. Vol. 1. San José: EUNED, 2000.
8. Barret, Diane. *Processing Fruits. Science and Technology*. 2nd Edition. CRC Press, 2005.
9. Beldman, G.; Mutter M.; Searle-van, Leeuwen; van den Broek, L.A.M.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. «New Enzymes active towards pectic structures.» In *Pectins and Pectinases*, edited by J. Visser y A.G.J. Voragen, 231-245. Elsevier Science, 1996.
10. Benen, Jacques A.E.; Van Alebeek, Gert-Jan W.M.; Voragen, Alphons G. J.; Visser, Jaap. *Pectic Esterases*. Vol. 68, in *Handbook of Food Enzymology*, edited by John R. Whitaker, Alphons G.J. Voragen y Dominc W.S. Wong, 830-837. New York: Marcel Dekker Inc., 2003.
11. Berlitz, H.D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Food Chemistry*. Cuarta edición. Leipzig: Springer, 2009.

-
12. Biely, Peter. *Xylanolytic Enzymes*. Vol. 71, in *Handbook of Food Enzymology*, edited by John R. Whitaker, Alphons G.L. Voragen y Dominic W.S. Wong. New York: Marcel Dekker Inc., 2003.
 13. Boylston, Terri D. «Fruit Juices.» In *Handbook of Food Products Manufacturing*, edited by Y. H. Hui, 847-866. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. , 2007.
 14. Calvo, Ana M. «Mycotoxins.» In *Toxins in food*, edited by Waldemar M. Dabrowski y Zdzislaw Sikorski, 220-344. Florida: CRC Press, 2005.
 15. Camperi, Silvia A.; Hours, Roque A.; Auday, Ruth M.; Miranda, Maria Y.; Cascone, Osvaldo; Navarro del Cañizo, Agustín. «Jugos de Fruta sin Metanol.» *Ciencia Hoy* (Asociación Civil Ciencia Hoy) 6, nº 33 (1996).
 16. Cano, Araceli. «Jugos al alza» *Expansión* , 10 de febrero de 2006.
 17. Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario. «Diario Oficial de la Federación.» *Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009, Jugo de frutas preenvasadas-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba*. 28 de agosto de 2009. Disponible en: <http://www.dof.gob.mx> (último acceso: 27 de enero de 2011).
 18. Consejo Citrícola Mexicano. «Estudio Orientado a identificar las necesidades de Infraestructura logística en la cadena de suministro de cítricos para la exportación de jugo a los mercados meta identificados.» SAGARPA. Octubre de 2009. <http://www.sagarpa.gob.mx> (último acceso: 20 de enero de 2011).
 19. Contreras Esquivel, Juan Carlos. «Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*.» Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, Argentina, 2003, 60.
 20. DeBoy, Robert; Mongodin, Emmanel; Fouts, Derrick; Tailford, Louise; Khouri, Hoda; Emerson Joanne; Mohamoud, Yasmin; Watkins, Kisha; Henrissat, Bernard; Gilbert, Harry; Nelson, Karen. «Insights into plant cell wall degradation from the genome sequence of the soil bacterium *Cellvibrio japonicus*.» *Journal of bacteriology*. 190 (15) (Agosto 2008): 5455 - 5463.
 21. Dhillon, Satvinder Singh; Kaur Gill, Rajwant; Singh Gill, Sikander; Singh, Malkiat. «Studies on the utilizaton of citrus peel for pectinase production using fungus

-
- Aspergillus niger*.» *Intern. J. Environ. Studies* (Taylor & Francis) 61(2) (Abril 2004): 199-210.
22. Díaz Godinez, Gerardo. "Comparación de la Producción de las enzimas Exopectinasas de *Aspergillus niger* obtenidas por Fermentación Sólida y Sumergida." Tesis de Doctorado, UAM, 2001.
23. Do Nascimento Nunes, Maria Cecília. *Color Atlas of Postharvest Quality of Fruits and Vegetables*. Iowa: Blackwell Publishing, 2008.
24. Dubois, Michel; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, Fred. «Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances.» *Analytical Chemistry* 28 (March 1956): 350-356.
25. FAO. «FAOSTAT 2008.» *FAO Bases y conjuntos de datos*. Disponible en <http://www.faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (último acceso: 08 de mayo de 2011).
26. FAO y OMS. «Codex para la Naranja.» En *Codex Alimentarius: Frutas y hortalizas Frescas*, de Comisión del Codex Alimentarius, 86-92. Roma, 2007.
27. García Jiménez, Mayahuel. "Efectos de agentes oxidantes en la producción de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus flavipes* FP-500" Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, UNAM, 2009, (22).
28. Gruben, B.S.; Vries, R.P. "Advances in pectinolytic enzymes, genes and regulation in *Aspergillus*." In *Pectins and Pectinases*, edited by R.G.F. Vieser y A.G.J. Voragen, 20-21, 24, 101-113. Wageningen Academic Publishers, 2009.
29. Höhn, Alberecht; Sun, Daqing; Nolle, Francois. «Enzymes in the Fruit Juice and Wine Industry.» In *Processing Fruits: Science and Technology*, 97-107. CRC Press, 2005.
30. Hogg, Stuart. *Essential Microbiology*. John Wiley & sons, 2005.
31. INEGI. «Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007.» *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. 2007. Disponible en <http://www.inegi.org.mx> (último acceso: 16 de enero de 2011).
32. Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. «Applications of pectinases in the commercial sector: a review.» *Bioresouce Technology* (Elsevier Science) 77 (2001): 215-277.

-
33. Levin, Robert E. «Food Microbiology.» In *Food Biotechnology*, edited by Kalidas Shetty, Gopinadhan Paliyah y Anthony Pometto, 26-40. Boca Raton , Florida: Taylor & Francis Group, 2006.
 34. Lozano, Jorge E. *Fruit Manufacturing. Scientific Basis, Engineering Properties, and Deteriorative Reactions of Technological Importance*. Edited by Gustavo V. Barbosa-Cánovas. Springer, 2006.
 35. Luppó, Edens; Hong, Tan; Lambers, Johanes; Wilhelmus, Jacobus. Utilización de composiciones que comprenden enzimas estabilizantes . España Patente ES 2 237 789 T3. 01 de 08 de 2005.
 36. Madrigal Peralta, Domingo; López Vázquez, Ramón; López Jarquin, Silvia. «Aprovechamiento de desperdicios del beneficio del limón.» Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, AIDIS. Consolidación para el Desarrollo, DF, 1996.
 37. Martínez Trujillo, María Aurora. «Estudio Cinético de la producción secuenciada de pectinasas en *Aspergillus flavipes* FP-500» Tesis Doctoral, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, D.F, 2009, 15-16.
 38. Mutlu, Mehmet; Sarioglu, Kemal; Demir, Nilay; Ercan, Meral T.; Arcar, Jale. «The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity.» *Journal of Food Engineering* (Elsevier Science) 41 (1999): 147-150.
 39. Nip, W. K. «Food Biochemistry-An Introduction.» In *Food Chemistry and Food Processing*, edited by Y.H. Hui, 17. Blackwell Publishing, 2006.
 40. Oluremi, O. I. A.; Andrew, I. A.; Ngi, J. «Evaluation of the Nutritive Potential of the Peels of some Citrus Fruit Varieties as Feedingstuffs in Livestock Production.» *Pakistan Journal Nutrition* (Asian Network for Scientific Information) 6, nº 6 (2007): 653-656.
 41. Pandey, Ashok; Ramachandram, Sumitra. "Process Developments in Solid-State Fermentation for Food Applications." In *Food Biotechnology*, edited by Kalidas Shetty, Gopinadhan Paliyath, Anthony Pometto and Robert E. Levin, 116. Taylor & Francis Group, 2006.
 42. Praaning, Danielle P. *Regulatory Issues of Enzymes Used in Foods from the Perspective of the E.U. Market*. Vol. 6, in *Handbook of Food Enzymology*, edited by John R. Whitaker, Alphons G.L. Voragen y Dominic W.S. Wong. New York: Marcel Dekker Inc., 2003.

-
43. Ralet, M.C.; Thibault, J.F. «Hydrodynamic properties of isolated pectin domains: away to figure out pectin macromolecular structure?» In *Pectins and Pectinases*, edited by H.A. Schols, R.G.F. Visser y A.G.J. Voragen, 37. Wageningen Academic Publishers, 2009.
 44. Rai, P.; Majumdar, G.C.; Das Gupta, S.; De, S. «Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology» *Journal of Food Engineering* (Elsevier) 64 (2004): 397-403.
 45. Rai, P.; De, S. «Clarification of pectin-containing juice using ultrafiltration» *Current Science* 96 (May 2009): 1361-1371.
 46. Raju, P. S.; Bawa, A. S. «Food Additives in Food Processing.» In *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, edited by Y. H. Hui, 166. Iowa: Blackwell Publishing , 2006.
 47. SAGARPA. *México, el quinto productor mundial de cítricos*. Prod. Sala de Prensa del Gobierno Federal. DF: Presidencia de la República, 5 de junio de 2009.
 48. Samson, Robert A. *Taxonomy - current concepts of Aspergillus systematics*. Vol. 7, in *Aspergillus*, edited by J.E. Smith, 1-22. New York: Plenum Press, 1994.
 49. Sandhu, Kulwant S.; Minhas, Kuldeep S. *Oranges and Citrus Juices. Handbook of Fruits and Fruit Processing*, edited by Hui Y.H. Iowa: Blackwell Publishing, 2006.
 50. Schols, H.A.; Voragen, G. J. *Pectic Polysaccharides*. Vol. 66, In *Handbook of Food Enzymology*, edited by John R. Whitaker, Alphons G. J. Voragen y Dominic W.S. Wong. New York: Marcel Dekker Inc., 2003.
 51. Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. «Complex Pectins: Structure elucidation using enzymes.» In *Pectins and Pectinases*, edited by J. Visser y A.G.J. Voragen, 3-19. Elsevier Science, 1996.
 52. Sinclair, Walton B.; Crandall, Paul R. «Alcohol-Insoluble solids of Juice Vesicles and Pulp of Citrus Fruit.» *Botanical Gazette* (The University of Chicago Press) 113, nº 2 (Diciembre 1951): 106-119.
 53. Singh Jayani, R.; Saxena, S.; Gupta, R. (2005). «Microbial pectinolytic enzymes: a review.» *Process biochemistry* (Elsevier Science) 40 (2005): 2931-2944.
 54. Smith, J.E. *Aspergillus Biotechnology Handbooks*. Vol. 7. New York: Plenum Press, 1994.
 55. Soriano Lasheras, Margarita. "Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos" Tesis Doctoral, Facultad de Biología Departamento de Biología, Universidad de Barcelona, 2004, (3-4).

-
56. Tenkanen, Maija; Niku-Paavola, Marja-Leena; Linder, Markus; Viikari, Liisa. *Cellulases in Food Processing*. Vol. 62, In *Handbook of Food Enzymology*, edited by John R. Whitaker, Alphons G.J. Voragen y Dominic W.S. Wong. New York: Marcel Dekker Inc., 2003.
 57. USDA. « Oranges, raw, California, valencias» National Nutrient Database for Standard Reference. 2010. Publicación 23. Disponible In <http://www.nal.usda.gov> (último acceso: 6 de mayo de 2011).
 58. Vasquez, R.; Ruesga, L.; D'addosio, R.; Páez, G.; Marín, M. «Extracción de pectina a partir de la cáscara de plátano (Musa AAB, subgrupo plátano) clon Hartón» *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 25 (2008): 318-333.
 59. Venkatesh, K.S.; Umesh-Kumar, S. "Production of Pectinases and Utilization in Food Processing." In *Food Biotechnology*, edited by Shetty Kalidas, Gopinadhan Paliyath, Anthony Pometto y Robert E. Levin, 348, 352. Taylor and Francis Group, 2006.
 60. Victoria Acosta, Georgina. "Producción, purificación y caracterización de endopoligalacturonasa de *Aspergillus flavipes* FP-500" Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, UNAM, 2007, (31).
 61. Wainwright, M. *Introducción a la Biotecnología de los hongos*. Acribia, 1995.
 62. Whitaker, John R. *Regulatory Issues of Food Enzymes used in the United States*. Vol. 7, Yegres, Sorana; Sánchez, José; Belmar, Mario; Riveros, Wallis; Belmar, Daniel. «Producción de enzimas pécticas. Ensayos Preeliminarios.» (Saber, Universidad de Oriente) 13 (2001): 55-59.

CAPÍTULO 10. ANEXOS

10.1 Anexo A: Preparación de Soluciones

Medio basal: Disolver 2.0 g de KH_2PO_4 , 2.0 g de K_2HPO_4 , y 5.0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 800 mL de agua destilada. Aforar a 1 L y conservar en refrigeración.

Solución amortiguadora de acetatos 100 mM, pH=5.0: Agregar 5.8 mL de ácido acético glacial a 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 5.0 con una solución de NaOH 5M. Aforar a 1 L con agua destilada.

Preparar ácido acético 2N (116 mL de ácido acético glacial en 1 L de agua destilada).

Buffer de acetatos 0.2N con NaCl al 3% (p/v), pH=4.2: Tomar 100 mL de ácido acético 2N, adicionar 30g de NaCl (800 mL H_2O) agitar, llevarlo a 1000 mL, ajustar antes de aforar a pH =4.2

Pectina 1% pH=4.2: Pectina 1g disolver en 80 mL de agua. Adicionar 4.0 mL de buffer de acetatos pH=4.2, Ajustar a pH=4.2. Aforar a 100 mL.

DNS: Disolver 14.0 g de NaOH, 7.5 g de DNS, 100 g de tartrato de sodio y potasio, 5.4 g de fenol y 5.9 g de metabisulfito de sodio en 1 L de agua destilada, agregando uno a uno en orden hasta su disolución total.

10.2 Anexo B: Composición proximal de la cáscara de limón deshidratada

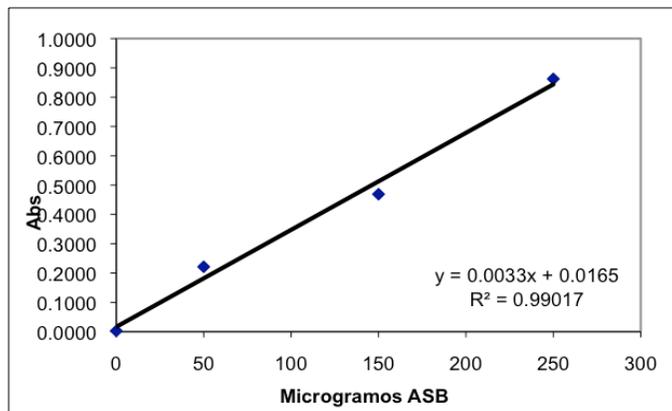
Tabla 7. Constituyentes proximales de la cáscara de limón deshidratada

Constituyente	% MS
Materia seca	89.35
Proteína cruda	9.30
Fibra cruda	14.94
Extracto etéreo	2.77
Cenizas	5.18
Extracto libre de nitrógeno	67.83

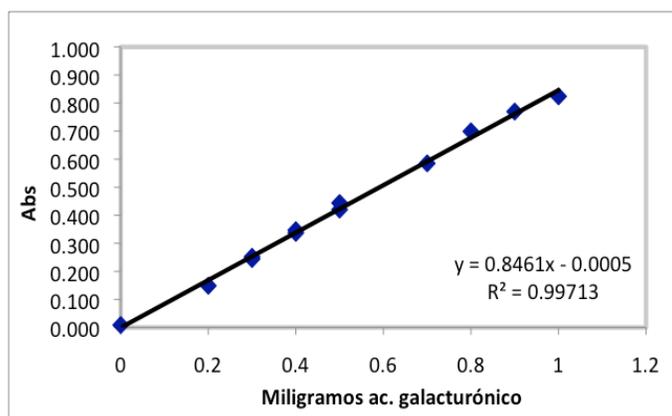
Fuente: (Oluremi, et al. 2007)

10.3 Anexo C: Curvas Estándar

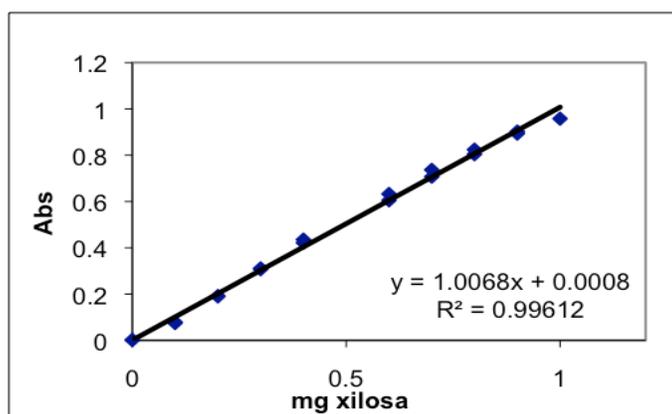
10.3.1 Curva patrón de 0 – 250 microgramos albúmina bovina sérica por el método de Bradford.



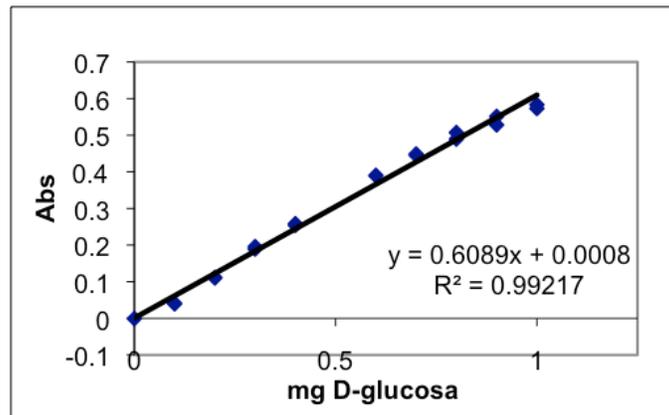
10.3.2 Curva patrón de 0 - 1mg de ácido galacturónico por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).



10.3.3 Curva patrón de 0 - 1mg de xilosa por el método DNS.



10.3.4 Curva patrón de 0 - 1mg de D-glucosa por el método DNS.



10.3.5 Curva patrón de 0 – 40 μ g de ácido galacturónico por el método fenol-sulfúrico.

