



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Aplicación de las enzimas xilanolíticas y pectinolíticas producidas por *Aspergillus flavipes* FP-500 en el procesamiento de jugos cítricos.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

GINA PACHECO ARREDONDO

MÉXICO, D.F.

2012



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	Olga del Carmen Velázquez Madrazo
VOCAL	Arturo Navarro Ocaña
SECRETARIO	José Guillermo De Jesús Aguilar Osorio
1° SUPLENTE	Beatriz Ruíz Villafan
2° SUPLENTE	Jorge Arturo Aburto Anell

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:

Gina Pacheco Arredondo

Este proyecto se realizó con el apoyo del subprograma 127 “Formación básica en investigación” de la Facultad de Química, UNAM, en el periodo agosto 2010 agosto 2011.

A mis papas y hermanos.

Porque todo se puede, solo falta esforzarse lo suficiente.

Agradecimientos

Primero me gustaría agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por formar profesionistas tan exitosos, por permitirme vivir una gran etapa en mi vida y porque ahí conocí grandes amigos y personas, también por enseñarnos que la vida no es fácil pero se puede conseguir lo que queramos mientras nos esforcemos

A la Facultad de Química y a sus maestros, por todo lo que me han enseñado y seguirán enseñando, por los grandes momentos que pase dentro de ella y con los maestros, por todos los laboratorios y clases, que aunque me provocaban desvelos me divertí y aprendí mucho de ellos. En especial al Dr. Guillermo por aceptarme en su grupo cuando no había espacio y enseñarme tanto, por ser tan paciente conmigo y tratar de comprenderme; por las oportunidades y el apoyo incondicional, consejos e incluso amistad. A la Maestra Olga, con la que compartí distintas etapas durante mi estancia en la facultad desde el inicio como mi tutora y hasta el final como parte del jurado, por siempre obligarme a ser mejor y no quedarme en el mínimo esfuerzo. A la profesora Martha Giles quien hizo que me enamorara de la microbiología en todas sus presentaciones.

A mis amigos de la facultad, Jairo, Mario, Copi, Chuy, Oldais, Ruben, Will, Paz, Xóchitl, Jesica, Anahí, Diana, Mariana, Eilly, Chio, Fosi, Patty, Patti ingeniera y Christopher quienes fueron grandes consejeros y con quienes compartí grandes experiencias la mayor parte de mi carrera, y que espero seguir frecuentando y recordando tantos buenos momentos. A Daniel Santaella, como olvidar esos días en el lab de orgánica y la amistad que surgió después =). A Benjamín! Por ser un verdadero amigo, por tantas cosas que compartimos y porque sé que aunque ya no nos veamos tan seguido siempre seremos amigos te quiero!. A todos mis compañeros Q.A.s que compartieron en algún momento alguna clase y su amistad conmigo, Tany y Dianita gracias!.

A Mari Jose y Violeta mis grandes amigas quienes a pesar de separarnos durante años siempre estuvieron ahí para mí, con quienes compartí tantas cosas en la infancia que hoy nos sirven para alegrar los días tristes y felices. A Daniela y Adriana que también estuvieron presentes aunque hoy ya no nos frecuentamos.

A mis muy queridos amigos Anna, Daniel, Terry, Damián y Groidan. Por regalarme uno de los mejores veranos que he tenido, con tantas risas y tristezas, por abrir sus corazones a gente que no conocían. Espero algún día estemos todos juntos recordando. Dani gracias por todos los viajes, por vivir conmigo los mejores y peores momentos, por apoyarnos a Chezz y a mí en todo. Annita! Que haría sin tu amistad! Si ese 15 de septiembre y el Vasito blanco, que grato es tenerte de vuelta.

A Alan Flores, Irak, Lore y Diego por esos excelentes días de ensayo y la amistad que surgió. Por soportarme y escucharme, por su opinión sincera.

A Julián y Fernanda, por entrar en mi vida hace un año y ser tan grandes amigos, por el apoyo y ánimo que siempre me echaron, por esas risas y bailes en clase, por enseñarme tanto.

A Jon lo mejor que me llevo de la facultad, además de los amigos, gracias por ser lo que eres fuiste y serás, por permitirme ser parte de tu vida y aceptar entrar a la mía, por enseñarme un mundo que no conocía donde todo es posible, por presentarme a los que hoy son nuestros amigos, el apoyo cuando mas lo necesite. Por hacerme ver que no todo es como yo lo quiero y ser paciente. Por esa gran amistad que tenemos y que seguirá pase lo que pase. Te amo!

A Oboe, una persona tan especial en todos los sentidos, un gran amigo y confidente, un excelente hermano. Gracias por todos esos maravillosos momentos de diversión y risas :D. A Adal una persona muy especial para mí! Gracias primo por todos los momentos tan geniales que hemos pasado, por siempre ser muy honesto conmigo sin temor a nada, por siempre estar ahí sin esperar nada a cambio.

A mis papas, los mejores del mundo!, gracias por todo el apoyo y todo lo que me han dado, por ser un ejemplo a seguir y enseñarme a luchar siempre, por demostrarme que

todo es posible mientras sepas lo que quieres y luches por ello hasta lograrlo. Gracias por acompañarme en mis desveladas y ayudarme para acabar mis trabajos, por darme su opinión sobre ellos por decirme en que estoy mal y celebrar mis triunfos, por enseñarme a no conformarme con lo mas simple sino ver mas allá, a explotar mi potencial y mis cualidades, a reconocer mis defectos

A mis tíos Ángel y Charly, por estar con nosotros siempre, apoyarnos y consentirnos, son los mejores tíos. Gracias por todos esos recuerdos que tengo de mi infancia, todos los juegos que inventaron y compartieron con nosotros, por hacer todo para reunir a la familia y conocer a la parte perdida, por procurarnos. Los quiero.

A mis hermanos, que aunque no somos los más unidos sabemos que siempre estaremos para apoyarnos, celebrar triunfos y cuidarnos. Porque nunca nos faltemos al respeto. Por todos los recuerdos divertidos y de pleitos. Por las peleas con lechugas y porque siempre estemos juntos. Gracias hermanos por aguantarme y acompañarme en mis desvelos.

A mis abuelos porque sin ellos no estaría aquí. A la Abuela Alma por preocuparse por mí y por mi trabajo, por tratar de saber más del tema y entenderlo. A la tata que aunque no este aquí se quedo en mi y jamás podremos olvidar su tortilla de papa, ni esos días que nos daba cocas de vidrio.

A la familia Pacheco que aunque un poco perdida siguen al pendiente. A la familia Arredondo que aunque distantes conocen mi trabajo y lo reconocen. A todos mis primos que aunque no nos frecuentemos sé que ahí estarán.

A Martha y Martin por preocuparse por mi e interesarse en mis proyectos de vida, por sus concejos. A toda la familia Salgado: Leti, Kike, Enrique Meza, Jakie, Ricardo, Jazmín, Alejandro, Adalberto, Isabel, Samuel, Abraham, Roberto, Adal, Diego y Kikin por tantos momentos y experiencias que hemos compartido, por aceptarme en su familia y hacerme sentir como uno mas de ustedes. A la Sra. Maggi por cuidar tanto de su familia y asegurarse que todos sean gente de provecho, por todos los detalles que ha tenido conmigo y preocuparse por mí.

A mis compañeras de laboratorio que tanto me apoyaron y ayudaron, gracias por todas las risas y paciencia, espero algún día nos volvamos a encontrar.

A toda la gente que ha formado parte de mi vida en algún momento y que se ha ido, separado o siguen cerca de mi y no lo he notado y a tantas otras personas que me es imposible nombrar, solo me queda decir Gracias porque sin ustedes no sería quien soy.

A todos los que lean esto por que no sea un libro mas abandonado en la biblioteca, espero les sirva.

CONTENIDO	Página
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
CAPÍTULO 1. Introducción	5
CAPÍTULO 2. Marco teórico	6
2.1 Hongos filamentosos	6
2.2 <i>Aspergillus spp.</i> , generalidades	6
2.2.1 <i>Aspergillus flavipes FP-500</i>	8
2.3 Las frutas cítricas	10
2.3.1 Generalidades de los frutos cítricos	11
2.3.2 Limón Persa	12
2.3.3 Toronja Sangría	13
2.3.4 Composición de la pared celular de los frutos cítricos	14
2.4 Las enzimas	16
2.4.1 Pectinasas o enzimas pectinolíticas	16
2.4.2 Xilanasas o enzimas xilanolíticas	19
2.4.3 Aplicaciones en la industria de las enzimas	20
2.5 Proceso de elaboración del jugo comercial	21
CAPÍTULO 3. Justificación	24
CAPÍTULO 4. Objetivos	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos particulares	25
4.3 Hipótesis	26

CAPÍTULO 5. Metodología	27
5.1 Microorganismo	27
5.1.1 Preparación del inóculo: suspensión de esporas	27
5.2 Condiciones de cultivo y medios utilizados	28
5.3 Obtención y concentración del filtrado libre de células.	28
5.4 Caracterización de los concentrados enzimáticos y enzimas comerciales	29
5.4.1 Cuantificación de proteína por el método de Bradford	29
5.4.2 Determinación de actividades enzimáticas	30
5.4.2.1 Cuantificación de actividad exopectinasa	30
5.4.2.2 Ensayo viscosimétrico para determinar actividad endopectinasa	31
5.4.2.3 Cuantificación de actividad xilanólítica	32
5.4.2.4 Geles PAGE-SDS	32
5.5 Caracterización de los jugos cítricos	33
5.5.1 Obtención del jugo de limón y toronja	33
5.5.2 Determinación de pH	34
5.5.3 Determinación de acidez total	34
5.5.4 Cuantificación de azúcares reductores directos (DNS)	34
5.5.5 Cuantificación de azúcares totales (fenol-sulfúrico)	35
5.5.6 Determinación de la claridad del jugo a 660nm	35
5.5.7 Determinación de la reducción de viscosidad	36
5.5.8 Determinación de los sólidos insolubles en alcohol	36
5.5.9 Determinación de peso residual	37
5.5.10 Pruebas de filtración	37

CAPÍTULO 6. Resultados, análisis y discusión	38
6.1 Obtención y caracterización de los filtrados enzimáticos	38
6.2 Concentración y caracterización de los filtrados a utilizar y de las enzimas comerciales	39
6.2.1 Geles PAGE-SDS	41
6.3 Preparación de los ensayos y dosis enzimáticas	42
6.4 Evaluación de los filtrados enzimáticos y enzima comercial en jugos de cítricos	45
6.4.1 Volúmenes de filtración	47
6.4.2 Claridad	49
6.4.3 Reducción de viscosidad	52
6.4.4 Azúcares reductores	55
6.4.5 Azúcares totales	57
6.4.6 Sólidos insolubles en alcohol (ASI)	60
6.4.7 Peso residual	63
6.4.8 Determinación de pH	66
6.4.9 Determinación de acidez	66
6.4.10 Comparación general de resultados	67
CAPÍTULO 7. Conclusiones	73
CAPÍTULO 8. Bibliografía	75

ABREVIATURAS USADAS

<i>A. flavipes</i>	<i>Aspergillus flavipes</i> FP-500
°C	Grados Celsius
cm	Centímetros
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
µM	microMol
mM	Milimolar
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
U	Unidades enzimáticas
mV	Milivolts
µg	Microgramos
µL	Microlitros
N	Normal
meq	Miliequivalentes
EC	Enzima Comercial
CL	Cáscara de limón

Aplicación de las enzimas xilanolíticas y pectinolíticas producidas por *Aspergillus flavipes* FP-500 en el procesamiento de jugos cítricos.

CN	Cáscara de Naranja
P	Pectina
OM	Olote de Maíz
ST	Salvado de Trigo
FE	Filtrado Enzimático
FEC	Filtrado Enzimático concentrado

Resumen

Aspergillus flavipes FP-500 es una cepa autóctona de México la cual fue aislada en el laboratorio de hongos filamentosos (conjunto E, laboratorio 312) de la Facultad de Química, UNAM. *A. flavipes* FP-500 tiene una temperatura óptima de crecimiento entre los 35°C y los 37°C. En estudios anteriores se ha encontrado que este hongo es buen productor de enzimas xilanolíticas y pectinolíticas en medios que utilizan como fuente de carbón olote de maíz o cáscara de limón, respectivamente.

Hoy en día estos dos grupos de enzimas son altamente utilizados en la industria alimentaria ya sea para clarificación de jugos, vinos y otras bebidas o para el mejoramiento de las masas de panificación hablando específicamente de las xilanasas. Este proyecto está enfocado particularmente en la producción de dichas enzimas para su aplicación en el proceso de despectinización en la industria de jugos cítricos.

En México la naranja, toronja y limón son los tres frutos cítricos más producidos, por lo que la industria de sus respectivos jugos es grande, con ellos se preparan jugos para beber, bebidas gasificadas y otro tipo de concentrados para saborizar ciertos alimentos o bebidas.

Las enzimas pectinolíticas son las encargadas de degradar la pectina hasta ácido galacturónico. Dentro de las enzimas pectinolíticas existen diferentes tipos y se clasifican como esterases (pectin esterasa) y despolimerasas, ejemplo de estas últimas son las poligalacturonasas, polimetilgalacturonasas y liasas (pectinliasa y pectato liasa). Las despolimerasas a su vez, se pueden dividir en enzimas endo y exo, las que se distinguen debido al sitio sobre el que actúan, es decir algunas cortan en cualquier punto de la cadena y otras a partir de los extremos. Las primeras son de gran importancia debido a que son las encargadas de disminuir la viscosidad rápidamente.

Por otro lado, el objetivo de las enzimas xilanolíticas es el de degradar el xilano, el cual es un polisacárido muy heterogéneo. Para poder lograr la degradación de este polisacárido a xilosa y los demás carbohidratos presentes en las cadenas secundarias las enzimas que actúan son: endoxilanasas, β -xilosidasas, acetilxilanasas y enzimas accesorias.

En este trabajo se propone la producción de enzimas pectinolíticas y xilanolíticas con *Aspergillus flavipes* FP-500 utilizando cáscara de limón y olote de maíz, respectivamente. La obtención de enzimas se llevará a cabo por medio de una fermentación sumergida durante 72h. Posteriormente se separará la biomasa del medio residual para obtener los filtrados que contienen las pectinasas y las xilanasas, éstos se concentrarán por ultrafiltración. Los concentrados enzimáticos se evaluarán solos y en mezclas, en la despectinización de jugos de cítricos, para observar el efecto sinérgico que estas enzimas pudieran tener. Finalmente se comparará contra enzimas comerciales.

CAPÍTULO 1

Introducción

Hoy en día y debido al estilo de vida, la industria de jugos de frutas cítricas ha tomado una gran importancia, es por ello que se está en busca de mejoras constantes para eficientizar los procesos actuales. Para lograr esto, es decir, una máxima eficiencia en la obtención de jugo, las industrias utilizan preparados enzimáticos que contienen principalmente enzimas encargadas de la degradación de la pared celular, como lo son las enzimas pectinolíticas y xilanolíticas (o hemicelulasas).

Las sustancias pécticas o pectinas se originan por compuestos solubles en agua que al unirse se vuelven insolubles, éstos junto con las hemicelulosas provocan la retención de agua en la pared celular de las vesículas de la fruta (Kashyap et al., 2001, Yegres, et al. 2001). Además de esto los polisacáridos que pudieron quedar disueltos o que no se encuentren unidos fuertemente a la pared celular provocan opalescencia en el jugo, cuando el zumo de la fruta es concentrado la pectina presente provoca un aumento en la viscosidad (Montes& Magaña, 2002).

Actualmente en la industria este tipo de preparados enzimáticos provienen principalmente de hongos, más específicamente del género *Aspergillus* puesto que son buenos productores de enzimas extracelulares.

Conociendo esto, y sabiendo que tanto la celulosa como la pectina y la hemicelulosa, presentes en la pared celular de los vegetales, están unidas por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes entendemos que estos sistemas enzimáticos deben trabajar en conjunto para permitir una mejor hidrólisis de cada uno de los polisacáridos, (Aro et al., 2005) pues al degradarse uno se libera el otro y viceversa.

CAPÍTULO 2

Marco Teórico

2.1 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son microorganismos heterótrofos morfológicamente complejos, poseen diferentes formas a lo largo de su vida. Al ser heterótrofos tienen la necesidad de explotar los medios orgánicos presentes a su alrededor, en consecuencia juegan un papel muy importante en la naturaleza (Des Abbayes et al., 1989).

El reino fungí incluye una colección heterogénea de organismos heterotróficos que pueden ser saprófitos o parásitos, menos frecuentemente simbioses.

Actualmente algunas especies no patógenas son ampliamente explotados a nivel industrial debido a su gran capacidad de producción de enzimas extracelulares capaces de degradar compuestos orgánicos presentes en el ambiente (Wainwright, 1995).

2.2 *Aspergillus* spp., generalidades

En el siglo XVIII Micheli fue el primero en describir al género *Aspergillus* como cabeza rugosa al observar sus esporas unidas a los conidióforos, su descripción fue suficientemente clara para describir la característica principal de este género que actualmente es utilizada para su identificación (Samson 1994).

La típica estructura morfológica de los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* consiste de un conidióforo también llamado aspergillum, estructura de sostén, que parte de un micelio de pared gruesa llamada células-piel; los conidióforos no septados y alargados terminan en una vesícula globosa donde las métulas y fiálides nacen. A lo largo de la superficie de la vesícula se localizan las métulas, que a su vez sostienen a las fiálides. En las fiálides son producidas las conidias en cadenas largas con diferentes pigmentaciones y ornamentación dependiendo de la especie (Samson 1994)

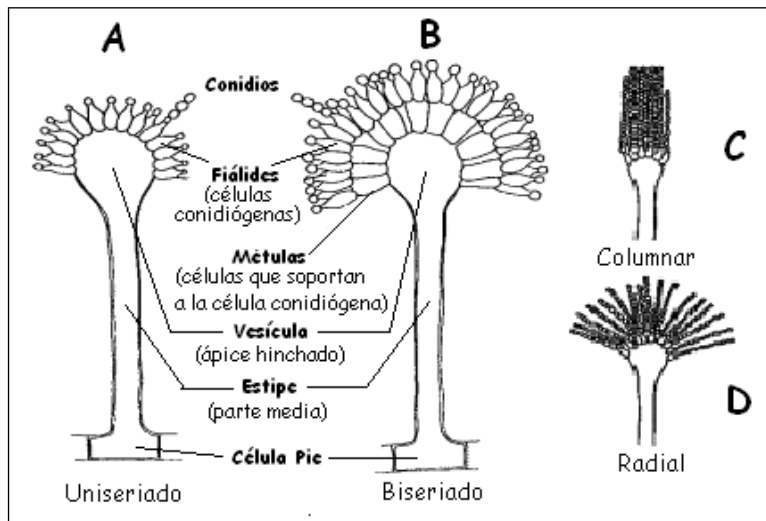


Figura 2.2.1. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus*. A-B: conidióforos; C-D: Cabezas conidiales (Adaptado de: Abarca 2000).

Los hongos de este género son saprófitos, su hábitat más común es el suelo, son importantes agentes de descomposición y reintegración de la materia orgánica al medio. Así mismo existen especies parásitas de plantas y animales. Este género de hongos filamentosos es utilizado industrialmente para la producción de metabolitos primarios como ácidos orgánicos, vitaminas, ácidos grasos, aminoácidos y enzimas (Samson 1994).

Aspergillus spp. Es conocido a nivel industrial y de investigación pues es uno de los grandes productores de sistemas enzimáticos tanto pectinolíticos como xilanolíticos.

2.2.1 *Aspergillus flavipes* FP-500

Aspergillus flavipes FP-500 es una cepa aislada en México por el laboratorio de hongos filamentosos, F.Q. UNAM Lab 312 a partir de un tomate en descomposición. Su temperatura óptima de crecimiento está entre los 35 y 37°C, es de color blanco y forma colonias de aproximadamente 4cm de diámetro. Su aspecto es aterciopelado y con gran capacidad de adhesión al agar formando estrías y relieves en el medio (figura 2.2.2.2) (Molina, 2011)

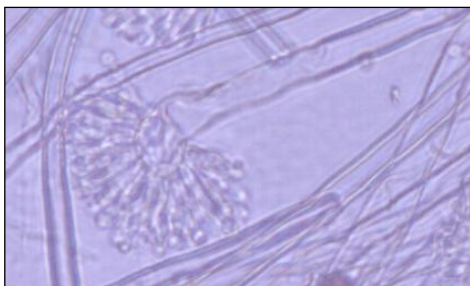


Figura 2.2.2.1. Micrografía de una cabeza conidial de *A. flavipes*



Figura 2.2.2.2. Imagen de *A. flavipes* FP-500 sembrada por picadura en PDA

Esta cepa presenta una gran capacidad de producción de las enzimas extracelulares en estudio (pectinasas y xilanasas). Es un hongo no patógeno para el humano lo que nos asegura la inocuidad del alimento en el cual se puedan llegar a utilizar (Martínez, 2009).

Se conoce la producción enzimática de *Aspergillus flavipes* FP-500 ya que se le han realizado diversos estudios, los cuales muestran que es buen productor de las enzimas antes mencionadas en sustratos complejos. Debido a esta información es que se busca estudiar más la producción de estos dos sistemas enzimáticos para después evaluar sus aplicaciones en conjunto.

2.3 Las Frutas cítricas

Los géneros *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus* son comúnmente conocidos como frutos cítricos puesto que todos pertenecen a la familia de las rutáceas. Éstos generalmente provienen de arbustos o árboles perennes.

Actualmente el género *Citrus* es el que tiene una mayor importancia a nivel industrial puesto que en él se incluyen los frutos como la naranja el limón y la toronja. En general estos tres frutos, además de la mandarina y la lima comparten la misma estructura un hesperidio el cual consiste de:

- Flavedo: es la capa externa de la cáscara en la cual encontramos el color característico de cada fruta y las glándulas oleíferas donde son almacenados los aceites esenciales.
- Albedo: es la capa interna de la cáscara, la cual es de color blanco y es esponjosa, ésta está principalmente compuesta de pectina. Conforme la fruta va madurando a lo largo de su vida esta capa interna de la cáscara va disminuyendo, lo que se debe a que la pectina se ve modificada a lo largo de este periodo. (Astisarán & Martínez, 2000).
- Núcleo central: es el centro de la fruta donde se encuentran unidas todas las membranas que forman los segmentos.
- Segmentos: son grupos de vesículas de jugo agrupadas por membranas.
- Vesícula de jugo: estrictamente hablando son las células de la fruta y en ellas se almacena el jugo, están agrupadas junto con semillas para formar los segmentos. (Chan, 1983).

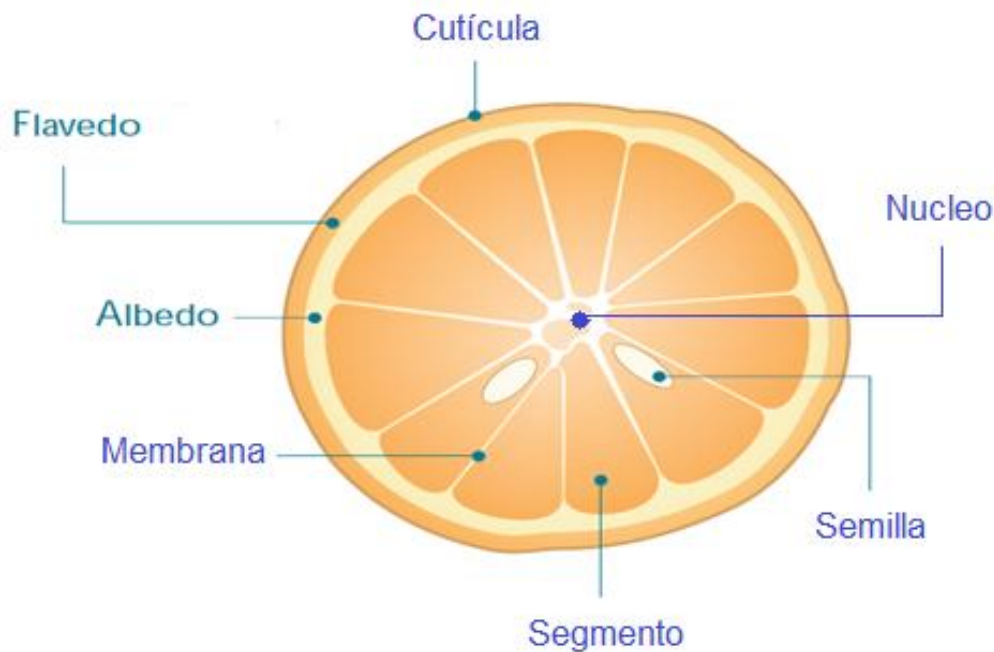


Figura 2.3.1. Diagrama de un fruto cítrico en corte transversal; donde se observan las estructuras principales del hesperidio. (Unilever, 2000)

2.3.1 Generalidades de los frutos cítricos

Los frutos cítricos son frutas de zonas subtropicales, dentro de esta clasificación se considera fruto cítrico al limón, lima, mandarina, naranja y toronja (pomelo).

Los cítricos antes mencionados son dicotiledóneas y pertenecen a la familia rosácea.

La composición de las frutas es variable a lo largo de su vida y en su proceso de maduración. En general el contenido de carbohidratos va del 10 al 25% dentro de éstos se encuentran la pectina y hemicelulosas, proteína menos del 1% y lípidos 0.1-0.2%.

Al ser cítricos contienen un alto nivel de ácido cítrico estando éste entre 2 y 3%

el cual va disminuyendo conforme la fruta madura. Tienen aproximadamente 85% agua y una gran variedad de minerales como Ca, Mg, K, P, entre otros. (Knee M,2002)

A continuación se muestra una tabla comparativa de la composición de los frutos cítricos de interés.

Tabla 2.3.1.1. Composición Química aproximada de algunos frutos cítricos en porcentaje del peso.

Fruta	Agua	CHO's	Proteína	Lípidos	Minerales
Naranja	88.6%	9.6%	0.8%	0.5%	0.4%
Limón	97.4%	1.3%	0.3%	0.3%	0.3%
Toronja	88.8%	10.1%	0.5%	0.2%	0.2%

Adaptado de Astiasarán & Martínez (2000).

2.3.2 Limón Persa

Es la fruta del árbol *citrus latifolia*, un árbol pequeño que llega a medir hasta 7 metros.



Figura 2.3.2.1. Imagen de un limón persa

El limón es un fruto color verde oscuro mientras es inmaduro, conforme avanza la maduración del fruto el tono va disminuyendo hasta llegar a verdes claros incluso amarillentos. El tiempo de maduración varía entre 90 y 120 días dependiendo de las condiciones climáticas.

La fruta tiene diez a doce segmentos o lácúlos con pulpa de grano fino de color amarillento verdoso pálido, muy ácida y aromática. (COVECA, 2012)

2.3.3 Toronja Sangría

Es la fruta que proviene de un árbol pequeño llamado *Citrus x paradisi* el cual no llega a medir más de 6 m de altura, este árbol tiene una copa redonda pero poco densa.



Figura 2.3.3.1. Imagen de unas toronjas Sangría.

Las flores pueden ser blancas o purpuras.

El fruto, es decir la toronja, puede llegar a medir hasta 15cm de diámetro, el color de la cáscara puede variar entre amarillo y rosa, tiene un olor muy característico. Por dentro sus segmentos van desde rosa amarillento hasta un color rojizo (de ahí el nombre toronja sangría). Tiene semillas de aproximadamente 1 cm pero llegan a ser escasas (COVECA, 2012).

3.4 Composición de la pared celular de los frutos cítricos

La pared celular de los frutos cítricos como la toronja y limón está compuesta principalmente de polisacáridos complejos como lo son la celulosa, pectina y hemicelulosa, éstos son los encargados de darle la estructura y se encuentran altamente unidas entre ellas por distintas fuerzas débiles como puentes de hidrógeno y en ocasiones enlaces covalentes (Aro et al., 2005). Al estar compuesta por estos tres tipos de polisacáridos hacen que sea difícil su degradación, esto para la fruta es bueno puesto que es una barrera con la cual no solo aísla el interior del exterior sino que hace compleja la entrada y supervivencia en superficie de ciertos microorganismos (Schols y Voragen, 1996).

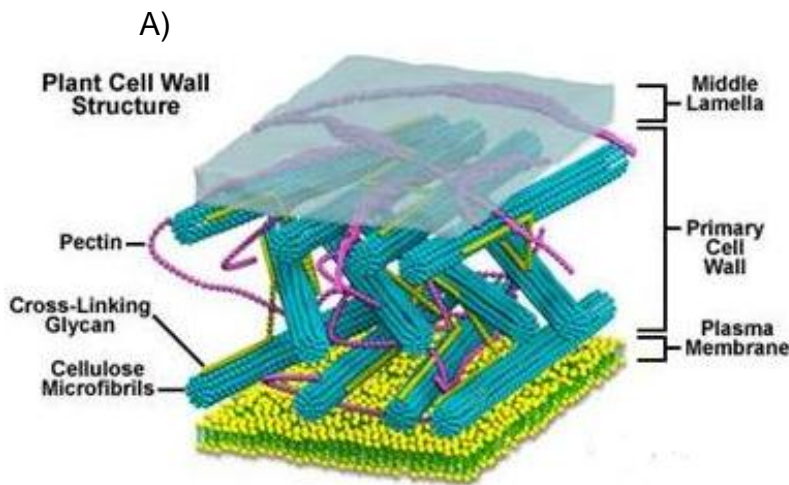
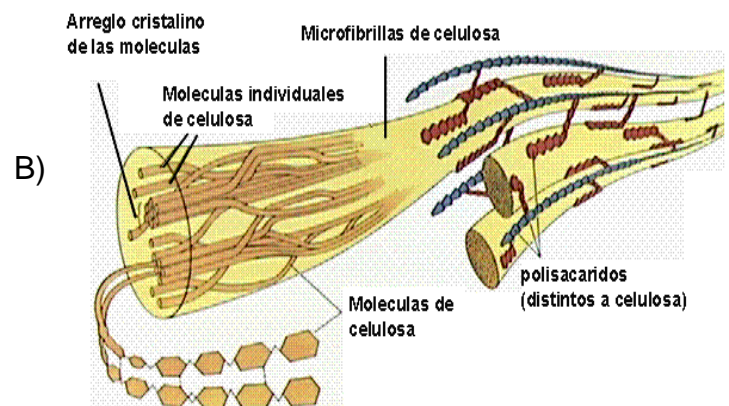


Figura 2.3.4.1

A) Arreglo de los polisacáridos en la pared celular de los frutos.

B) Estructura de las microfibrillas de celulosa. (Fuente: Bioss, 2012)



La celulosa es un polisacárido complejo que está compuesto por la unión de moléculas de β -glucopiranososa mediante enlaces β -1,4-O-glucosídico. En la pared celular ésta se arregla en microfibrillas, las cuales a su vez están unidas por hemicelulosas (xilanos) (Figura 2.3.4.1) (Aro et al., 2005)

Las hemicelulosas son los polisacáridos mas heterogéneos, éstos tienen una cadena principal la cual está compuesta principalmente por una cadena de xilosa unida por enlaces α -1,4, y cadenas secundarias que contienen arabinosa o ácido glucurónico. Las hemicelulosas además de ser las encargadas de unir las microfibrillas de celulosa tienen la capacidad de unirse con la pectina (Sunna, 1997).

La pectina es uno de los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza por lo que es altamente importante y muy estudiado. Éste se compone de una cadena principal de ácido galacturónico unido por enlaces α -1,4 y cadenas secundarias que contienen ramnosa, arabinosa, galactosa y xilosa.

Los polisacáridos pécticos constituyen entre el 40 y 60% de la pared celular de la fruta y su estructura puede superar los 2000kDa (Chapman et al., 1987). Los xiloglucanos el 20-25% (Bacic et al., 1988)

Las sustancias pécticas pueden ser solubles e insolubles, esto dependerá de su composición, es decir, qué tan ramificada esté. (de Vries & Visser, 2001). La protopectina es el nombre dado a las formas insolubles de las sustancias pécticas. La pectina es el material soluble.

La textura de los vegetales y frutas está fuertemente influida por la cantidad y naturaleza de las sustancias pécticas. Cuando la fruta no está madura se presenta como protopectina, y ésta es transformada a pectina durante la maduración del fruto (Van Buren, 1991). Estas sustancias representan una tercera parte del peso seco de las plantas.

Al unirse la pectina con las hemicelulosas se provee estabilidad a las

microfibrillas de celulosa y a las proteínas presentes en la pared celular (Annis & Goodwin, 1997) unidas por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes (Aro *et al*, 2005)

2.4 Las enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos, gracias a ellos es que se pueden llevar a cabo ciertas reacciones químicas en un menor tiempo. A lo largo de los años se ha demostrado la importancia de estas proteínas y actualmente son muy estudiadas.

En la actualidad las enzimas son utilizadas a nivel industrial tanto para desarrollo de alimentos como para procesos textiles, farmacéuticos, etc. (Montes & Magaña, 2002)

2.4.1 Pectinasas o enzimas pectinolíticas

Las enzimas pectinolíticas son las encargadas de degradar la pectina hasta ácido galacturónico. Dentro de las enzimas pectinolíticas existen diferentes tipos. Las que se producen y tienen su máxima actividad en medio ácido y las que se producen y tienen su máxima actividad en medio básico (Vries & Visser 2001), en este caso solo son objeto de estudio las enzimas pectinolíticas ácidas, primero, porque se experimentará con jugos cítricos y segundo porque éstas provienen de hongos filamentosos y éstos tienen un pH óptimo entre 4 y 5.

Las enzimas pectinolíticas se dividen en:

- Esterasas: pectinmetil-esterasas se encargan de la desesterificación del grupo metoxilo.
- Enzimas despolimerizantes: Éstas pueden ser de tipo endo o exo y se encargan de hidrolizar enlaces glicosídicos. Dentro de ellas se encuentran las poligalacturonasas y polimetilgalacturonasas que son las encargadas de degradar, con la ayuda de una molécula de agua, los enlaces α -1,4 que forman la cadena principal de la pectina. Como resultado se obtienen dos moléculas de glucosa completas. (Kashyap *et al*, 2001).
- Liasas: son enzimas que se encargan de degradar los enlaces α -1,4 por medio de la β -eliminación, evitando así la utilización de agua. (de Vries & Visser, 2001). La pectinliasa, por ejemplo, degrada pectina altamente esterificada (HMP), generando pectina de bajo metoxilo (LMP).
- Enzimas accesorias, las cuales se encargan de las cadenas secundarias de la pectina ayudando a las anteriores a degradar con más eficiencia la cadena principal.

En la figura 2.4.1.1 podemos observar los lugares en los que actúan estas enzimas ya descritas.

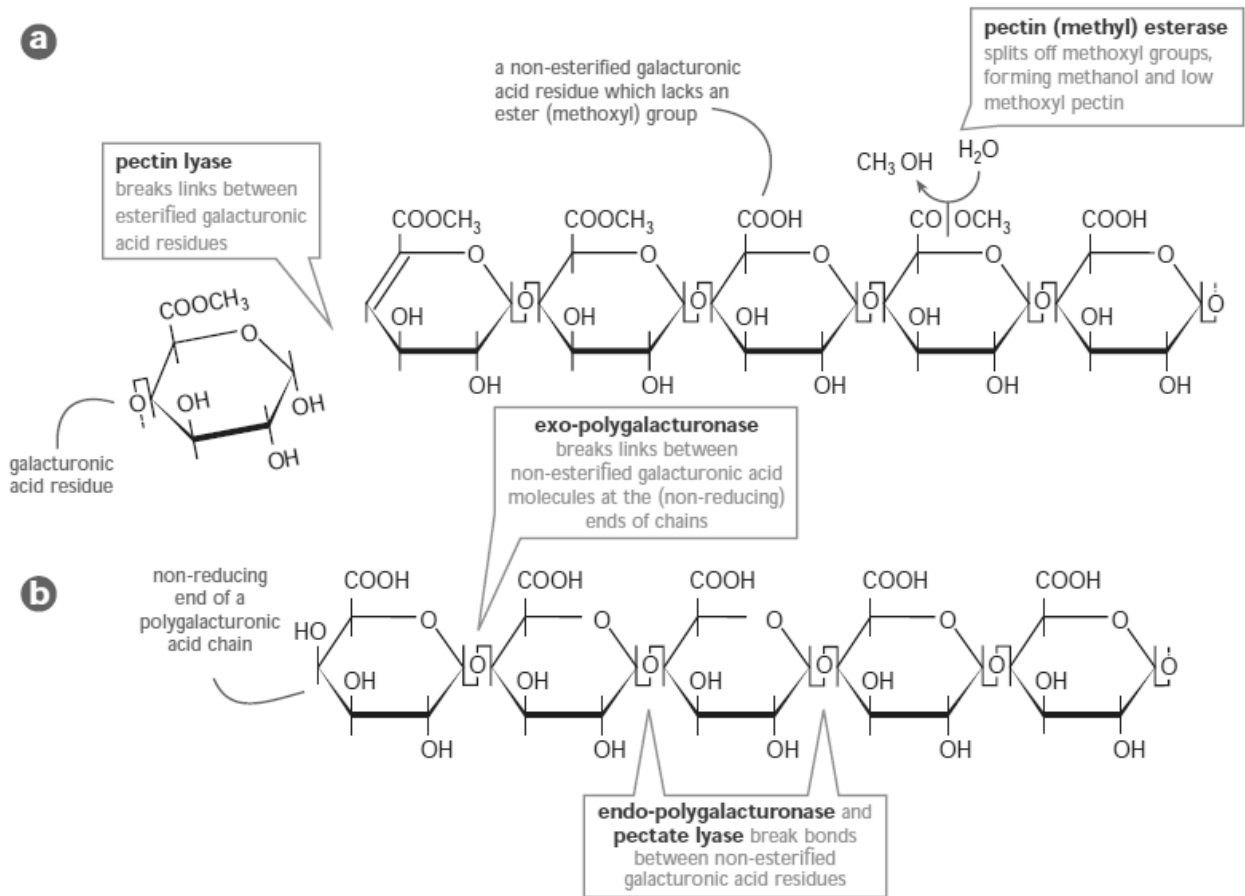


Figura 2.4.1.1 sitio de acción de los cuatro grandes grupos de enzimas pectinólíticas a) la pectina mostrada es de alto metoxilo b) la pectina mostrada es de bajo metoxilo. Obtenido de (Unilever, 2000)

2.4.2 Xilanasas o enzimas xilanolíticas

Por otro lado, el objetivo de las enzimas xilanolíticas es el de degradar el xilano, el cual es un polisacárido muy heterogéneo (de Vries, 1999). Para poder lograr la degradación de este polisacárido a xilosa y los demás carbohidratos presentes en las cadenas secundarias las enzimas que actúan son:

- La endoxilanasas, la cual se encarga de la degradación de la cadena principal en oligosacáridos (máximo 4 carbohidratos). Estas enzimas se dividen en 2, las que liberan L-arabinosa y las que no lo hacen. (de Vries & Visser, 2001).
- La β -xilosidasa encargada de la degradación de los oligosacáridos producidos por la endoxilanasas dando como resultado xilosa. La β -xilosidasa es una enzima muy específica.
- Acetilxilanasas: se encarga de liberar los grupos acetilo presentes en los residuos de xilosa. (Gielkens, 1999).
- Las enzimas accesorias son las que permiten la degradación de las cadenas secundarias como la feruloil esterasa, arabinofurosidasa y la α -glucuronidasa (de Vries & Visser, 2001).

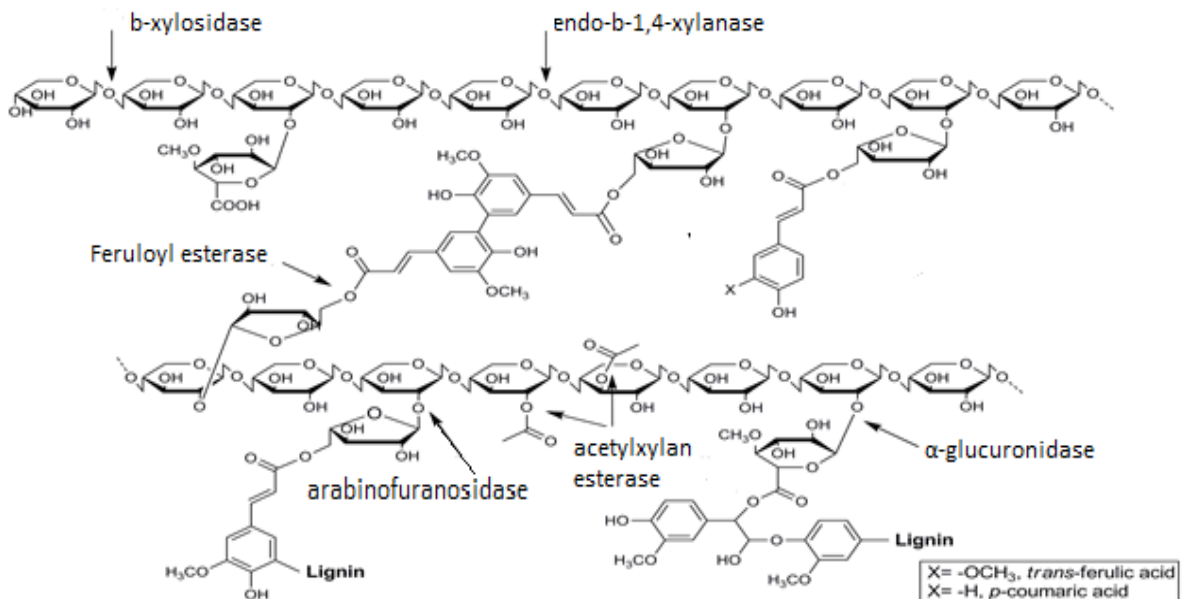


Figura 2.4.2.1 molécula de xilano donde se observan los sitios de acción de las distintas enzimas encargadas de su degradación. (Fuente: Biotechmass, 2012)

2.4.3 Aplicaciones en la industria de las enzimas pectinolíticas y xilanolíticas

La producción de enzimas por un microorganismo como *Aspergillus flavipes* FP-500 es importante pues tienen muchas aplicaciones en la industria.

Las pectinasas son utilizadas a nivel industrial para el tratamiento de maderas y telas (para suavizar), clarificación de vinos y jugos, despectinización de jugos y vinos, maceración de vegetales y frutas, extracción de aceites. (Silva *et al*, 2004). Estas enzimas son de gran importancia en el procesamiento de vegetales y producción de jugos a partir de frutos cítricos debido al alto contenido de pectina y por lo tanto una mayor viscosidad. Al agregar a los jugos pectinliasa, poligaracturonasa y pectin-esterasa se logra una disminución importante en la viscosidad y permite que las

partículas suspendidas sean eliminadas fácilmente (Montes & Magaña 2002).

La utilización de enzimas xilanolíticas en la industria comenzó a principios de 1980, primero en la alimentación animal y finalmente en la industria de alimentos. Actualmente representan el 20% del mercado mundial de enzimas. Las xilanasas son utilizadas en la industria textil, de la pulpa y papel, clarificación de vinos y jugos, licuefacción del mucilago del café, para mejorar la miga del pan, extracción de saborizantes, pigmentos, aceites de plantas y semillas, entre otras (Ponce & Pérez, 2002). En este caso se busca que las enzimas obtenidas sean utilizadas en la industria de jugos cítricos (naranja, limón y toronja principalmente)

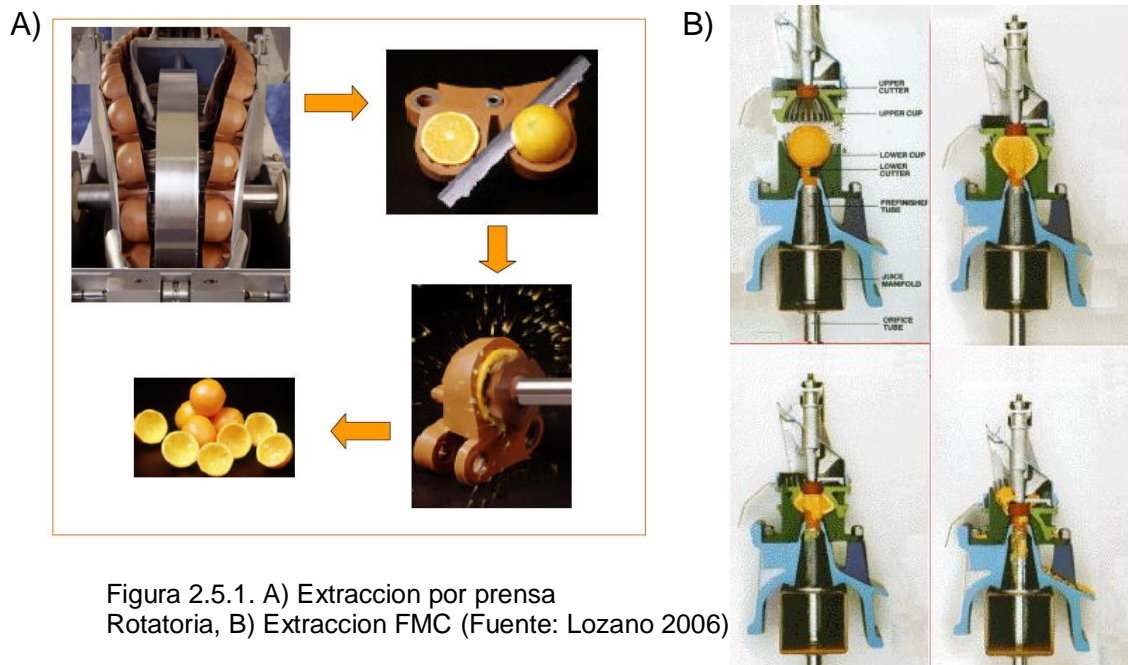
2.5 Proceso de elaboración de jugos comerciales

El jugo es el líquido obtenido a partir de los frutos en buen estado (generalmente cítricos) por medio de una extracción ya sea mecánica o manual. Este posteriormente puede ser usado para la producción de concentrados, jugos pasteurizados y envasados, jugos ultrapasteurizados y mermeladas entre otros.

Las operaciones unitarias para la obtención de jugo de cítricos son: recepción de materia prima, selección, lavado y cepillado, corte, exprimido, tamizado, control de calidad, envasado, pasteurización, enfriamiento y empaque. (Secretaría de Economía, 2010).

Existen diversos tipos de extractores de jugo para la industria, sin embargo los más utilizados son:

- FMC (Food Machinery Company): este extractor se encarga de obtener el jugo sin necesidad de cortar la fruta por mitad. Entonces una vez acomodada la fruta en la copa inferior y cuando la copa superior esta en la parte mas alta las cuchillas se encargan de hacerle un agujero a la fruta por el cual sale el jugo cuando las dos copas aplastan la fruta, de esta manera el jugo jamás toca la cáscara. Por otro lado este extractor permite al mismo tiempo obtener el jugo y separar las semillas y pulpa de éste además de recuperar los aceites esenciales (Lozano, 2006).
- Prensas rotatorias: este extractor se encarga de acomodar las frutas en agujeros para después ser cortadas a la mitad por una cuchilla, posteriormente se le introduce un cilindro giratorio para la extracción del jugo. En este tipo de extractores el jugo cae directamente evitando contacto con la cáscara y por tanto con los aceites esenciales, en caso de querer recuperar éstos es necesario realizar este paso antes de exprimir el fruto (Lozano, 2006).



Actualmente a las operaciones antes mencionadas se le ha agregado una más, la cual consiste de uno o dos tratamientos enzimáticos generalmente de pectinasas (Rai et al., 2004)

El fin de los tratamientos enzimáticos antes de exprimir las frutas es el de ayudar a aumentar el rendimiento de extracción ya que se logra degradar parcialmente los polisacáridos de la pared celular facilitando la máxima extracción de líquido contenido en las células de la fruta y que se ve retenido por estas estructuras complejas. Por otro lado, el tratamiento posterior a la extracción del jugo busca disminuir la viscosidad ya que como se sabe hay tanto pectinas como xilanos solubles que al estar presentes en el jugo provocan además de un aumento de viscosidad una apariencia turbia. La pulpa que puede llegar a pasar por los tamices, con este tratamiento se puede degradar y con ello se logra que al disminuir la viscosidad sea más fácil, a nivel industrial, su filtración y transportación por tuberías (Rai et al., 2004).

CAPÍTULO 3.

Justificación.

Aspergillus flavipes FP-500 es una cepa aislada en México, a la cual ya se le han realizado diversos estudios los cuales muestran que es buen productor de enzimas en especial de pectinasas y xilanasas. Debido a esta información es que se busca estudiar más la producción de estos dos sistemas enzimáticos para después evaluar sus aplicaciones en la despectinización de jugos cítricos para lograr la reducción del contenido de pectina y con ello la viscosidad, lo cual se traduce en facilidad para filtrar, transportar y concentrar el jugo.

Aspergillus flavipes es un hongo filamentoso no patogénico que se puede encontrar en materia orgánica, principalmente en suelo, compostas y plantas en descomposición. Su temperatura óptima de crecimiento está entre los 35 y 37 °C. La cepa estudiada para este proyecto es la FP-500, la cual fue aislada a partir de tomates en descomposición en el laboratorio de fisiología de hongos filamentosos, FQ UNAM, mismo en el que se realizó el presente estudio. Este hongo fue elegido ya que presenta una gran capacidad de producción de las enzimas.

La producción de enzimas de un microorganismo no-patogénico es importante pues tienen muchas aplicaciones en la industria y finalmente se busca determinar la capacidad del sistema enzimático producido por *A. flavipes* FP-500 para su posible uso en la industria de jugos de frutos cítricos

CAPÍTULO 4.

Objetivos

4.1 Objetivo General

Obtener dos preparados enzimáticos distintos cuyas actividades máximas sean pectinolítica y xilanolítica respectivamente para su posterior utilización en jugo de toronja sangría y limón persa, comparando contra una enzima comercial.

4.2 objetivos particulares

- Obtener pectinasas y xilanasas a partir de *Aspergillus flavipes* FP-500. Cepa aislada en el laboratorio donde se realizó el estudio.
- Determinar la capacidad de producción de exopectinasa, endopectinasa y xilanasas por *Aspergillus flavipes* FP-500 en los distintos sustratos. Así como las condiciones óptimas para su desarrollo.
- Evaluar la eficiencia de las pectinasas y xilanasas obtenidas en los sustratos en los que se realizó la fermentación.
- Evaluar el efecto de la adición de xilanasas en la degradación de pectina así como la reducción de viscosidad en los jugos.
- Encontrar la mejor mezcla para los parámetros de caracterización y poder determinar si la enzima comercial o las experimentales son mejores.

Hipótesis

La pared celular de los vegetales como los frutos cítricos contiene altas concentraciones de polisacáridos complejos como lo son la pectina y el xilano, además de esto se sabe que *Aspergillus flavipes* FP-500 es capaz de producir enzimas que degradan estos polisacáridos. Entonces, si se logra inducir la producción de enzimas encargadas de la degradación de los polisacáridos antes mencionados en cantidades significativas se podrá comprobar primero que al degradar uno de los polisacáridos se favorece la degradación del otro y por tanto la filtración del jugo será más rápida y segundo se podrá determinar el efecto sinérgico de estos dos grupos de enzimas.

CAPÍTULO 5.

Metodología

5.1 Microorganismo

Para la realización de este proyecto experimental se utilizó el hongo filamentoso *Aspergillus flavipes* FP-500, cepa autóctona de México. Esta se incubó en cajas con agar Sabouraud a 37°C por 96 h, una vez transcurrido este periodo se mantuvo en refrigeración y selladas con parafilm. Para su conservación se resembró una vez al mes.

5.1.1 Preparación del inóculo: suspensión de esporas

Para la preparación de la suspensión de esporas se utilizaron cajas de medio Sabouraud resembradas 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 por 5 minutos, descartando el sobrenadante y posteriormente se adicionó un volumen de solución salina-Tween 80 equivalente al desechado y se agitó para resuspender el botón de esporas, esto con el fin de eliminar micelio presente. Este procedimiento se realizó 3 ocasiones más, todo en condiciones asépticas. Finalmente se resuspendió el botón, se tomó una alícuota, se hizo una dilución variable dependiendo del tamaño del botón y se determinó la concentración de esporas en la

dilución y posteriormente en la suspensión original, contando al microscopio el número de esporas en una cámara de Neubauer. El modelo matemático utilizado es el siguiente:

$$[\text{esporas/mL}] = \left(\frac{\text{núm. esporas contadas}}{\text{volumen}_{\text{cuadrante}} \text{ en mL}} \right) \left(\frac{100 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \right)_{\text{dilución}}$$

$$[\text{esporas/mL}] = \left(\frac{\text{núm. esporas contadas}}{10^{-4} \text{ mL}} \right) \left(\frac{100 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \right)_{\text{dilución}}$$

5.2 Condiciones de cultivo y medios de cultivo utilizados

Para realizar las fermentaciones donde se produjeron las enzimas deseadas se usaron dos medios de cultivo líquidos, éstos están compuestos por medio basal y como fuente de carbono compleja cáscara de limón 1 % (p/v) y olote de maíz 3 % (p/v), ajustando el pH a 3.2 y 5.2 respectivamente antes de esterilizar a 121 °C, 15 psi por 20 min.

Una vez listo el medio de cultivo se hizo una fermentación en lote de 10 matraces de 500 mL con 100 mL medio de cultivo líquido y un inóculo de *A. flavipes* FP-500 con concentración final de 10^6 esporas/mL de medio de cultivo. Se incubó a una temperatura de 37 °C con agitación recíprocante a 200 rpm por 72 horas

5.3 Obtención y concentración del filtrado libre de células

Una vez finalizado el tiempo de la fermentación, se filtró al vacío el líquido (medio de cultivo, microorganismo, metabolitos, etc.) de cada uno de los matraces por separado a través de algodón separando así la biomasa y obteniendo el filtrado enzimático.

El filtrado enzimático se concentró hasta obtener un volumen diez veces menor en una celda de ultrafiltración de 350 mL usando una membrana de 10,000 Da, con una Presión de 40 psi.

5.4 Caracterización de los concentrados enzimáticos y enzimas comerciales

5.4.1 Cuantificación de proteína por el método de Bradford

En tubos de ensayo de 13X100 mm se agregaron 0.50 mL de muestra, 0.15 mL de agua destilada y un mL 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 Albúmina Bovina Sérica.

5.4.2 Determinación de Actividades enzimáticas

A continuación se detallan las metodologías utilizadas para cada enzima cuantificada durante este desarrollo experimental. Así como el gel PAGE-SDS realizado.

5.4.2.1 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 filtrado enzimático. La reacción enzimática se inició al agregar los 100 μ L del filtrado enzimático. Posteriormente se incubó durante 20 min a una temperatura de 45 °C. Una vez transcurrido el tiempo se detuvo la reacción adicionando 2 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. En el caso de los blancos se incubaron sin muestra y al término de los 20 minutos de incubación se añadieron primero los 2 mL de DNS y después los 100 μ L de filtrado enzimático. Se determinó la actividad exo-pectinolítica partir de la cuantificación de grupos reductores liberados por la actividad enzimática empleando una curva patrón de ácido galacturónico. La actividad se expresa en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima que produce un μ mol de ácido D-galacturónico en dichas condiciones.

5.4.2.2. Ensayo viscosimétrico para determinar actividad endo-pectinasa

Esta actividad se determinó por el cambio de viscosidad conforme al tiempo después de adicionar el filtrado enzimático. Se colocó un viscosímetro tipo Cannon-Fenske No. 200 que debe estar perfectamente limpio y seco, en baño María a 30 °C. Se pipetearon 10mL de solución de pectina 1 %, pH = 4.2 con buffer de acetatos 100 mM y se equilibró en el baño durante 5 min. Posteriormente se pipeteo 0.5 mL de filtrado enzimático y se agregó al sustrato, en este momento se oprimió el cronómetro #1 para tomar el tiempo de reacción. Se mezcló y aplicó succión hasta que la solución quedo arriba del menisco superior. Con el cronómetro #2 se midió el tiempo de eflujo de la solución a través de los dos meniscos, en este punto se pararon los dos cronómetros y se registró el tiempo marcado en los cronómetros. Inmediatamente se volvió a succionar la mezcla de reacción hasta arriba del menisco superior y se midió de nuevo el tiempo que tarda la solución en atravesar los dos meniscos, se repitió el procedimiento hasta obtener 4 determinaciones a distintos tiempos de reacción.

Nota: se preparó un blanco de sustrato y un blanco de agua siguiendo la metodología anterior pipeteando 0.5 mL de agua destilada en lugar de la enzima. Se calculó el promedio de las cuatro mediciones. Se calcula la fluidez relativa (Fr) y el tiempo de reacción (Tn) en minutos para cada tiempo de reacción, se calculan las pendientes entre las 4 determinaciones y se hace un promedio que dará como resultado las UFR/min. Las U/mL se calculan multiplicando el dato anterior por un factor de 20.

5.4.2.3 Cuantificación de actividad xilanolítica

Se determinó a partir de la cuantificación de azúcares por la técnica DNS empleando una curva patrón de 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 0.1 mL del filtrado enzimático. La reacción enzimática se inició adicionando 100 μ L del filtrado enzimático y se incubó 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 maría 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 filtrado enzimático. Se definió como una unidad enzimática xilanolítica (U) la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de un μ M de xilosa 20 minutos de las condiciones del ensayo.

5.4.2.4 Geles SDS-PAGE

La preparación de los geles de poliacrilamida 12 % con SDS de 8x8 cm se realizó en condiciones desnaturalizantes. La electroforesis se realizó con 5 μ L de muestra para la preparación enzimática comercial y con 10 μ L de muestra estandarizada a 50 μ g de proteína para los concentrados enzimáticos EEX y EEP producidos por *A. flavipes* FP-500.

Se puso a corriente constante (15mA por gel) por 75 minutos 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 sol de ac. Acético al 10 % (v/v).

5.5 Caracterización de los jugos cítricos

En esta sección se expondrán detalladamente las metodologías utilizadas para la determinación de la eficacia de las enzimas probadas durante el desarrollo experimental.

5.5.1 Obtención del jugo de limón y toronja

Las frutas cítricas fueron adquiridas en locales comerciales autorizados, se buscó que éstas estuvieran maduras y libres de daños físicos. El jugo se obtuvo por presión manual. Se mezcló bien y se dividió en lotes de 200 mL para su tratamiento con diferentes dosis enzimáticas.

5.5.2 Determinación de pH

Se midió el pH usando un potenciómetro con electrodo de vidrio.

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 0.1 N usando dos gotas de azul de bromotimol como indicador. Se expresó la concentración de ácido cítrico en %.

$$\% \text{ác. cítrico} = \left(\frac{\text{Vol}_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}} \text{ meq}_{\text{ác. cítrico}}}{\text{mL de jugo}} \right) * 100$$

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

5.5.4 Cuantificación de azúcares reductores directos (DNS)

En tubos de 16x150 mm se adicionaron 100 µL de jugo diluido 1/10 y 900 µL de agua destilada. Se agregaron 2 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 glucosa.

5.5.5 Cuantificación de azúcares totales (fenol-sulfúrico)

En tubos de ensayo de 22x175 mm se agregaron 0.1 mL de la solución problema diluida 1:100, 0.4 mL de agua destilada y 0.5 mL de fenol al 5 % (p/v). Posteriormente se adicionaron 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado con una pipeta de vidrio de un solo golpe permitiendo que el ácido cayera vigorosamente sobre la mezcla de solución de azúcares y fenol y la reacción sea completamente exérgica. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agitó en vórtex. Leer 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 glucosa.

5.5.6 Determinación de la claridad del jugo a 660nm

Se determinó la absorbancia de las muestras del jugo filtrado, centrifugando 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.

5.5.7 Determinación de la reducción de viscosidad

Se midió la viscosidad del jugo en un viscosímetro tipo Cannon-Fenske No. 200 limpio y seco en un baño de agua a 30°C en posición vertical. Se pipetearon 10 mL de jugo tratado y filtrado 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 flujo cuatro veces y se calculó el promedio. Se realizó un blanco con jugo sin tratamiento y filtrado

Se calculó la velocidad de reducción de la viscosidad de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$A = \left(\frac{t_a - t}{t_a - t_0} \right) * 100$$

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

5.5.8 Determinación de los sólidos insolubles en alcohol (ASI)

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

5.5.9 Determinación del peso residual

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

5.5.10 Pruebas de filtración

Se colocó una probeta de plástico con un embudo y papel filtro de cafetera a peso constante, a éste se le vertieron 175 mL el jugo tratado y se tomó el volumen después de 60 min. El jugo filtrado se utilizó para las pruebas ya mencionadas.

CAPÍTULO 6.

Resultados, análisis y discusión.

El trabajo experimental realizado fue dividido en cuatro etapas. La primera consistió en la producción de dos filtrados enzimáticos uno con alta actividad pectinolítica, específicamente endopectinasas y un segundo con alta actividad xilanolítica por medio de una fermentación sumergida. La segunda etapa fue la concentración y caracterización de éstos así como la de las enzimas comerciales y la decisión sobre qué preparados enzimáticos utilizar. En una tercera etapa se evaluaron estas enzimas, se determinaron las diferentes dosis a utilizar y finalmente se evaluaron éstas en dos zumos de frutas cítricas distintas: limón persa y toronja sangría.

6.1 Obtención y caracterización de los filtrados enzimáticos

Se realizaron diversos experimentos de fermentación con distintos sustratos para determinar la mejor fuente de producción de enzimas pectinolíticas por un lado y xilanolíticas por otro lado. El objetivo de esto fue lograr un filtrado enzimático con la mayor cantidad de enzimas pectinolíticas y menor cantidad de enzimas xilanolíticas y viceversa para poder mezclarlas posteriormente.

Para poder determinar esto se probaron distintas fuentes de carbono siendo éstas: Cáscara de Limón (CL) 1 % y 3 %, Pectina (P) 1.5 % y Cáscara de Naranja (CN) 3 % para la producción de pectinasas, y Olote de Maíz (OM) y Salvado de trigo (ST) al

3 % para la producción de xilanasas. Las condiciones fueron aquellas definidas en trabajos anteriores. Incubación a 37°C, agitación recíproca a 200rpm, con una duración de 72h, pH 3.2 (CL, P y CN) y 5.2 (OM y ST) (Molina, 2011).

A continuación en la tabla 6.1.1 se muestran los valores de actividad pectinolítica exo y endo y de actividad xilanolítica para las 6 fermentaciones realizadas.

Tabla 6.1.1. Actividad enzimática obtenida en las distintas fermentaciones sumergidas.

	CL 1%	CL 3%	CN	P	OM	ST
Exo pectinolítica (U/mL)	47.86	21.80	15.72	14.97	14.28	10.10
Endo pectinolítica	12.23	8.90	0.00	0.00	0.00	0.00
Xilanolítica (U/mL)	11.17	46.95	4.82	0.00	101.99	53.50

*CL= Cáscara de Limón, OM= Olote de Maíz, ST= Salvado de Trigo, P= Pectina, CN= Cáscara de Naranja

6.2. Concentración y caracterización de los filtrados enzimáticos a utilizar y de las enzimas comerciales.

Debido a la cantidad de actividad enzimática obtenida en las filtraciones anteriores se eligió CL 1 % como la mejor condición para la producción de enzimas pectinolíticas y OM para la producción de enzimas xilanolíticas, estos dos filtrados se concentraron por ultrafiltración para tener un volumen 10 veces menor, posteriormente se volvieron a cuantificar sus respectivas actividades, al mismo tiempo se caracterizaron tres enzimas comerciales. Finalmente se eligió la número uno puesto

que ésta es la que se encuentra mas balanceada y se asemeja en cuanto a orden de actividad a los sistemas enzimáticos producidos.

Tabla 6.2.1. Caracterización de filtrados enzimáticos concentrados (FEC) y enzimas comerciales (EC)

	Endopectinasas	Exopectinasas (U/mL)	Xilanasas (U/mL)
FEC CL 1%	99.47	383.61	41.13
FEC OM	0.00	124.45	1082.53
EC 1	7107.24	11218.25	6171.72
EC 2	0.524	11.33	1.83
EC 3	1.275.37	7111.83	1581.45

Finalmente se renombraron las preparaciones enzimáticas a utilizar quedando de la siguiente manera: FEC CL 1% será referida como EEP, FEC OM como EEX y EC 1 como EC.

Los filtrados enzimáticos se almacenaron a -18°C hasta su uso. Cabe destacar que EEP y EEX únicamente fueron concentrados por lo que su medio de conservación se limita a agua destilada y algunas sales provenientes del medio que pudieron mantenerse ahí durante la ultra filtración, esto hace que las enzimas sean mas susceptibles a daños y a que su actividad se vea afectada a lo largo del tiempo (Luppo, et al. 2005), es por ello que después de su producción no pasaron mas de treinta días para su utilización.

6.2.1 Geles PAGE-SDS

Una vez obtenidos los filtrados enzimáticos a utilizar se realizó un gel de electroforesis PAGE-SDS. Siguiendo la metodología de la sección 6.2.1. En el gel se colocaron las distintas preparaciones enzimáticas y un marcador de peso molecular. La figura 6.2.1.1 nos muestra los resultados obtenidos.

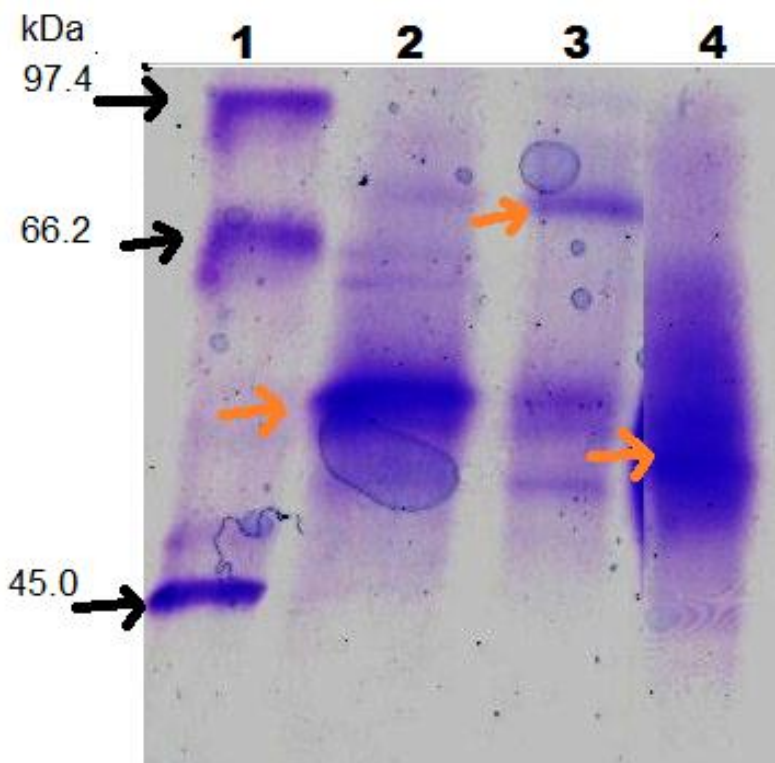


Figura 6.2.1.1. Gel de electroforesis SDS-PAGE.

- 1) Marcador de PM
- 2) EEP
- 3) EEX
- 4) EC

En la figura 6.2.1.1 observamos un gel de electroforesis PAGE-SDS donde se observan 4 carriles el primero es el marcador de peso molecular, los siguientes tres nos muestran los FE a utilizar. En el carril 2 observamos una mancha alrededor de los

50kDa en esta zona se encuentran las enzimas pectinolíticas (endo y exo). Esta misma banda pero más grande se encuentra en el carril 4. En ambos casos esperábamos obtener una o varias bandas en estas zonas puesto que éstos FE son los que tienen una mayor actividad pectinolítica, en el carril 3 también observamos esta banda sin embargo es mucho más tenue. Por otro lado, en el carril 3 también observamos una banda cercana a las 66kDa, ésta correspondería a las enzimas xilanolíticas, se puede confirmar esto al observar en los carriles 2 y 4 una banda muy tenue y una ausencia de ella respectivamente.

Aunque este gel nos da una idea de las enzimas encontradas en los FE también nos deja claro que son distintas, como se sabe cada microorganismo tiene enzimas distintas en cuanto a su estructura y peso molecular pero con las mismas funciones es por ello que los carriles no muestran exactamente las mismas bandas aunque se hable del mismo tipo de enzimas.

6.3. Preparación de los ensayos y dosis enzimáticas

Una vez obtenidas las preparaciones enzimáticas se determinaron las dosis a utilizar para su valoración en jugos cítricos. Debido a que uno de los objetivos de este trabajo es conocer el efecto de las enzimas xilanolíticas fue que se decidió probar tres dosis distintas de éstos y a su vez dos dosis enzimáticas distintas para las enzimas endopectinolíticas (EEP y EC). Además de esto se evaluó el efecto en conjunto de ambas dosis, de tal manera que se obtuvieron las siguientes 19 pruebas.

Tabla 6.3.1. Pruebas para evaluar el efecto de la cantidad de enzimas pectinolíticas y xilanolíticas en jugos de cítricos.

Prueba	Xilanasas U/mL	Endo pectinasas (U/mL)
1	50	0
2	100	0
3	200	0
4	0	25
5	50	25
6	100	25
7	200	25
8	0	50
9	50	50
10	100	50
11	200	50
12	0	25
13	50	25
14	100	25
15	200	25
16	0	50
17	50	50
18	100	50
19	200	50

En la tabla 6.3.1 se muestran 19 pruebas, de la 1 a la 3 son enzimas xilanolíticas obtenidas a partir la fermentación de olote de maíz, de la 4 a las 11 son las pruebas realizadas mezclando el FEC de OM y CL, finalmente de la prueba 12 a la 19 son las pruebas realizadas al mezclar la enzima comercial con el FEC de OM.

Es importante mencionar que las concentraciones de enzima xilanolítica fueron ajustadas a los valores que se muestran en la tabla anterior puesto que como se observa en la tabla 6.1.1 tanto EEP como EC contienen enzimas xilanolíticas, esto se realizó con el fin de poder homogeneizar las muestras lo mejor posible y poder evaluar realmente las dosis indicadas. En esta ocasión no se buscó estandarizar la cantidad de

enzimas exopectinolíticas por que para ello requerirían estar las tres enzimas separadas y eso no es objeto de estudio.

El objetivo de utilizar distintas dosis enzimáticas se hizo con la intención de observar y demostrar si las xilanasas ayudarían en el proceso de la obtención de los zumos de jugos cítricos, en qué aspectos mejoran o no y finalmente la mejor dosis tanto de éstas como de enzimas pectinolíticas, anteriormente se demostró que las enzimas EEP eran adecuadas para competir con las enzimas EC, sin embargo no eran tan buenas (Molina, 2011).

6.4 Evaluación de los filtrados enzimáticos y enzima comercial en jugos de cítricos.

Para la evaluación de los filtrados enzimáticos se obtuvo jugo tanto de limón como de naranja de forma manual, el jugo obtenido fue dividido en lotes de 200 mL para su posterior tratamiento, de trabajos anteriores se conocen el tiempo y temperatura óptimas para la realización del tratamiento enzimático térmico (Molina, 2011), éste consistió en, una vez agregado el volumen de tratamiento enzimático, incubar en un baño a 45 °C por 90 min. Posteriormente se realizaron las pruebas de caracterización del jugo que se muestran en esta sección.

A continuación se mostrarán los resultados estandarizados obtenidos a partir del procedimiento experimental antes descrito. Para el caso de las pruebas de Vol. de filtración y Claridad (disminución de la turbiedad) se estandarizaron con los controles realizados en cada serie. Para disminución de viscosidad se comparó contra el jugo sin tratamiento de cada serie. Para azúcares totales y reductores se tomó el control como 100 % y de ahí por medio de una regla de proporciones se obtuvo el valor para cada prueba. Finalmente azúcares insolubles en alcohol y peso residual se expresaron en porcentaje. Es por ello que en los resultados no se muestran los controles.

Antes de comenzar esta discusión de resultados cabe aclarar que estos ensayos fueron realizados por duplicado, en series de 6 (es decir, tres dosis enzimáticas distintas por duplicado), un control (jugo sin dosis enzimática pero incubado) y un segundo control (jugo sin tratamiento).

Como se sabe los ensayos o pruebas dependían en gran medida de la madurez de la fruta, a pesar que siempre se compró en el mismo lugar estas variaciones no se pueden controlar ya que los proveedores no siempre llevan la fruta en el mismo estado

de madurez.

NOTA: En cada grafica se observa una línea roja, ésta corresponde al valor otorgado para el control, con el fin de facilitar la comparación entre los ensayos realizados ya descritos.

En cada prueba se encontrarán dos gráficas, la primera siempre corresponderá a los ensayos realizados para jugo de limón persa mientras que las segundas gráficas serán para aquellos realizados en jugo de toronja sangría. Para ambos casos se utilizaron los mismos filtrados enzimáticos y enzima comercial, así como las mismas dosis

6.4.1 Volúmenes de Filtración

Para esta prueba se tomaron 175mL de jugo tratado con diferentes dosis y se filtraron con un embudo de plástico a través de papel filtro de cafetera por 60 minutos. Se registraron los volúmenes y posteriormente por medio de un factor unitario se estandarizaron con respecto a los controles.

En la figura 6.4.1.1 se muestran los resultados obtenidos para las pruebas de jugo de limón. En las primeras tres barras observamos cómo se favorece el volumen de filtración al utilizar enzimas xilanolíticas únicamente. Los resultados muestran que por si solas las enzimas xilanolíticas funcionan de manera similar en las tres concentraciones.

Sin embargo, al utilizar en conjunto las enzimas EEX y EEP observamos un comportamiento distinto. La dosis de EEX que sola parecía ser la menos favorable al ser combinada con 25 unidades de EEP muestra una mejora inigualable incluso por la mezcla de enzimas EC y EEX. Mientras que a mayores dosis (50 unidades) de EEP la disminución en los valores es notoria, siendo irónicamente la dosis intermedia de EEX la del menor valor

Por otro lado es claro, si observamos la misma figura, las dosis de 25 y 50 unidades de EC, que la enzima tiene un mejor efecto sola que al ser combinada con EEX siendo su mejor volumen de filtración a la dosis de 25 unidades de EC y 0 unidades de EEX.

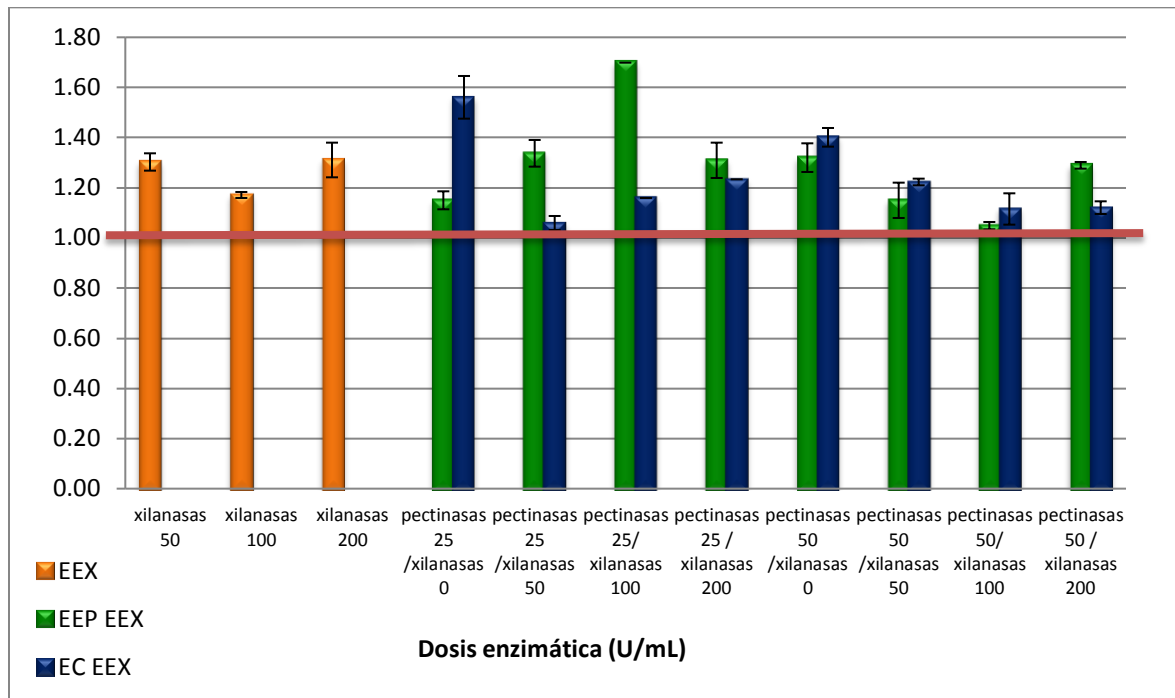


Figura 6.4.1.1. Volumen de filtración de jugo de limón por dosis enzimática con respecto a los controles.

En el jugo de toronja (figura 6.4.1.2) se observa que los tratamientos enzimáticos realizados no son tan efectivos en comparación con los realizados en el jugo de limón (fig 6.4.1.1). Es decir, el incremento en el volumen filtrado con respecto al control no es mayor en toronja que en limón.

En la figura 6.4.1.2 observamos que para las dosis donde solamente se incluye EEX la dosis de 100 unidades es la óptima, y la mejor dosis combinada es para la mezcla EC y EEX 50/50. Así mismo vemos que la mezcla de enzimas obtenidas en el laboratorio EEP y EEX muestra un volumen filtrado muy semejante al mencionado en las dosis 25/200 y 50/0 siendo, entre ellas, mínima la diferencia. Es decir es igual en cuanto al volumen de filtración utilizar 25 unidades de endopectinasa y 200 unidades de xilanasas que 50 unidades de endopectinasa.

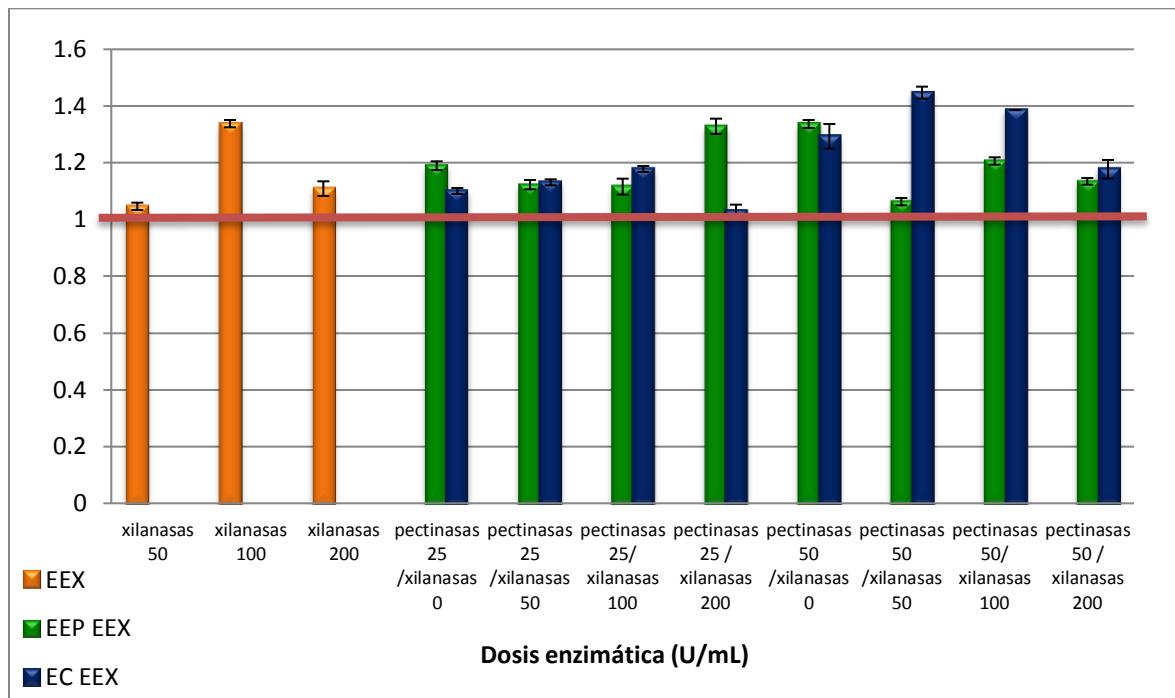


Figura 6.4.1.2. Volumen de filtración de jugo de toronja por dosis enzimática con respecto a los controles

6.4.2 Claridad

Este parámetro de caracterización de los jugos tratados se realizó a partir del jugo tratado y filtrado (sección 6.4.1.1) de acuerdo a la metodología descrita (Capítulo 5). Una vez obtenidos los valores de absorbancia éstos se estandarizaron con respecto al control por medio de un factor unitario.

Siendo así 1 el valor otorgado al control, de ahí todos los valores menores a éste significan una mejora en la claridad, es decir un aumento en la claridad o una disminución en la turbiedad.

A continuación se muestran dos figuras las cuales presentan los valores obtenidos para cada tratamiento enzimático en cada fruta cítrica probada. En ellas podemos observar claramente como se ve aumentada la claridad del jugo después de los tratamientos enzimáticos. Esto nos indica que cada dosis tuvo un efecto positivo en la degradación de los componentes de la pared celular.

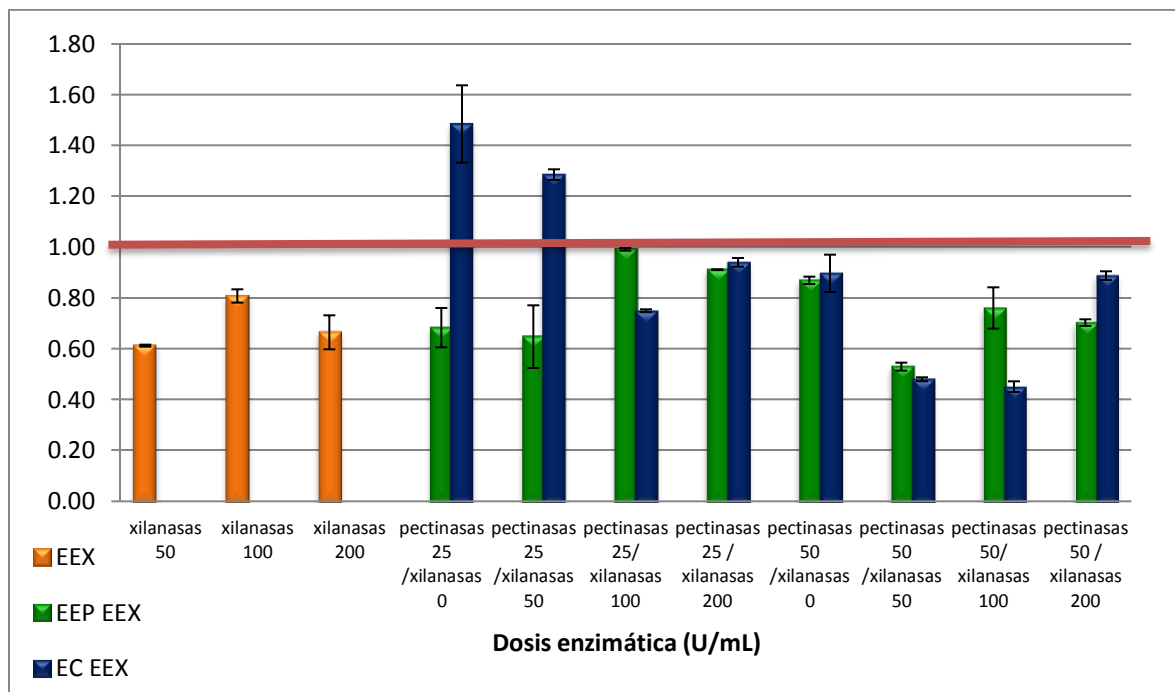


Figura 6.4.2.1. Claridad del jugo de limón después de los tratamientos enzimáticos.

Ahora de acuerdo con la figura 6.4.2.1 todos los tratamientos enzimáticos fueron efectivos a excepción de las dosis mas bajas donde se involucra la enzima EC, esto es interesante puesto que la figura nos indica que a dosis pequeñas la enzima EC no es capaz de disminuir la cantidad de sólidos suspendidos en el zumo de limón persa. Sin embargo, cuando se le agregan 50 unidades de EEX si se observa una disminución más no es suficiente.

Si observamos las barras de color naranja notamos que las enzimas xilanolíticas por si solas influyen ampliamente en la claridad del jugo lo que indica que el xilano es un polisacárido que influye en la opalescencia de los jugos, además de esto es interesante notar que el aumento de la claridad es muy comparable con aquellas pruebas donde se utilizan mezclas de enzimas pectinolíticas ya sea EC o EEP y esta enzima (EEX).

Por otro lado, de acuerdo a la literatura en la figura 6.4.2.1 observamos que a mayores dosis (50 unidades de endopectinasa) el aumento de claridad es máximo, siendo la mezcla EC EEX la mejor. Es importante hacer notar que la mezcla de enzimas experimentales EEP EEX a una dosis de 50/50 muestra una disminución muy semejante a la mezcla de enzimas EC EEX lo cual es bueno en este parámetro pues nos dice que EEP EEX podrían llegar a ser competentes en la industria.

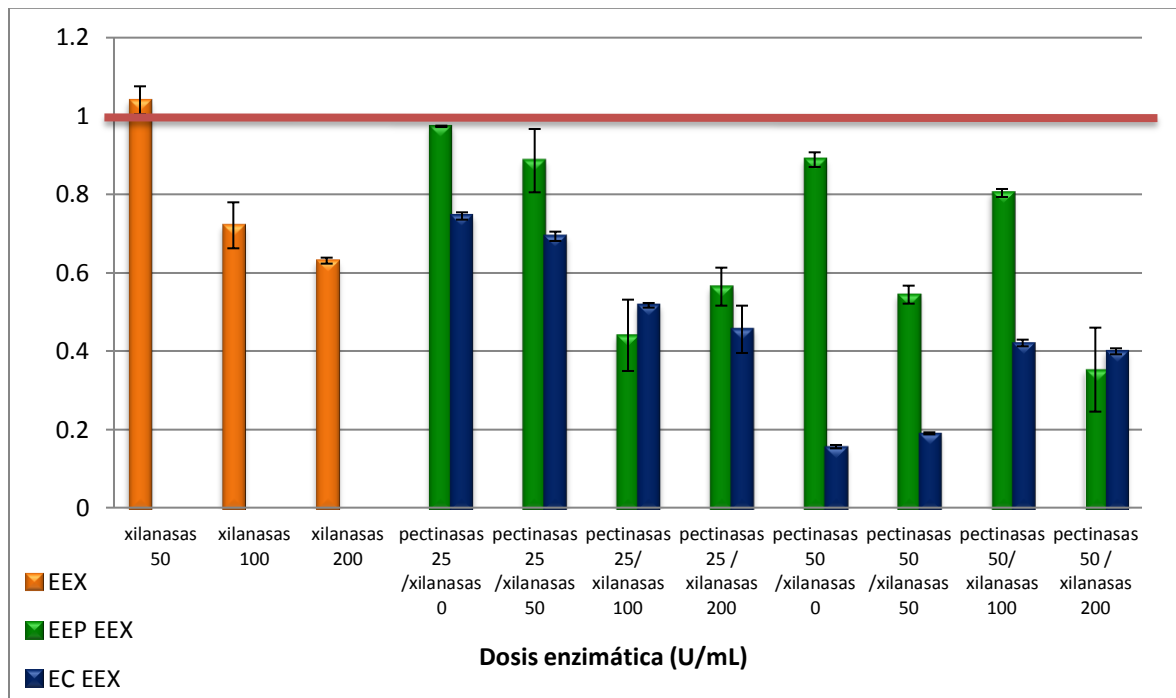


Figura 6.4.2.2. Claridad del jugo de toronja después del tratamiento enzimático

En el caso de los tratamientos realizados en jugo de toronja (figura 6.4.2.2) se observa que el tratamiento enzimático es mejor, es decir estas enzimas clarifican mas efectivamente el jugo de toronja que el jugo de naranja, esto se observa claramente ya que la dosis con la que se obtuvo una mejor claridad es aproximadamente 80 % mas baja que el control mientras que en el caso del jugo de limón únicamente se logró reducirlo aproximadamente 60 % en la misma dosis (50 EC /50 EEX).

Otro parámetro que se observa constante en ambos zumos es que la enzima EC mezclada con EEX presenta los máximos valores de clarificación y a mayor concentración enzimatica de xilanasas se observa una menor turbiedad.

En cuanto a la mezcla enzimática EEP EEX observamos un aumento de claridad conforme se aumentan ambas dosis, siendo el jugo más claro aquel con la mayor dosis probada (50 unidades de endopectinasa / 200unidades de xilanasas).

6.4.3 Reducción de la Viscosidad del jugo después del tratamiento

La reducción de la Viscosidad en el jugo tanto de limón como de toronja fue medido a partir del jugo filtrado y sin actividad enzimática como se describe en el capítulo 5.

Las figuras 6.4.3.1 y 6.4.3.2 muestran la reducción en la viscosidad para cada uno de los ensayos enzimáticos realizados. La reducción de la viscosidad de un jugo se traduce en una reducción de la cantidad de polisacáridos complejos presentes en él. Por lo que deberíamos esperar que las dosis que presentan una mejor claridad sean aquellas que presenten una mayor reducción en la viscosidad.

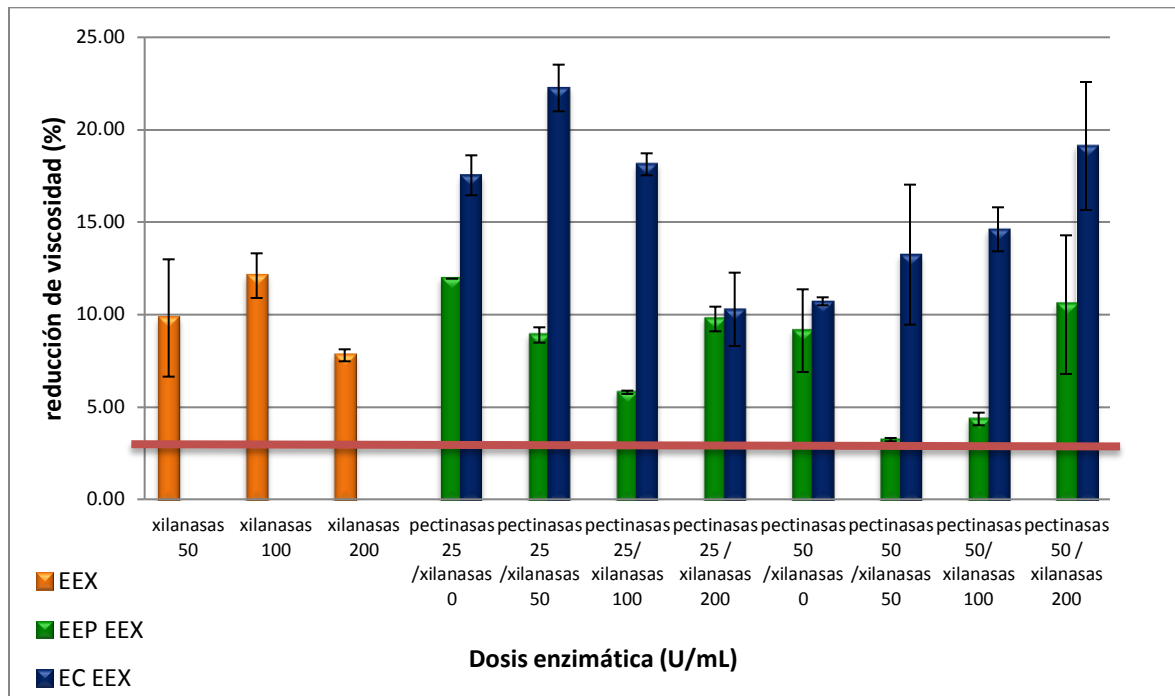


Figura 6.4.3.1. Velocidad de reducción de viscosidad del jugo de limón después del tratamiento enzimático con respecto al jugo sin tratar.

La enzima experimental EEX muestra una reducción de alrededor de 10 veces, lo que confirma lo observado en cuanto al aumento de volumen de filtración y aumento de claridad cuando se trata el jugo de limón con EEX. Únicamente con estos tres parámetros ya descritos nos damos cuenta de la importancia que las enzimas xilanolíticas tienen en la industria de jugos a pesar de no ser muy frecuentemente utilizadas.

Así mismo con esta figura (6.4.3.1) confirmamos que la enzima EC mezclada con EEX presenta una mayor capacidad en la reducción de la viscosidad que la mezcla de enzimas experimentales para jugo de limón. Es claro que a ciertas dosis (25/200 y 50/0) EEP y EEX compiten con EC EEX.

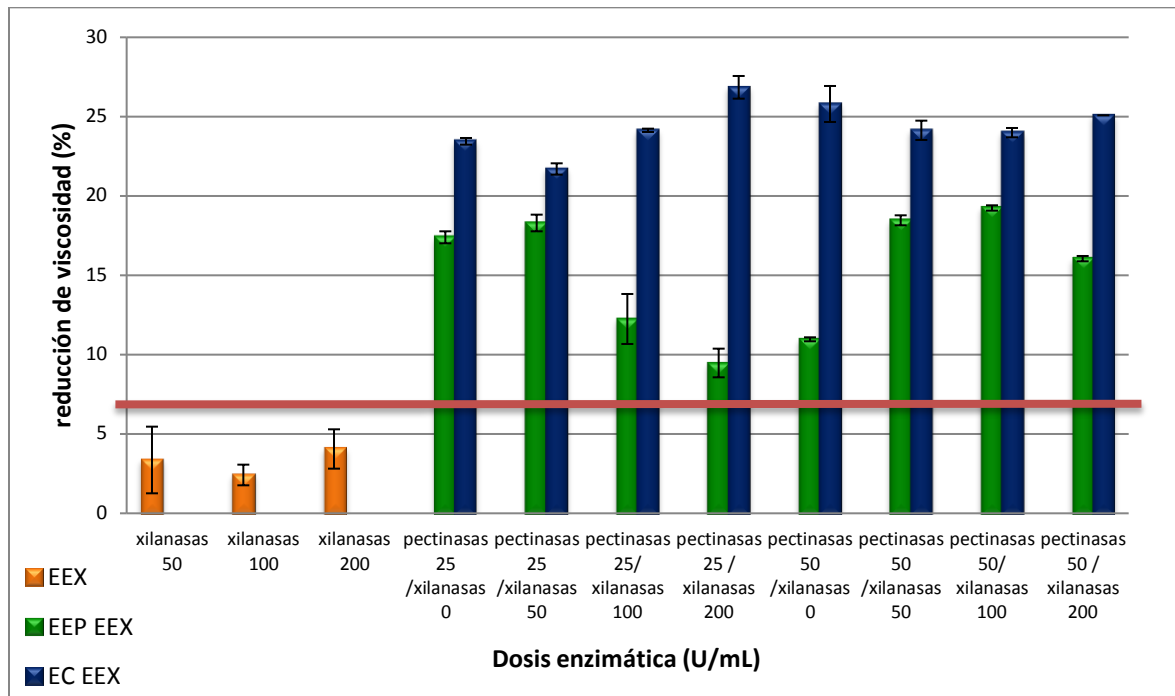


Figura 6.4.3.2. Disminución de la viscosidad del jugo de toronja después del tratamiento enzimático con respecto al jugo sin tratar.

En el caso del jugo de toronja después de los tratamientos enzimáticos se observó que el comportamiento de la viscosidad es distinto a aquel en las pruebas para jugo de limón. En éste observamos que las dosis de EEX no tienen un comportamiento benéfico puesto que en lugar de tener una reducción de viscosidad tenemos un aumento de ella; es probable que esto haya ocurrido debido a la alta degradación del xilano y por tanto una mayor liberación de la pectina, la cual no pudo ser degradada probablemente por el poco contenido de pectinasas en el jugo.

En la figura 6.4.3.2 donde se observan los resultados obtenidos en este parámetro para el jugo de toronja vemos una mayor homogeneidad entre la mezcla de enzimas experimentales (EEP EEX) y la mezcla de enzimas EC EEX. De nuevo EC EEX es mejor en todas las dosis. Sin embargo, la reducción presentada por EEP EEX es muy considerable pues se encuentra cercano a las 20 unidades mientras que las

mejores dosis están cercanas a las 25 unidades.

Hablando específicamente de las dosis EEP EEX las que mejores resultados dieron fueron 50/50 y 50/100. Esto es interesante ya que a estas dosis tampoco es notoria la diferencia para la mezcla EC EEX, es decir, tanto las enzimas experimentales como las comerciales tienen un comportamiento semejante a pesar de tener el doble de unidades de xilanasas.

Algo que destaca en estas figuras (6.4.3.1 y 6.4.3.2) es que las dosis con mayor reducción de viscosidad no son las dosis enzimáticas mas altas, comportamiento distinto al imaginado puesto que uno espera que al tener una mayor concentración enzimática la degradación de los componentes de la pared celular será mayor y por tanto la reducción será mayor. Aunado a esto se ha notado que la relación que existe entre la reducción de viscosidad y el volumen filtrado es inversamente proporcional.

6.4.4 Azúcares reductores.

Los azúcares reductores fueron determinados por cuadruplicado. El método seguido fue cuantificación por DNS a partir de una curva patrón de glucosa, posteriormente las concentraciones (mg/mL) obtenidas fueron relacionadas por medio de porcentajes con respecto al control. Todo esto se realizó para monitorear si había cambio o no y si éste pudiese ser significativo o no con respecto al control.

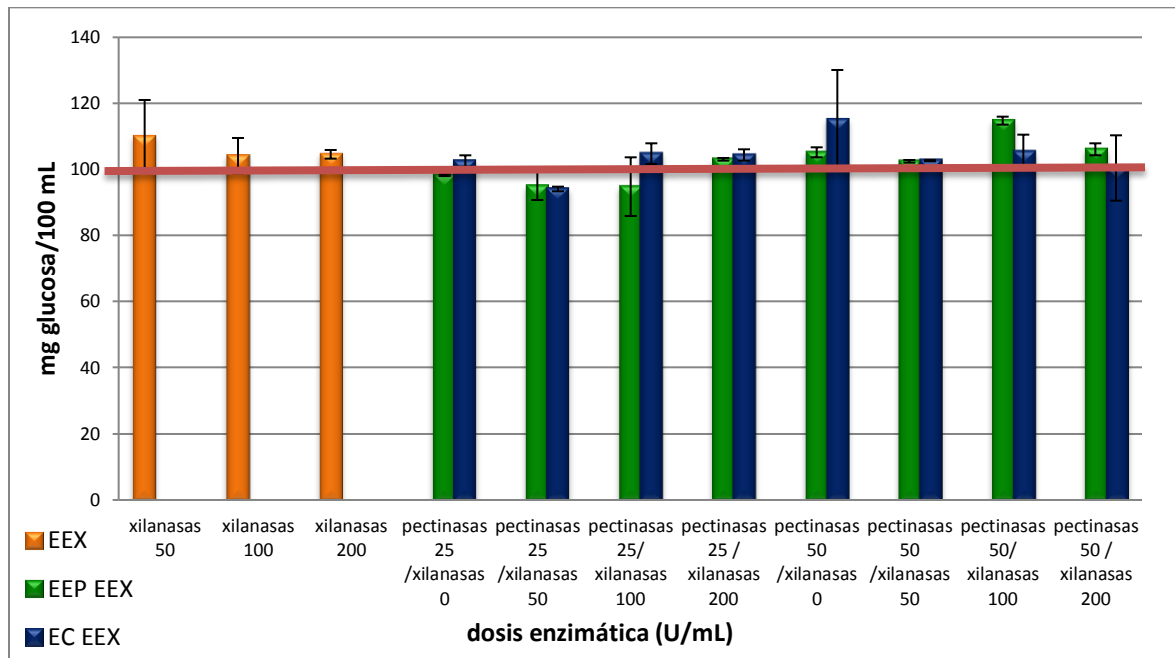


Figura 6.4.4.1. Azúcares reductores presentes en el jugo de limón después del tratamiento enzimático

En la figura 6.4.4.1 observamos una línea color rojo en 100 este es el valor otorgado a los controles utilizados para la realización de cada prueba de tratamiento de jugo de limón a diferentes dosis enzimáticas, como podemos observar los distintos tratamientos no muestran un aumento o reducción considerable con respecto a este control, es decir, que los tratamientos si modifican ciertos parámetros, como los ya antes descritos y otros por describir, pero no son factores de modificación en cuanto a la cantidad de azúcares reductores.

En la figura 6.4.4.2 observamos el mismo comportamiento para las pruebas de jugo de limón. En el caso del jugo de toronja en las dosis enzimáticas mas altas (ultimas 3 categorías) si hay un aumento de casi el 20% para la mezcla enzimática EEP EEX.

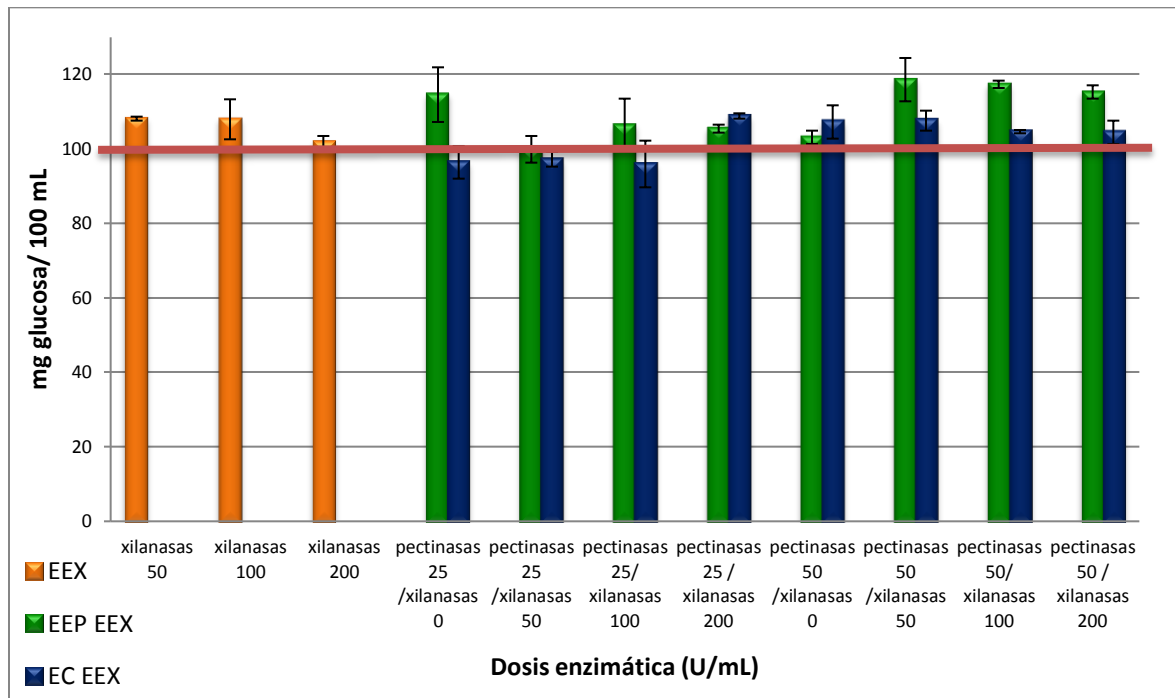


Figura 6.4.4.2. Azúcares reductores presentes en el jugo de limón después del tratamiento enzimático

6.4.5 Azúcares Totales.

La determinación de azúcares totales al igual que la de azúcares reductores es para comprobar que no hay un aumento significativo en ellos después de los tratamientos enzimáticos realizados para asegurar la calidad sensorial del producto. El tratamiento de los datos obtenidos a partir de la metodología descrita fue el mismo que para azúcares reductores.

NOTA: importante tener claro que no se realizaron pruebas sensoriales pero se espera que al no haber modificaciones drásticas en el contenido de azúcares no se aumentará

el dulzor de los jugos cítricos en cuestión.

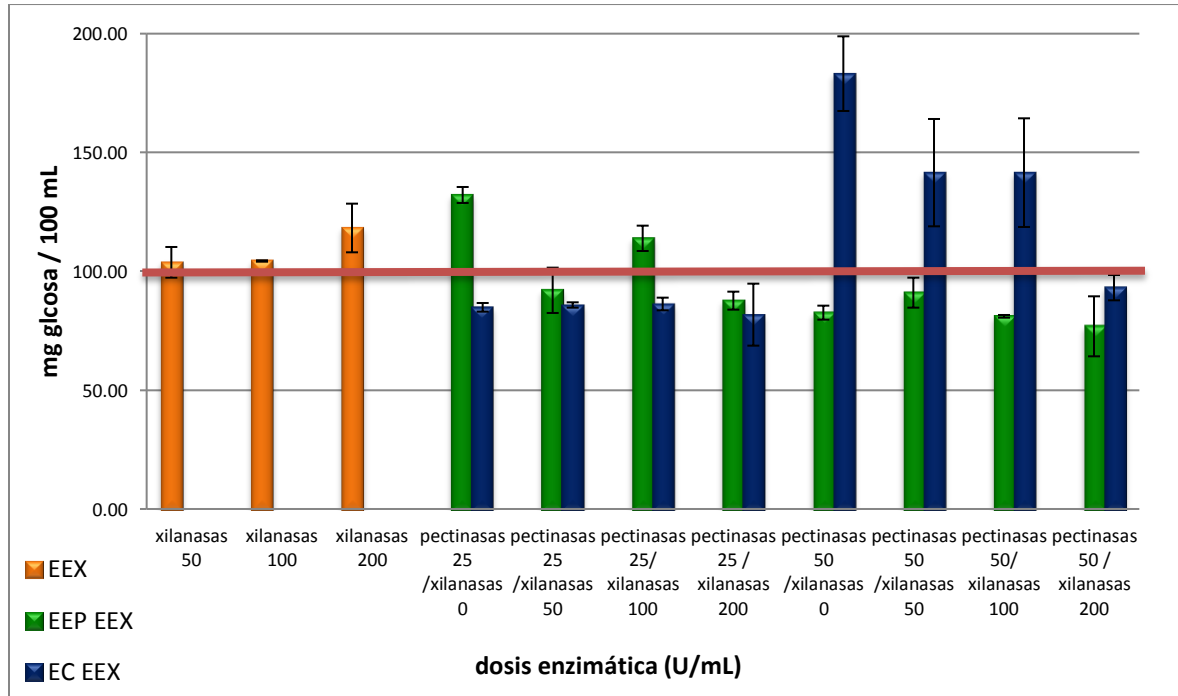


Figura 6.4.5.1. Azúcares totales presentes en el jugo de limón después de los tratamientos enzimáticos.

En la figura 6.4.5.1 se muestra el comportamiento obtenido para jugo de limón, en él observamos que en varias ocasiones si hay un aumento en la cantidad de azúcares totales de casi el doble mientras que en otras ocasiones vemos una reducción considerable, esto es algo que llama la atención ya que las enzimas al degradar los compuestos de la pared celular presentes en el jugo liberan ciertos azúcares que no eran cuantificables anteriormente, sin embargo en la mayoría de los casos este comportamiento es muy distinto.

El valor más alto obtenido es para la dosis enzimática EC EEX 50/0. Siendo ésta la que presentó un mayor contenido de azúcares reductores (figura 6.4.4.1), esto al igual que los otros tres resultados con un aumento significativo en la cantidad de

azúcares muy probablemente se deba al contenido de enzimas exopectinolíticas y enzimas accesorias (no determinadas) presentes en la mezcla comercial. Como se mencionó anteriormente (ver sección 6.1.1) estas enzimas no pudieron ser controladas pero se sabe que es mayor su concentración en EC que en EEP (Molina, 2011).

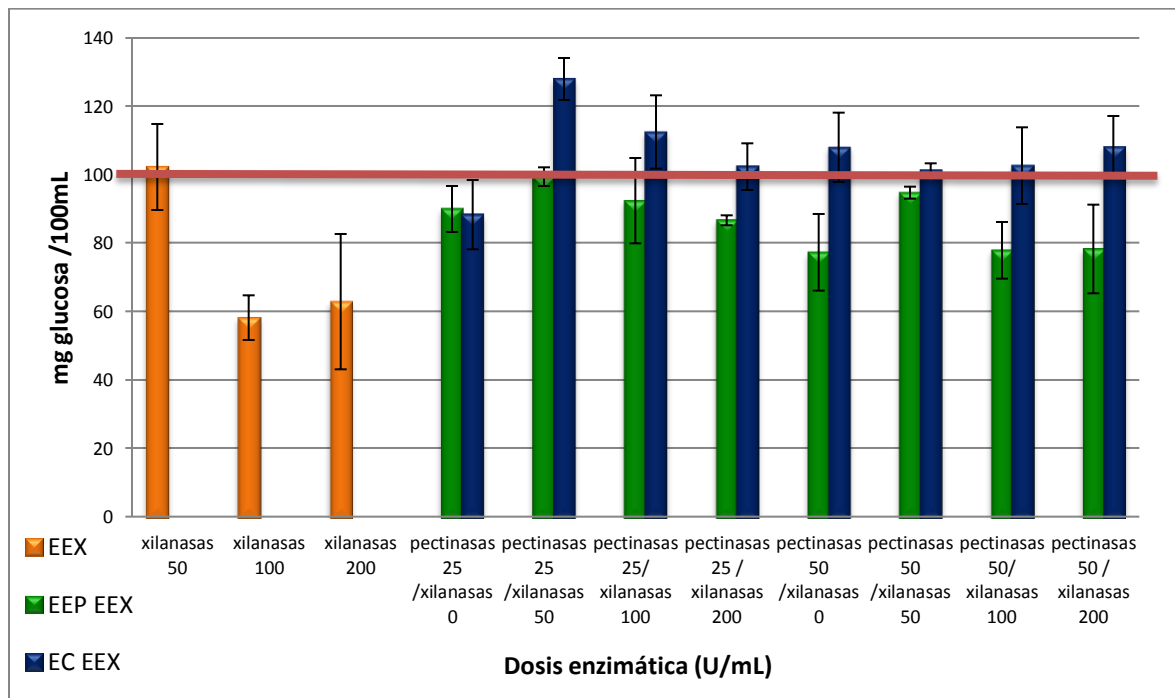


Figura 6.4.5.2. Azúcares totales presentes en el jugo de toronja después de los tratamientos enzimáticos.

A diferencia de las pruebas de jugo de limón en jugo de toronja (figura 6.4.5.2) los resultados son un poco más homogéneos, aquí volvemos a observar que las pruebas que contienen EC están por arriba el control. Mientras que las enzimas experimentales están por debajo.

En cuanto a las enzimas comerciales a pesar de no ser las que presenten una mayor reducción en la viscosidad o un gran aumento en la claridad del jugo en este aspecto muestran una ventaja: los jugos no muestran un alto contenido de azúcares lo

que favorecería en la producción de ciertos zumos de frutas cítricas bajos en azúcar.

6.4.6 Sólidos insolubles en alcohol (ASI)

Los sólidos insolubles en alcohol son aquellas moléculas no degradadas lo suficiente por los tratamientos enzimáticos presentes en el jugo cítrico después de ser obtenido.

Una vez más se muestra la línea roja en las dos figuras obtenidas para este parámetro. En esta ocasión para la obtención de este control se realizó un promedio de los controles obtenidos durante estas pruebas de caracterización.

En ambos casos (jugo de limón y jugo de toronja) se obtuvieron datos muy favorables ya que la disminución de ASI es muy notoria. Esto se traduce en una reducción en los tamaños de las partículas suspendidas en el jugo y por tanto menor porcentaje de ASI equivale a un mejor volumen de filtración.

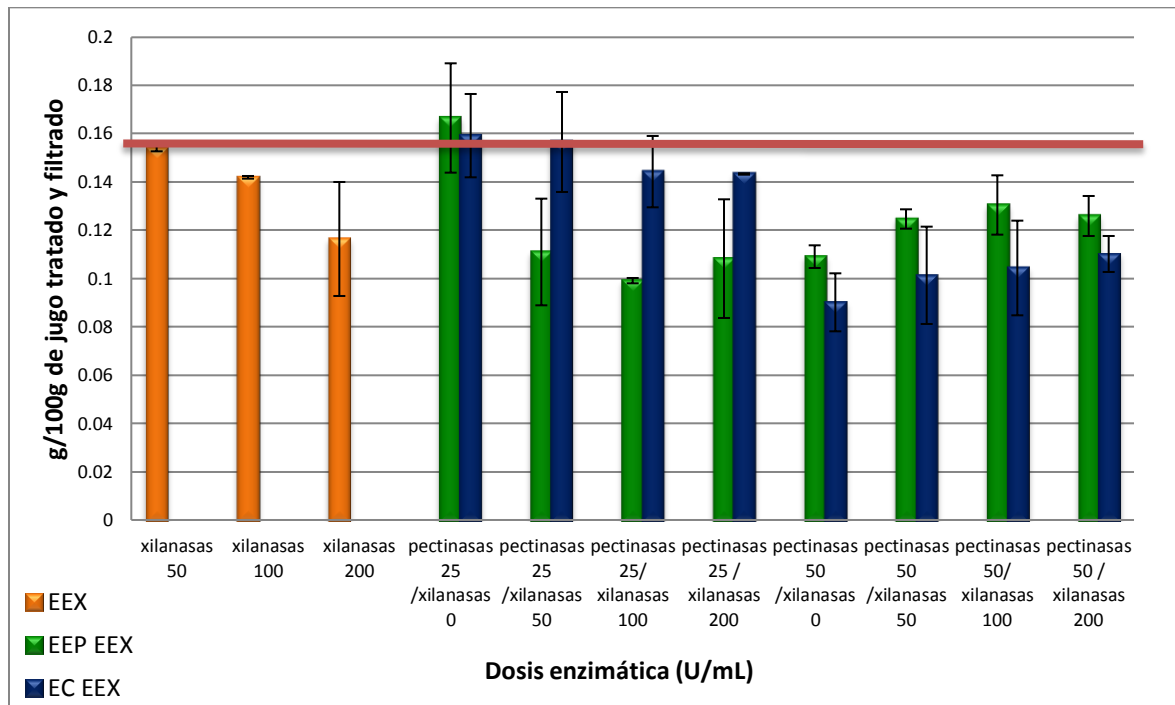


Figura 6.4.6.1. Sólidos insolubles en alcohol (ASI) en el jugo de limón después de los tratamientos enzimáticos.

La figura 6.4.6.1 nos muestra los valores obtenidos de ASI para cada prueba después del tratamiento. En ella observamos como disminuye la cantidad de sólidos al aumentar las dosis enzimáticas. Así mismo observamos que a dosis mayores (últimos tres grupos de barras) la reducción es mayor para la mezcla EC EEX que para EEP EEX sin embargo el comportamiento es al revés a menores dosis: (grupos 5 a 7 de barras en la figura 6.4.6.1). Esto es un hallazgo importante puesto que a lo largo de esta discusión hemos encontrado que la mezcla de enzimas experimentales es mejor a menores dosis, lo cual indica que en la industria es un amplio competidor con la enzima comercial en cuestión ya que al usar una menor cantidad se obtienen mejores resultados.

En la figura 6.4.1.1 observamos que el mejor volumen de filtración era para la dosis EEP EEX 25/100, ahora si observamos en la figura 6.4.6.1 esa misma dosis

enzimática coincide con ser de los menores valores de ASI y el mayor volumen de filtración. Confirmamos este comportamiento al ver en la figura 6.4.6.1 el valor más bajo que corresponde a la dosis EC EEX 50/0 que en la figura 6.4.1.1. Es el segundo mejor volumen de filtración.

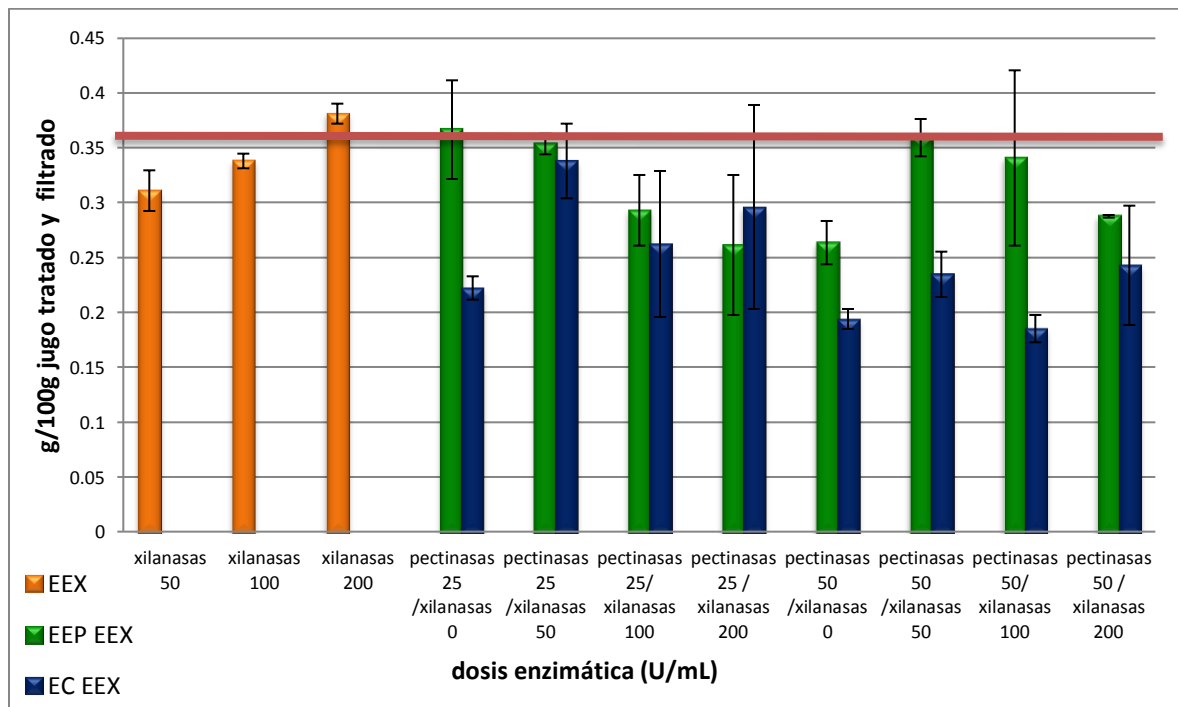


Figura 6.4.6.2. Sólidos insolubles en alcohol (ASI) en el jugo de toronja después de los tratamientos enzimáticos.

Anteriormente se mencionó que los mejores volúmenes de filtración corresponden a los menores porcentajes de ASI en jugo de limón. Para jugo de toronja, figura 6.4.6.2, observamos el mismo comportamiento en las dosis EC EEX 50/50 que fue el mejor volumen de filtración (fig 6.4.1.2) y para EEP EEX 25/200 y 50/0 donde son los mejores volúmenes para las enzimas experimentales y los mas bajos porcentajes de ASI para las mismas.

6.4.7. Peso residual

La pectina insoluble o pectina residual o peso residual es lo que nos indica cuanta pectina fue degradada durante el tratamiento enzimático, esto se traduce en un mejor rendimiento del jugo pues al tener una mayor degradación de los componentes de la pared celular se libera una mayor cantidad de jugo y con esto se verán modificados los seis parámetros anteriores.

El control para el peso residual fue el promedio de todos los controles obtenidos durante el desarrollo de este proceso experimental y se muestra como una línea roja en cada una de las figuras.

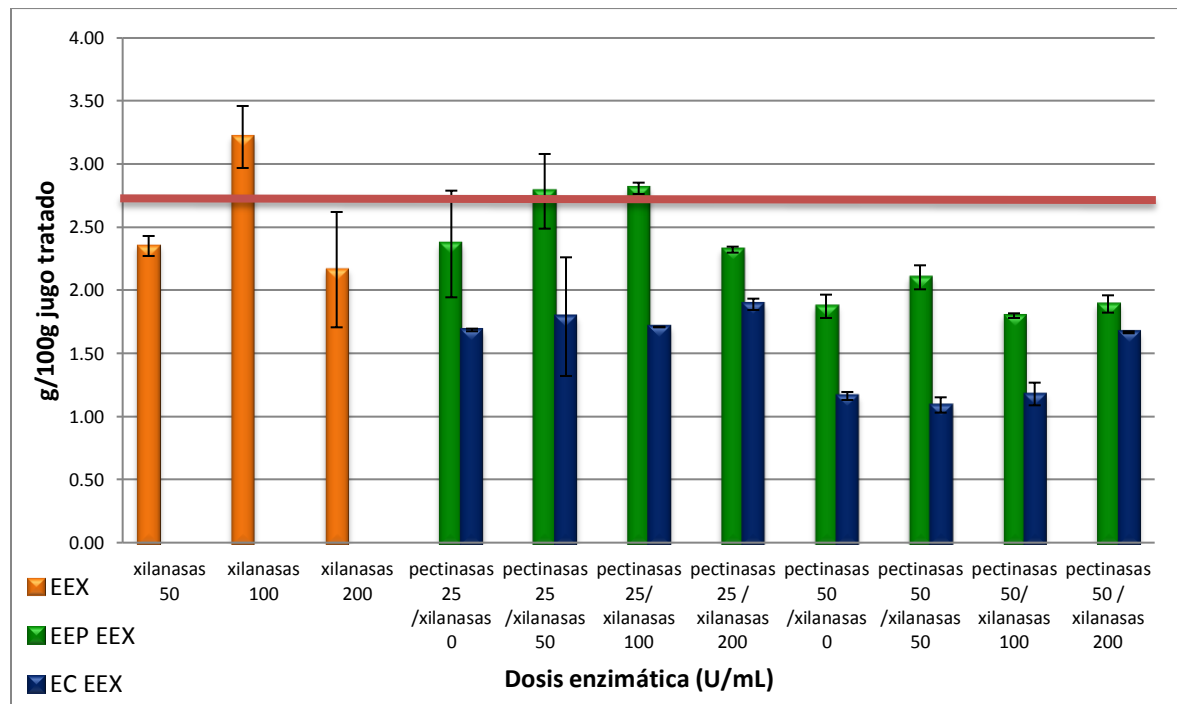


Figura 6.4.7.1. Pectina insoluble en el jugo de limón después del tratamiento enzimático.

En la figura 6.4.7.1 observamos que en las dosis enzimáticas EEX que hay un aumento de pectina insoluble en la dosis enzimática de 100 unidades de xilanasas, esto muy probablemente se deba a que hubo gran degradación de la parte del xilano en la pared celular pero no se logró degradar la pectina. Por otro lado las dosis enzimáticas cuya eficiencia es mayor en la degradación de la pectina son aquellas con EC EEX en dosis de 50 unidades endopectinolíticas, es decir a mayor dosis mayor degradación de las grandes cadenas de pectina y por tanto menor cantidad de pectina insoluble después del tratamiento.

Adicionalmente en la figura 6.4.7.1 observamos un comportamiento distinto al esperado basándonos en los resultados obtenidos en volumen de filtración (figura 6.4.1.1), es decir, con la dosis que mayor volumen de filtración tuvo es la dosis que tiene una mayor cantidad de pectina, por no decir igual que el control. Al observar esto nos queda claro porque en el resto de los parámetros determinados anteriormente no se encontró esta dosis (25/50 EEP/EEX) como la mejor. En ocasiones la degradación de pectina es favorable. Sin embargo, la concentración de iones Ca^{2+} y el pH favorecen a la formación de compuestos precipitables (Unilever, 2000).

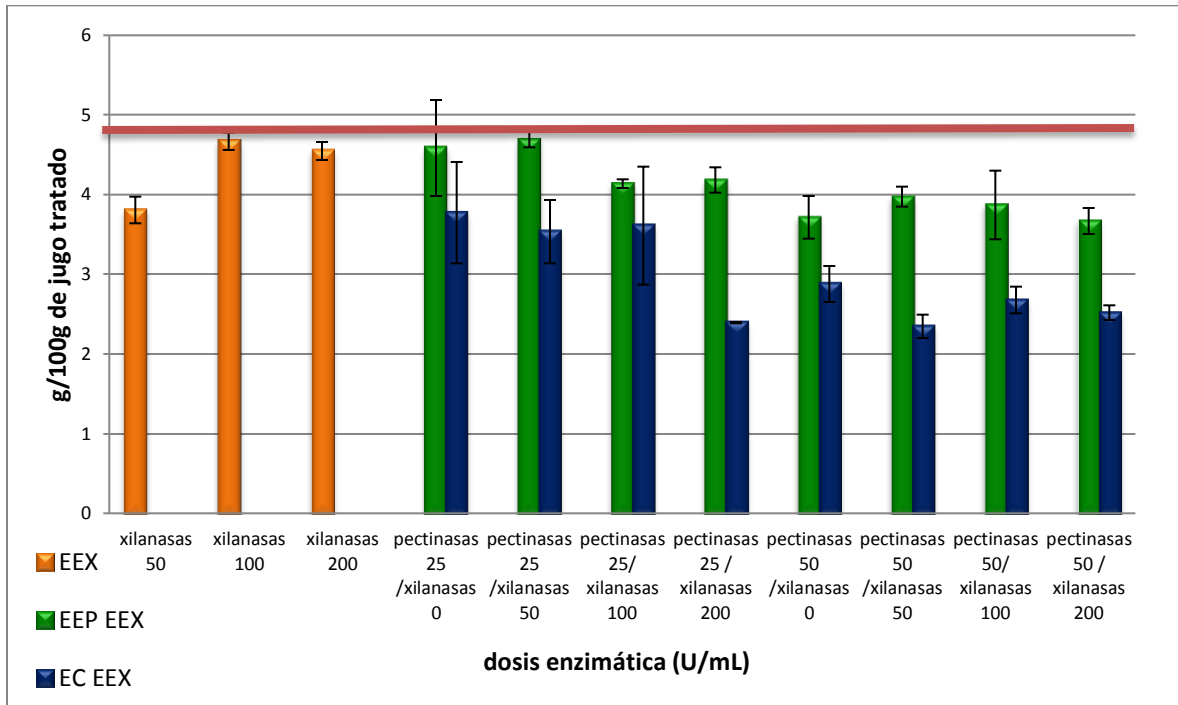


Figura 6.4.7.2. Pectina insoluble en el jugo de toronja después del tratamiento enzimático

Ahora en la figura de arriba (figura 6.4.7.2) observamos que en todos casos se logró la disminución de pectina insoluble, a pesar de no ser tan favorable como en el caso del jugo de limón, los resultados mostrados son más homogéneos. Con homogéneos nos referimos a que los resultados son consecuentes con las dosis aplicadas, mayor cantidad de enzima pectinolítica (EEP o EC) y mayor cantidad de enzima xilanolítica (EEX) en conjunto son el resultado de una mayor disminución en la pectina residual.

6.4.8 Determinación de pH

Se realizó la determinación de pH siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 5.

Esta determinación se realizó por duplicado para cada prueba y para cada jugo. El promedio de pH para jugo de limón con una variación de ± 0.2 es de 2.3. Para jugo de toronja el promedio de pH con una variación de ± 0.3 es de 3.56. Estos valores de pH son favorables para la actividad de las enzimas utilizadas.

6.4.9 Determinación de acidez total

La determinación de acidez total se encuentra reportada como % de ácido cítrico y fue realizada y calculada de acuerdo con la metodología del Capítulo 5.

Al igual que en la determinación de pH cada determinación se realizó por duplicado, se obtuvo un promedio y se observó que no había diferencia de más de 0.1 entre los distintos tratamientos y su control. Siendo así los valores obtenidos son 4.4 % para jugo de limón persa y 0.85 % para jugo de toronja.

6.4.10 Comparación general de resultados

En esta sección se mostrarán dos tablas para cada jugo analizado donde se resumirán los puntos más importantes a tratar de los parámetros que definen a las enzimas como más o menos efectivas. Los parámetros de azúcares reductores y totales, al igual que pH y % de acidez se omitirán de esta sección ya que no son decisivos en lo antes mencionado.

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 (Molina, 2011)

Las tablas 6.4.10.1 y 6.4.10.3 nos muestran un resumen general de la efectividad de cada tratamiento enzimático de acuerdo a un parámetro en específico. La tabla es presentada con cruces siendo el máximo valor 5 cruces. La cantidad de cruces se otorgaron por grupos, es decir las 19 pruebas (ver tabla 6.3.1) realizadas se dividieron en tres. El primer grupo de la prueba 1 a la 3 (EEX), el segundo de la 4 a la 11 (EEP/EEX) y el último de la 12 a la 19 (EC/EEX). En cada grupo se asignaron 5 cruces al mejor y 1 cruz al peor.

En general, estas tablas, sí, se analizan renglón por renglón permiten ubicar fácilmente cuáles son las pruebas (dosis enzimáticas) que tuvieron un efecto más favorable en una mayor cantidad de parámetros, un ejemplo de esto son las pruebas 16 y 17 de la tabla 6.4.10.3 así como las pruebas 8, 16 y 17 de la tabla 6.4.10.1.

Tabla 6.4.10.1. Efectividad de los tratamientos enzimáticos por parámetro y por tipo de enzima o mezcla para jugo de limón.

Prueba (Ver tabla 6.3.1)	Vol. Filtración	Claridad	Red. Viscosidad	ASI	Peso residual
1	+++	+	++	+	+
2	+	+++	+++	++	-
3	+++	++	+	+++	++
4	++	+++	+++++	-	++
5	+++	++++	+++	++++	-
6	+++++	+	++	+++++	-
7	+++	++	++++	++++	++
8	+++	++	++++	++++	++++
9	++	+++++	-	+++	+++
10	+	+++	+	+++	++++
11	+++	+++	++++	+++	++++
12	+++++	-	++++	-	+++
13	+	-	+++++	+	+++
14	++	+++	++++	++	+++
15	+++	++	++	++	++
16	++++	++	++	+++++	++++
17	+++	++++	+++	++++	+++++
18	++	+++++	+++	++++	++++
19	++	++	++++	+++	+++

- Los valores están por arriba del control.

Tabla 6.4.10.2 Mejores tres dosis enzimáticas pectinolíticas en orden descendiente y mejor dosis xilanolítica por parámetro para jugo de limón

	1er mejor dosis pectinolítica	2da mejor dosis pectinolítica	3er mejor dosis pectinolítica	Mejor dosis xilanolítica
Vol. Filtración	25/100 EEP/EEEX	25/0 EC/EEEX	50/0 EC/EEEX	50 y 200
Claridad	50/100 EC/EEEX	50/50 EC/EEEX	50/50 EEP/EEEX	50
Red. Viscosidad	25/50 EC/EEEX	25/100 EC/EEEX	25/100 EC/EEEX	100
ASI	50/0 EC/EEEX	25/100 EEP/EEEX	50/50 EC/EEEX	200
Peso residual	50/50 EC/EEEX	50/0 EC/EEEX	50/100 EC/EEEX	200

En el siguiente grupo de tablas (6.4.10.2 y 6.4.10.4) observamos las mejores tres dosis de tratamiento enzimático para cada parámetro encargado de definir la efectividad de las enzimas utilizadas para la clarificación. Estas tablas nos ayudan a dejar mucho más en claro cuál o cuáles dosis así como cuáles enzimas tuvieron mayor efectividad en cada jugo cítrico. En la última columna observamos los mejores resultados para la enzima EEX.

Tabla 6.4.10.3 Efectividad de los tratamientos enzimáticos por parámetro y por tipo de enzima o mezcla para jugo de toronja.

Prueba (Ver tabla 6.3.1)	Vol. Filtración	Claridad	Red. Viscosidad	ASI	Peso residual
1	+	-	-	+++	+++
2	+++	++	-	++	+
3	++	+++	-	-	+
4	+++	+	++++	-	+
5	++	++	++++	-	-
6	++	++++	++	+++	++
7	++++	++++	+	++++	++
8	++++	++	++	++++	++++
9	+	++++	++++	-	+++
10	+++	+++	++++	+	+++
11	++	+++++	+++	++	++++
12	++	+	+++	++++	++
13	++	+	++	+	++
14	+++	++	++++	+++	++
15	+	+++	+++++	++	++++
16	++++	+++++	++++	+++++	+++
17	+++++	+++++	+++	+++	++++
18	++++	++++	+++	+++++	+++
19	+++	++++	+++	+++	++++

- Los valores están por arriba del control.

Tabla 6.4.10.4. Mejores tres dosis enzimáticas pectinolíticas en orden descendiente y mejor dosis xilanolítica por parámetro para jugo de toronja.

	1er mejor dosis pectinolítica	2da mejor dosis pectinolítica	3er mejor dosis pectinolítica	Mejor dosis xilanolítica
Vol. Filtración	50/50 EC/EEX	50/100 EC/EEX	25/200 EEP/EEX	100
Claridad	50/0 EC/EEX	50/50 EC/EEX	50/200 EEP/EEX	200
Red. Viscosidad	25/200 EC/EEX	50/0 EC/EEX	50/200 EC/EEX	----
ASI	50/100 EC/EEX	50/0 EC/EEX	25/0 EC/EEX	100
Peso residual	25/200 EC/EEX	50/0 EC/EEX	50/200 EC/EEX	100

El objetivo principal de las tablas 6.4.10.2 y 6.4.10.4 es el de eliminar los resultados que a pesar de ser favorables no son realmente significativos con respecto al resto.

En la tabla 6.4.10.2 vemos que de acuerdo con Molina (2011) ninguna de las dosis es capaz de cumplir con los 3 parámetros. Sin embargo, observamos que hay 2 dosis enzimáticas que se muestran en 3 de los 5 parámetros (dosis 50/0 y 50/50 EC/EEX) y otras 2 que están presentes en 2 (25/100 EEP/EEX y 50/100 EC/EEX), es curioso que las dosis que aparecen con mayor frecuencia son aquellas que contienen a la EC y únicamente una para las enzimas experimentales, esto nos hace pensar que EC es mejor sin embargo, hay que notar que EC se encuentra a mayor concentración que EEP. Es difícil comparar estas enzimas al ser cada una mejor para cierto parámetro,

por tanto no se puede concluir tajantemente cual enzima es mejor. Sin embargo, si podemos decir que la enzima desarrollada en el laboratorio tiene potencial puesto que es algo experimental y figura dentro de las óptimas, los resultados obtenidos fueron favorables aunque no excelentes. Por otro lado también hay que tomar en cuenta que la enzima comercial utilizada contiene una gran cantidad de enzimas cuyas actividades no fueron cuantificadas y que podemos observar en el gel PAGE- SDS (figura 6.2.1.1) lo cual probablemente favorece la clarificación. Esto no quiere decir que las enzimas experimentales no las tengan, sin embargo, muy probablemente estén en mucha menor concentración. En trabajos anteriores se encontró que *A. flavipes* FP-500 es productor de pectinesterasa (Molina 2011) siendo esta concentración es aproximadamente 5 veces menor que en la enzima comercial.

Ahora para el jugo de toronja (tabla 6.4.10.4) observamos que hay una dosis que cumple con los parámetros que según Molina (2011) indican una clarificación óptima, esta dosis es 50/0 EC/EEX, dosis que coincide con ser de las óptimas para jugo de limón. Después de esta encontramos 3 dosis distintas que cumplen con 2 de los 5 parámetros y estas una vez más son de la enzima comercial y con dosis 50/50,50/100 y 25/200. Finalmente podemos observar que las enzimas comerciales en dosis de 50/200 y 25/200 favorecen la claridad del jugo y el volumen de filtración respectivamente. El que solamente dos dosis de la enzima comercial aparezcan en esta tabla no quiere decir que las demás no fueran favorables, sino que la enzima comercial tuvo un efecto más notable y significativamente diferente.

Con esto nos podemos dar cuenta que la enzima comercial actúa de mejor manera en el jugo de toronja, es decir a pH's un poco mas altos y que la enzima experimental es mejor a pH mas bajos y dosis mas bajas.

CAPÍTULO 7.

Conclusiones

Se logró obtener dos filtrados enzimáticos con las características deseadas, uno con máxima actividad pectinolítica y otro con máxima actividad xilanolítica. Siendo las actividades 99.47 U endopectinolíticas y 383.61 U exopectinolíticas, y 1082.52 U xilanolíticas. Los cuales fueron probados contra una enzima comercial.

Se encontró que la CL al 1 % es la mejor concentración de la fuente compleja de carbono para la producción de enzimas pectinolíticas y que OM 3 % produce una máxima actividad xilanolítica y mínima endo y exo pectinolíticas.

Se encontró que las enzimas xilanolíticas por si solas son importantes en la degradación de la pared celular y esto afecta favorablemente, en la mayoría de los casos, la clarificación de los dos jugos probados. Para el caso de jugo de limón se encontró que las enzimas xilanolíticas trabajan mejor a una concentración de 200 U en 200mL de jugo y para el jugo de toronja en 100 U.

Para determinar si existe un efecto sinérgico ente las enzimas xilanolíticas y pectinolíticas es necesario realizar mas pruebas puesto que mientras en unos casos se encontró esto favorable en otros se observó lo contrario. Sin embargo, cabe destacar que en las tablas 6.4.10.2 y 6.4.10.4 para jugo de limón y jugo de toronja las mejores tres dosis encontradas en cada parámetro en su mayoría fueron las que contenían EEX.

Se encontró que la mejor dosis enzimática para los tratamientos realizados para jugo de limón fue 50/0 EC/EEX y para jugo de toronja 50/0 EC/EEX. Las mejores dosis a partir de las enzimas experimentales y contra las cuales podría competir la enzima comercial utilizada a pesar de su gran diferencia en cuanto a actividad exopectinolítica

son 25/100 EEP/EEEX para jugo de limón y 25/200 EEP/EEEX para jugo de toronja.

Es claro que hacen falta más pruebas al respecto y debido a los resultados obtenidos con las enzimas xilanolíticas sería recomendable observar el comportamiento y resultados si los tratamientos enzimáticos se dan por separado, siendo recomendable primero el tratamiento xilanolítico y segundo el tratamiento pectinolítico. También es necesario probar las enzimas a mayores dosis para obtener resultados más concretos pues a dosis tan bajas los resultados pueden ser muy variables.

CAPÍTULO 8

Bibliografía

Abarca, Ma. Lourdes., (2000), "Taxonomía e Identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial". Revista Iberoamericana de Micología, no. 17, S79.

Annis S.L. y Goodwin, P.H., (1997). "Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degradative enzymes produced by plant pathogenic fungi". European Journal of Plant Pathology, 103(1):1-14.

Aro N., Pakula T., Penttila M. (2005). "Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi". Federation of European Microbiological societies. Microbiology Letters 29: 719-739.

Astiasarán I., Martínez J.A., (2000), "Alimentos composición y propiedades", McGrawHill, Madrid España.

Bacic A, Harris P.J., and Stone B.A., (1988), "Structure and function of plant cell walls, in the biochemistry of plants", vol. 14 (ed. J. Presiss), Academic Press, New York, pp. 297-371.

Bioss, Centre of Biological Signalling studie, University Freidburg, “Structured TIRF Microscopy and Microrheology in Plant Cell Walls” <http://www.bioss.uni-freiburg.de/cms/tirf-microscopy.html> , (último acceso 1 agosto 2012)

Bradford M., (1976), “A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. Analytical Biochemistry, vol. 72, no. 1-2, p. 248-254.

Biotechmass, Biomass Biotechnology, “Enzyme-aided extraction of bioactive components from biomass”, <http://www.chemeng.ntua.gr/biotechmass/extraction.html>, (último acceso 15 mayo 2012)

Chapman H.D., Morris V.J., Selvendran R.R. and O’neil M.A., (1987), “Static and dynamic light-scattering studies of pectic polysaccharides from the middle lamellae and primary cell walls of cider apples Carbohydrate research”, No.165, pp. 53-68.

Chan H.T.jr., (1983),”Handbook of Tropical Foods”, Marcel Dekker INC., NY, USA

COVECA, Comisión veracruzana de comercialización agropecuaria , “Monografía del limón, (2011) http://portal.veracruz.gob.mx/portal/page?_pageid=653,3990014&_dad=portal&_schema=PORTAL (último acceso 1 agosto 2012).

COVECA, Comisión veracruzana de comercialización agropecuaria , “Monografía de la toronja, (2011) http://portal.veracruz.gob.mx/portal/page?_pageid=653,3990014&_dad=portal&_schema=PORTAL (último acceso 1 agosto 2012)

de Vries P., Visser J., (2001), “*Aspergillus* Enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4) 497-522.

de Vries,P., Visser, J., (1999), “Accessory enzymes involved in xylan and pectin degradation”. Tesis Doctorado, Wageningen Agricultural University., Holanda, pp. 2-6.

Des Abbayes H., Chadeaud M., Feldmann J., de Ferre Y., Gausson H., Grasse P.P. y Prevot A.R., (1989), “Botánica de vegetales inferiores”, editorial Reverte, Barcelona España, pp 335-336

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F., (1956), “Colorimetric method for determination of sugars and related substances”, *Analytical Chemistry* 28, pp. 350–356

Gielkens, M., (1999), “A molecular analysis of (hemi-)cellulose degradation by *Aspergillus*”. pp. 9-11.

Kashyap R., P.K. Vohra, S. Chopra, R. Tewari., (2001), “Applications of pectinases in the comercial sector: a review”, *Bioresource Technology*, 77: 215-227.

Knee M., (2002), “Bases biológicas de la calidad de la fruta”, ed. Acribia s.a., España.

Lozano J.E., (2006), “Fruit Manufacturing. Scientific Basis, Engineering Properties, and Deteriorative Reactions of Technological Importance”. Editado por Gustavo V. Barbosa-Cánovas. Springer.

Luppo E.; Hong T.; Lambers J.; Wilhelmus J., (2005), “Utilización de composiciones que comprenden enzimas estabilizantes”. España, Patente ES 2 237 789 T3.

Martínez Trujillo M.A., (2009), “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, pp. 15-16.

Miller G.L., (1959), “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”. *Analitical Chemistry*, 3, pp. 426–428.

Molina P.O., (2011), “Tesis: 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”, F.Q. UNAM.

Montes H. Ma. Del Carmen, Magaña P. I., (2002), "Enzimas con aplicación industrial", XXX Aniversario de Biotecnología y Bioningeniería, Avance y Perspectiva, vol. 21, pp. 279-282.

NCBE/Unilever, (2000), "In a Jam and out of juice", www.ncbe.reading.ac.uk

Ponce, T., Perez, O., (2002), "Celulasas y xilanasas en la industria", XXX aniversario de la biotecnología y bioingeniería, avance y perspectiva vol. 21, 273-277

Rai P.; De S., (2009) "Clarification of pectin-containing juice using ultrafiltration" Current Science, 96, 1361-1371.

Rai P.; Majumdar G.C.; Das Gupta S., De S., (2004), "Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology", Journal of Food Engineering (Elsevier) 64, pp. 397-403.

Samson Robert A., (1994) "Taxonomy - current concepts of *Aspergillus* systematics". Vol. 7, en *Aspergillus*, edited by J.E. Smith, 1-22. New York: Plenum Press.

Schols H.A.; Voragen G. J., (2003), "Pectic Polysaccharides", Vol. 66, en *Handbook of Food Enzymology*, edited by John R. Whitaker, Alphons G. J. Voragen y Dominic W.S. Wong. New York: Marcel Dekker Inc.

Secretaría de economía, (2010), Guías empresariales de la Secretaría de Economía. <http://www.contactopyme.gob>. (ultimo acceso 15 enero 2012)

Silva, C., Silveira, M., Riveros, R., Zeni, M., (2004), "Concentración de pectinasas por ultrafiltración con membranas de polisulfonas", Revista iberoamericana de polímeros 5(3): 143-152

Sunna A. y Antranikian G., (1997), "Xylanolytic Enzymes from Fungui and Bacteria", Critical Reviews in Biotechnology, 17(1) 39-67.

Van Buren J., (1991), "Function of pectin in plant tissue structure and firmness", The Chemistry and Technology of Pectin., Reginald H. Walter, ed. Academic press., California, pp1-8

Wainwright, M., (1995), "Introducción a la Biotecnología de los hongos". Acribia, España.

Yegres S.; Sánchez J.; Belmar M.; Riveros W.; Belmar D., (2001), "Producción de enzimas pécticas. Ensayos Preeliminarios". (Saber, Universidad de Oriente), 13, 55-59.