



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción

“Caracterización de pectinasas antárticas y su uso en la
clarificación de jugo de manzana”

EXAMEN COMPLEXIVO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIEROS DE ALIMENTOS

Presentada por:

Gabriela García Cevallos

Abel Chafra Guamán

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2015

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darnos las fuerzas necesarias.

A nuestros padres y familiares, quienes nos han dado su apoyo incondicional para poder cumplir nuestras metas.

Al Ph.D. Juan Manuel Cevallos, Director de nuestro Trabajo Final de Graduación, quien nos brindó una ayuda altamente profesional y nos guió para la realización del mismo.

Al Ing. Jeffrey Vargas, quien nos ayudó con sus conocimientos para el desarrollo de la parte experimental y al CIBE, por habernos dado todas las facilidades para la realización de este trabajo.

Y a todas las personas que de una u otra manera colaboraron para el desarrollo del mismo.

DEDICATORIA

A NUESTROS PADRES

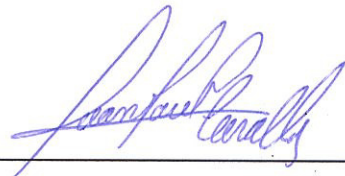
A NUESTRA FAMILIA

A NUESTRAS AMISTADES

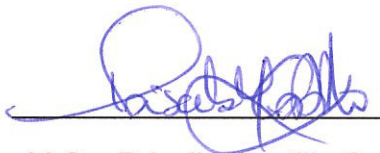
TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN



Ing. Jorge Duque R.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



Ph.D. Juan Manuel Cevallos C.
DIRECTOR DEL EXAMEN
COMPLEXIVO



M.Sc. Priscila Castillo S.
VOCAL

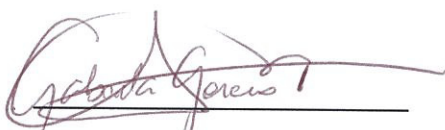


CIB - ESPOL

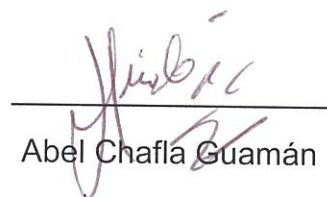
DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido desarrollado en el presente Examen Complexivo nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)



Gabriela García Cevallos



Abel Chafía Guamán

RESUMEN

La gran demanda del uso de enzimas extremófilas para su uso industrial, nos lleva a buscar nuevas fuentes para obtenerlas. El propósito de este trabajo se centra en la búsqueda de enzimas pectinolíticas que trabajen a temperaturas de refrigeración, además de caracterizar su actividad y determinar sus condiciones óptimas de temperatura y pH.

Para esto se utilizó cepas de hongos aislados de muestras de suelos de la Antártida, que producen enzimas pectinolíticas y se encuentran conservados en el CIBE (Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador). Se evaluó la actividad pectinolítica de 15 cepas de hongos mediante inoculación en placas con agar y pectina. Solo 3 presentaron actividad pectinolítica, denotada por la presencia de un halo de hidrolisis en las placas incubadas a 16°C. Las cepas seleccionadas codificadas como CIBE-201, CIBE-214 y CIBE-223 fueron incubadas en medios minerales con pectina para la producción de las enzimas, a las cuales se les realizó purificación parcial y liofilización posterior.

Los liofilizados fueron sometidos a pruebas para caracterizar la actividad pectinolítica, determinar su T y pH óptimo y evaluar su uso en el proceso de clarificación.

Se evaluó la presencia de tres tipos de enzimas pectinolíticas en los liofilizados. La pectin esterasa, la pectato liasa y la endo polimetil galacturonasa. La actividad de pectin esterasa se determinó por la cantidad de metanol liberado o por el aumento en el grupo carboxilo libre valorado por titulación. La actividad endo polimetil galacturonasa se determinó al medir con un viscosímetro la reducción de la viscosidad de una solución de pectina inoculadas con los liofilizados. La pectato liasa se evaluó mediante la medición del aumento de la absorbancia a 232 nm debido a la producción de enlaces insaturados durante la despolimerización del ácido galacturónico.

Se procedió al estudio de las condiciones óptimas de las enzimas en los liofilizados CIBE-201 y CIBE-223 mediante pruebas de actividad a diferentes temperaturas y pH ajustadas al modelo no lineal de Rosso. La temperatura óptima determinada para las enzimas fue de 34°C, pudiendo trabajar en un rango de -30°C a 50°C, mientras que el pH óptimo está en 6.5, con un pH

mínimo de 1.9 y máximo de 9.9. Con esta temperatura y pH óptimos, más una temperatura guía se trabajó en la clarificación de un jugo de manzana.

Para establecer si la enzima presente en los liofilizados clarificaba muestras de jugo, se midió la disminución de los valores de absorbancia de un jugo de manzana procesado con los liofilizados enzimáticos y a su vez se le midió la absorbancia a un jugo procesado con una enzima pectinasa comercial, ambos sometidos a la temperatura óptima establecida y a la temperatura normal de clarificación. Estos resultados fueron evaluados estadísticamente mediante pruebas ANOVA. Las diferencias significativas se establecerán mediante análisis de varianza utilizando un α : 0.05.

Los resultados obtenidos indicaron que las enzimas en estudio presentan actividad pectin esterasa y endo polimetil galacturonasa. Clarifican significativamente el jugo de manzana tanto a 7°C en un 60% y a 45°C en un 70%; por lo que trabaja con igual eficacia en un amplio rango de temperaturas.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	v
ABREVIATURAS.....	ix
SIMBOLOGÍA.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Enzimas.....	4
1.1.1. Naturaleza de las enzimas.....	4
1.1.2. Cinética enzimática.....	6
1.1.3. Obtención y purificación de enzimas.....	9

1.1.4. Enzimas extremófilas.....	12
1.1.5. Enzimas en los alimentos.....	13
1.1.5.1. Pectinasas.....	16
1.2. Elaboración de Jugos.....	23
1.2.1. Proceso de elaboración.....	23
1.2.1.1. Jugo de manzana. Características.....	24
1.2.1.2. Clarificación del jugo de manzana.....	27
1.3. Objetivos.....	28

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.1. Obtención y caracterización de pectinasas extremófilas.....	30
2.1.1. Aislamiento y selección de microorganismos productores de pectinasas.....	31
2.1.2. Producción de pectinasas.....	33
2.1.3. Caracterización de la enzima.....	34
2.1.3.1. Determinación de actividad de pectin esterasa.....	35

2.1.3.2. Determinación de actividad de pectato liasa.....	37
2.1.3.3. Determinación de actividad de endopolimetil galacturonasa.....	38
2.2. Determinación de condiciones óptimas de actividad enzimática....	39
2.2.1. Ensayos de temperatura.....	40
2.2.2. Ensayos de pH	41
2.2.3. Análisis estadístico y determinación de condiciones óptimas.....	44
2.3. Uso de pectinasa en el proceso de clarificación del jugo de manzana.....	46
2.3.1. Clarificación por pectinasas antárticas.....	47
2.3.2. Clarificación usando enzimas comerciales.....	48
2.3.3. Evaluación turbidimétrica.....	49

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS.....	50
3.1. Microorganismos productores de pectinasas.....	50

3.2. Determinación de los tipos de pectinasas.....	52
3.3. Determinación de las condiciones optima de operación.....	55
3.3.1. Temperatura óptima.....	56
3.3.2. pH óptimo.....	68
3.4. Clarificación del jugo de manzana.....	78
3.4.1. Evaluación turbidimétrica.....	80

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES.....	86
----------------------	----

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza
APE	Actividad de pectin esterasa
APL	Actividad de pectato liasa
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
EC	Enzima Comercial
EPG	Endo polimetil galacturonasa
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
PE	Pectin esterasa
PL	Pectato liasa
PDA	Potato Dextrose Agar
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
YEC	Yeast Extrac Cloramphenicol

SIMBOLOGÍA

DNS	Ácido 3.5-Dinitrosalicílico
ATP	Adenosin tris fosfato
S	Azufre
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
C	Carbono
cm	Centímetro
Cl	Cloro
NaCl	Cloruro de sodio
K_m	Constante de Michaelis-Menten
\emptyset	Diámetro
g	Gramo
°C	Grado Celsius
hl	Hectolitro
H	Hidrógeno
NaOH	Hidróxido de sodio
Kg	Kilogramo
l	Litro
\pm	Más o menos
>	Mayor que
<	Menor que
meq	Miliequivalente
min	Minuto
μ	Micra
μ l	Micro litro

μm	Micrómetro
mg	Miligramo
ml	Mililitro
M	Molar
nm	Nanómetro
α	Nivel de significancia
#	Número
N	Normal
O	Oxígeno
%	Porcentaje
K	Potasio
pH	Potencial de Hidrógeno
psi	Pounds per square inch
p	Probabilidad de aceptación
rpm	Revoluciones por minuto
SAB	Sabouraud Dextrose Agar
s	Segundo
Na	Sodio
T	Temperatura
U	Unidad de enzima
V	Velocidad máxima

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Representación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato	8
Figura 1.2	Estructura polimérica de la pectina conformada por unidades de ácido D-galacturónico entre sí por enlaces α 1-4	17
Figura 1.3	Estructura de pectina	18
Figura 1.4	Acción de la pectin liasa sobre la cadena de pectina	20
Figura 1.5	Acción de la poligalacturonasa sobre la cadena de pectina	21
Figura 1.6	Acción de la pectin esterasa sobre la cadena de pectina	22
Figura 1.7	Diagrama de flujo de proceso para el jugo de manzana clarificado	27
Figura 2.1	Hongos CIBE-201, CIBE-214 y CIBE-223	32
Figura 2.2	Hongos en medio mineral	33
Figura 2.3	Sobrenadante liofilizado	34
Figura 2.4	Titulación de la actividad pectin esterasa	36
Figura 2.5	Viscosímetro rotacional BROOKFIELD	39
Figura 2.6	Muestras antes de la reacción enzimática con DNS	42
Figura 2.7	Muestras después de la reacción enzimática con DNS	43
Figura 2.8	Espectrofotómetro para medir la absorbancia	43
Figura 2.9	Jugo sin clarificar	46
Figura 2.10	Jugo clarificado con el sobrenadante liofilizado	48
Figura 2.11	Jugo clarificado con la enzima comercial	49
Figura 3.1	Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 3°C	56

Figura 3.2	Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 7°C	57
Figura 3.3	Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 12°C	58
Figura 3.4	Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 16°C	58
Figura 3.5	Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 20°C	59
Figura 3.6	Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 27°C	60
Figura 3.7	Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 34°C	61
Figura 3.8	Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 45°C	62
Figura 3.9	Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 50°C	63
Figura 3.10	Actividad enzimática de CIBE-201 con temperatura	65
Figura 3.11	Actividad enzimática de CIBE-223 con temperatura	66
Figura 3.12	Actividad enzimática de EC con temperatura	67
Figura 3.13	Efecto de pH 3 en la reacción enzimática	69
Figura 3.14	Efecto de pH 3.5 en la reacción enzimática	70
Figura 3.15	Efecto de pH 4.5 en la reacción enzimática	71
Figura 3.16	Efecto de pH 6 en la reacción enzimática	72
Figura 3.17	Efecto de pH 7 en la reacción enzimática	73
Figura 3.18	Efecto de pH 8 en la reacción enzimática	74
Figura 3.19	Efecto de pH 9 en la reacción enzimática	75
Figura 3.20	Actividad enzimática de CIBE-201 con pH	76
Figura 3.21	Actividad enzimática de CIBE-223 con pH	77
Figura 3.22	Actividad enzimática de EC con pH	77
Figura 3.23	Actividad enzimática de CIBE-223 y EC a 7°C en la maceración	79
Figura 3.24	Actividad enzimática de CIBE-223 y EC a 45°C en la maceración	80

Figura 3.25	Actividad enzimática de CIBE-223 y EC a 7°C en la clarificación	82
Figura 3.26	Actividad enzimática de CIBE-223 y EC a 45°C en la clarificación	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de la enzimas de acuerdo a IUPAC	15
Tabla 2	Determinación cualitativa de actividad pectinolítica en hongos a los 15 días	51
Tabla 3	Actividad de pectin esterasa	53
Tabla 4	Actividad de pectato liasa	54
Tabla 5	Actividad de endopolimetil galacturonasa	55
Tabla 6	Efecto de la temperatura (°C) en la actividad enzimática (U/ml)	64
Tabla 7	Comparación de los valores de temperatura	67
Tabla 8	Comparación de los valores de pH	78
Tabla 9	Análisis de la clarificación con liofilizados y enzima Comercial	81

INTRODUCCIÓN

La biotecnología microbiana es muy utilizada actualmente, y se cuenta con herramientas que nos permite explotar la biodiversidad de los microorganismos y aplicar todas sus capacidades metabólicas para diferentes usos, incluyendo la industria de alimentos.

Desde que las enzimas fueron descubiertas han sido utilizadas para diferentes procesos industriales, y las de origen microbiano tienen una gran aplicación debido a su alta producción, eficacia, selectividad y sin daño el medio ambiente.

Este trabajo forma parte del proyecto “Microorganismos antárticos: aislamiento, identificación, preservación y evaluación de su potencial biotecnológico” dirigido por el CIBE de la ESPOL, que cuenta con el auspicio de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) y del Instituto Antártico Ecuatoriano (INAE).

En esta investigación se caracterizaron y se utilizaron las enzimas producidas extracelularmente por cepas de hongos extremófilos aislados del suelo de la Antártida, para un proceso de clarificación de jugo de manzana.

En el capítulo 1 se definirán los conceptos de enzimas extremófilas y de las enzimas pectinasas, clasificación y su uso en la industria de alimentos.

En el capítulo 2 se detallarán los procesos bajo los cuales se produjo la enzima y se investigará que tipo de enzimas pectinasas están presentes en nuestros sobrenadantes liofilizados. Se realizarán pruebas experimentales a diferentes temperaturas y pH para obtener velocidades de reacción y mediante modelo matemático de Rosso se determinarán la temperatura y pH óptimos de cada sobrenadante liofilizado. Con esa temperatura óptima y con una temperatura utilizada comúnmente en la industria se procederá a la evaluación de su uso en la clarificación del jugo de manzana.

En el capítulo 3 se detallarán los resultados de los experimento y se discutirá sobre los mismos.

El capítulo 4 tratará sobre las conclusiones y recomendaciones con respecto a la investigación realizada.

CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Enzimas

1.1.1. Naturaleza de las enzimas

Las enzimas son biomoléculas de origen proteico globular (1) formadas generalmente por una cadena poli peptídica, especializadas en la catálisis de reacciones químicas a muy altas velocidades y con un elevado grado de especificidad (2). Se incluye la regulación como una de sus características, la cual es importante para los procesos bioquímicos (3). Tienen las siguientes características que las hacen especiales (1,2):

- a) Son efectivas en pequeñas cantidades.
- b) No sufren ninguna modificación de las características durante la reacción.

- c) No afectan la reacción que catalizan, solo llegan más rápidamente al equilibrio, pero el mismo es igual al que llegarían en ausencia del catalizador.

Las enzimas están formadas en muchos casos por una parte proteínica (apoenzima) y una parte no proteica (cofactor). Este último es un compuesto de peso molecular bajo, estable al calor y que presenta diversos grados de unión con la apoenzima; los principales cofactores son las vitaminas (tiamina, niacina, piridoxina, riboflavina y ácido pantoténico), los cationes (cobre, molibdeno, zinc, magnesio, hierro, manganeso y calcio), los aniones (cloruros) y otras sustancias orgánicas (1).

Algunas de las enzimas tienen la capacidad de transformar más de un millón de moléculas de sustrato por segundo y por molécula de enzima (1).

Debido a que son proteínas, las enzimas son afectadas por factores como temperatura, pH, humedad, la fuerza iónica, presión etc. Y al

igual que ellas presentan un centro activo a través del cual interactúan con las moléculas de sustrato (1).

El centro activo es una cavidad en la superficie de las enzimas en donde se encuentran aminoácidos específicos y que participan directamente en la unión y en la transformación del sustrato. Solo existe uno por molécula de enzima (1).

1.1.2. Cinética enzimática

La cinética enzimática comprende el estudio de los parámetros que influyen en la velocidad de las reacciones químicas catalizadas por enzimas (2). Estas transformaciones se llevan a cabo mediante una ruta que requiere menos energía de activación. La actividad enzimática no se puede medir en términos de concentración, ya que puede estar presente en forma desnaturalizada y sin funcionalidad; por esta razón se empleó la Unidad internacional de Actividad Enzimática, definida como la cantidad de enzima que se requiere para transformar en producto una micro mol de sustrato por minuto, en las condiciones óptimas de pH y temperatura (1).

La concentración de sustrato debe ser aquella en que la enzima se encuentre actuando con su velocidad máxima (1). Cuando el sustrato no se ha podido caracterizar se utiliza la actividad específica, definida como las unidades de actividad de la enzima en relación con la cantidad de proteínas en miligramos (1).

La cinética de las reacciones catalizadas por enzimas tiene una característica especial que no se presenta en las reacciones no enzimáticas. Se refiere a la saturación de la enzima por el sustrato. Al medir la velocidad inicial de una reacción enzimática se observa que a bajas concentraciones de sustrato la velocidad es proporcional a dicha concentración (sistema de primer orden); a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad ya no es proporcional y se vuelve un sistema de orden fraccionario (sistema de segundo orden); y mientras siga aumentando esta concentración la velocidad de reacción es totalmente independiente de la cantidad de sustrato y se aproxima asintóticamente a un valor máximo conocido como velocidad máxima (V) (Figura 1.1) y que es característico de cada enzima (sistema de orden cero). En este último caso, donde la velocidad es independiente de la concentración de sustrato, la enzima ha alcanzado su estado de saturación (1).

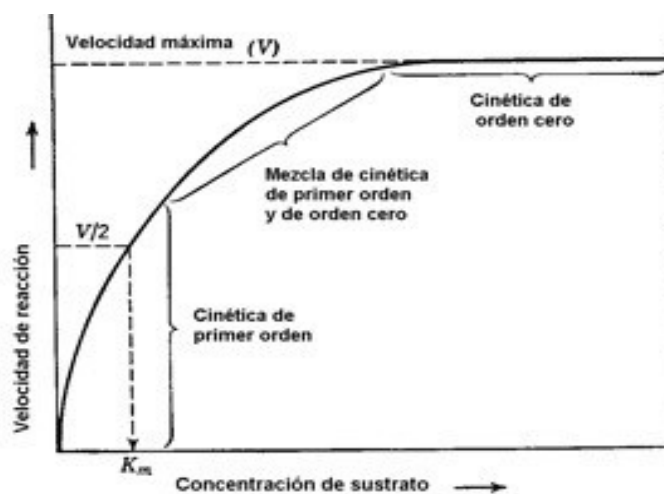


FIGURA 1.1 Representación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato

Fuente: (4)

La concentración de sustrato a la cual la reacción alcanza la mitad de la velocidad máxima se le conoce como K_m (constante de Michaelis-Menten). Esta constante tiene un valor característico para cada enzima y es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato. Valores altos de K_m indican una baja actividad mientras que un K_m bajo indican una alta afinidad (1).

1.1.3. Obtención y purificación de enzimas

Las enzimas tienen muchas aplicaciones en diversos tipos de industria, especialmente en alimentos. En algunos casos las enzimas son propias de los microorganismos que se utilizan directamente en los procesos; en otros casos se utilizan enzimas aisladas de microorganismos para su posterior uso. Las principales fuentes de obtención de las enzimas de uso industrial son (2,5):

- Animales: estomago, páncreas e hígado de animales
- Vegetales: papaya, pina, cebada y otros
- Microbianas: Bacterias, hongos y levaduras.

Las enzimas de origen microbiano, son las fuentes más utilizadas debido a su rapidez para obtenerlas, son genéticamente manipulables, tienen gran variedad de vías metabólicas, su producción es más económica, regular y de calidad uniforme (6).

Gran cantidad de las enzimas microbianas se producen a partir de aproximadamente 25 organismos, que incluyen una docena de

hongos; pero solo aproximadamente el 2% de microorganismos existentes han sido estudiados como fuentes de enzimas (6).

Lo que se busca en la producción de enzima es maximizar la velocidad de formación de enzima y la concentración de las mismas en los medios de fermentación para así minimizar los costos en la producción. El rendimiento del proceso es igual a la masa de célula obtenida multiplicada por su actividad enzimática; para una enzima extracelular este es igual a la concentración de enzima obtenida multiplicada por el volumen (6).

Por lo general las células crecen sumergidas en fermentadores con agitación y bien aireados; aunque un número significativo de enzimas de uso industrial se obtienen en fermentadores sólidos o semisólidos, como el caso de la lactasa, la α -amilasa y una proteasa de *A. oryzae*, la pectinasa, la proteasa de un *A. niger*, la α -amilasa del *Rhizopus* y el cuajo del *Mucor pusillus*. Se recomienda usar microorganismos no esporulante y que no formen toxinas (6).

Las enzimas extracelulares son las más utilizadas, ya que no se necesita romper la célula o la separación de los restos para obtenerlos, los rendimientos son aproximadamente del 1% (volumen/volumen) a partir de fermentadores con gran volumen, son más puras y más estables que las intracelulares (puentes disulfuro) (6).

Este rendimiento en la producción pueden incrementarse si se añade al medio de cultivo surfactantes que producen una liberación más rápida de las enzimas (6). Entonces, si se quiere explotar el potencial de una enzima, se deben diseñar métodos para su extracción y purificación que sean económicos y eficaces. Estos deben tener en cuenta que las células contienen bajas concentraciones de enzimas (menos del 1% en peso (6)).

Las enzimas intracelulares se liberan del interior de la célula mediante una disrupción mecánica o química (homogenizadores de alta presión, los molinos de bolas, la congelación – descongelación, choque osmótico de pH o de temperatura, digestión enzimática con lisozima) o permeabilización de la membrana celular (6), luego se

separan los desechos celulares por filtración o centrifugación. Este extracto se purifica mediante una serie de etapas consecutivas de fraccionamiento y concentración, entre las que están las cromatografías de intercambio iónico (6).

1.1.4. Enzimas extremófilas

Las enzimas extremófilas son catalizadores capaces de funcionar en presencia de una o varias condiciones físicas o químicas extremas, muy diferente a la que nosotros vivimos, como ejemplo altas temperaturas o bajo pH (7).

Estas enzimas tienen actividad a estas condiciones mientras otras fallan, minimizando los cuidados y elevando de esta manera su eficacia. Tienen infinidad de uso industrial debido a su gran versatilidad.

1.1.5. Enzimas en los alimentos

El uso de enzimas en los alimentos y en sus procesamientos está legislado en la mayoría de los países. Normalmente el uso de estas es seguro ya que son de origen natural; aunque existen unas pocas enzimas tóxicas (6). Industrialmente se producen muy pocas de las miles de enzimas que se conocen y que son utilizadas en el procesamiento de alimentos o en la elaboración de las materias primas para estos, debido a los altos costos en sus procesos de obtención (6).

Dentro de las ventajas de su uso en la industria de alimentos están:

- Son de origen natural y la mayoría no son tóxicas.
- Actúan específicamente y no producen reacciones secundarias.
- Funcionan en condiciones moderadas, ahorrando costos y tiempos en las industrias.
- Actúan en bajas concentraciones.
- Su velocidad de reacción se puede controlar modificando factores como pH, temperatura y concentración de la enzima.

- Son inactivadas fácilmente.

Pero también tiene sus desventajas como son:

- Son caras.
- Dificiles de conseguir.
- No son puras, sino que son una mezcla de enzimas donde solo una de ellas tiene mayor actividad.

Según la IUPAC las enzimas se han clasificado de acuerdo a su función catalítica específica (8). La clasificación se detalla en la Tabla 1.

TABLA 1

CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS DE ACUERDO A IUPAC

N° de Clasificación	Clase	Tipo de reacción
1	Oxido reductasas	Catalizan reacciones de óxido reducción, según la reacción. (Deshidrogenasa, oxidasas, peroxidasas)
2	Transferasas	Catalizan reacciones de transferencias de átomos o grupos de átomos entre moléculas. Se las nombra de acuerdo al sustrato que emplean y en el aceptor final. (Transaminasa, quinasa)
3	Hidrolasas	Catalizan reacciones de hidrolisis. Rompen moléculas de alto peso molecular y las hace reaccionar con agua. (proteasas, esterasas, lipasas, carbohidrasas, lactasas, enzimas pécticas, celulasas)
4	Liasas	Catalizan reacciones reversibles de remoción de grupos de átomos al sustrato. Los enlaces que rompen son C-C, C-O-C-N, C-S. (aldolasas descarboxilasas)
5	Isomerasas	Catalizan reacciones de isomerización moleculares. (Racemasas, mutasas, epimerasas)
6	Ligasas	Catalizan la unión de 2 grupos químicos a partir de la energía que se libera en la degradación del ATP. (carboxilasas, peptosintetasas)

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafía, 2014

Fuente: (8)

1.1.5.1. Pectinasas

En el procesamiento de jugos de frutas el uso de enzimas comerciales ayuda a tener mayores rendimientos y mejor calidad del producto final, estas trabajan destruyendo las estructuras de los componentes de la fruta y disminuyendo su capacidad de retención de agua.

Las pectinasas son un complejo sistema de enzimas que incluyen hidrolasas, liasas y oxidasas que degradan o modifican la pectina.

La pectina es un grupo de heteropolisacáridos con diferentes pesos moleculares y grados de esterificación; componente estructural que se encuentra en la lámina media de las células primarias de diversas frutas y verduras (9), que puede solubilizarse parcialmente durante el proceso de elaboración de jugos, lo cual da una mala apariencia y no permite la floculación y filtración de los jugos, perjudicando el rendimiento y la calidad organoléptica del mismo.

Está conformada por cadenas de unidades de ácido galacturónico, parcialmente esterificada como ésteres metílicos unidos por enlaces α 1,4 glucosídicos (10).

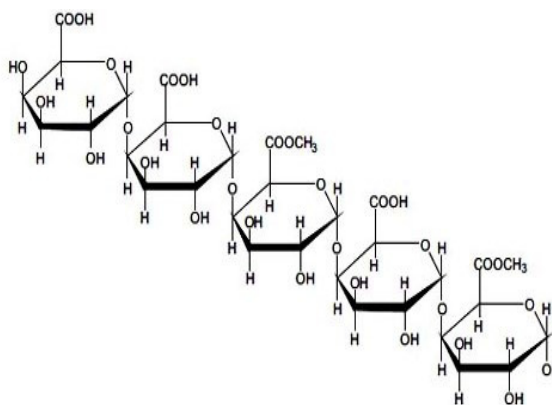


FIGURA 1.2 Estructura polimérica de la pectina conformada por unidades de ácido D-galacturónico y unidas entre sí por enlaces α 1-4

Fuente: (11)

Aproximadamente entre el 60-90% de la cadena es llamada región suave de la pectina por estos enlaces glucosídicos. El 10-40% de la cadena es conocida como la región fuerte por estar constituida por una combinación entre arabanos, ramnogalacturano, arabigalacturano y proteínas (9).

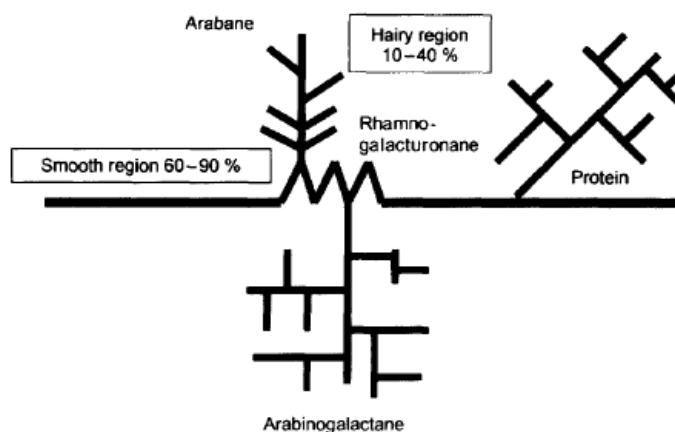


FIGURA 1.3 Estructura de pectina

Fuente: (9)

En las frutas inmaduras la pectina que se encuentra de forma insoluble (protopectinas) ayuda a mantener la dureza de las mismas; pero cuando estas maduran, la pectina es degradada por las enzimas endógenas propias de la fruta y se vuelven blandas.

El uso de pectinasas en la elaboración de jugos ayuda a reducir la viscosidad de los mismos y a obtener un producto más estable y agradable al consumidor.

Estas enzimas están presentes en la mayoría de plantas superiores, hongos filamentosos y bacteria; las producidas a partir de hongos, son las más utilizadas en el proceso de extracción y clarificación de jugos (6).

Dentro de la clasificación de las pectinasas tenemos (13):

- i. Enzimas despolimerizantes, actúan sobre la pectina , ácido pécticos y la protopectinas (Hidrolasas y liasas): Que se clasifican de acuerdo a:

❖ *Tipo de ruptura de los enlaces glucosídicos (hidrófilo o trans eliminativa)*

Las pectin liasas o pectin transelimininasas que son las liasas de mayor importancia, su acción rompen doble ligaduras entre los carbonos 4 y 5 de la molécula de ácido galacturónico, rompiendo el enlace glucosídico en las pectinas de alto metoxilo, Solo la producen los hongos (1).

Pectato liasas, actúan sobre las pectinas de bajo metoxilo; solo la producen las bacterias (1).

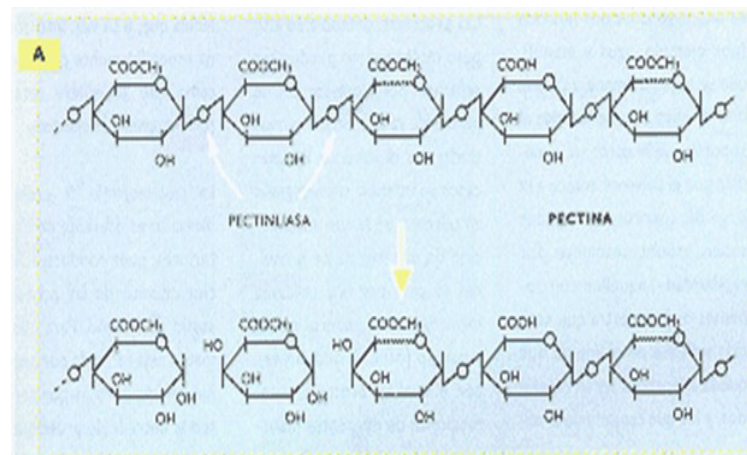


FIGURA 1.4 Acción de la pectin liasa sobre la cadena de pectina

Fuente: (12)

❖ *Mecanismo de reacción (endo o exo)*

Las poligalacturonasas rompen el enlace glucosídico α (1,4) de las pectinas por una reacción que se puede llevar a cabo tanto en el interior del polímero (endo), reduciendo la viscosidad rápidamente; así como a partir de los extremos

(exo), produciendo moléculas de ácido galacturónico y la viscosidad no se afecta tanto.

❖ *Preferencia de actividad respecto al grado de esterificación metílica del sustrato (alto o bajo)*

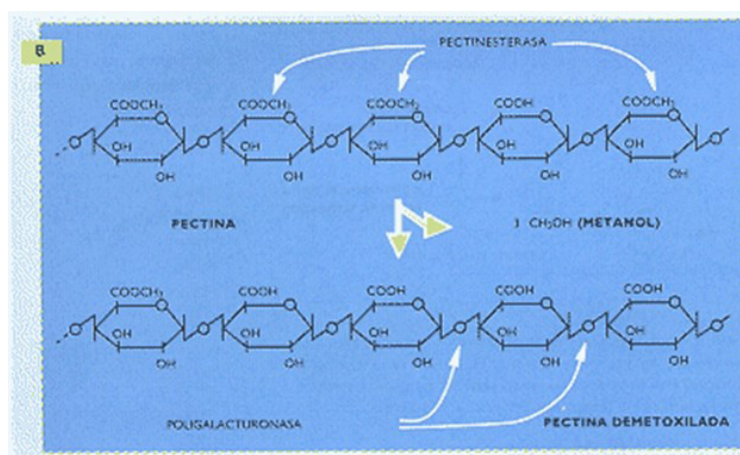


FIGURA 1.5 Acción de la poligalacturonasa sobre la cadena de pectina.

Fuente: (12)

- ii. ENZIMAS DESTERIFICANTE (Pectin esterasas): Se clasifican de acuerdo al grupo ester que hidrolizan, ya sea metil – acetil –

fenil ester. Al hidrolizar los enlaces ester metílico, liberan metanol y producen pectinas de bajo metoxilo e incluso ácido poligalacturónico. Son las más abundantes e importantes en las frutas (1).

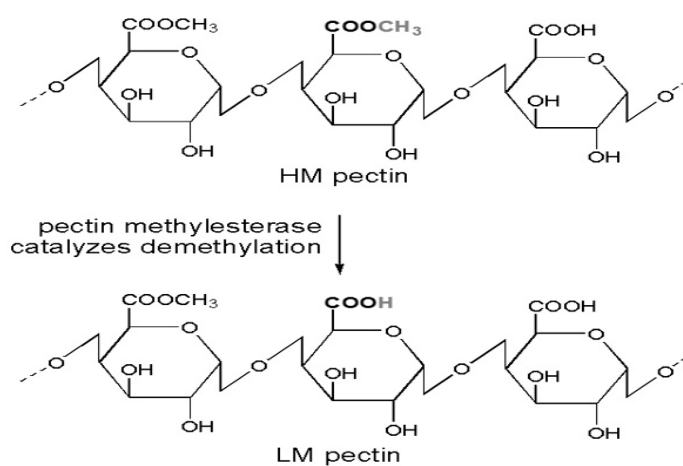


FIGURA 1.6 Acción de la pectin esterasa sobre la cadena de pectina

Fuente: (2)

- iii. PROTOPECTINASAS: Enzimas que actúan sobre sustratos insolubles (protopectina, una pectina insoluble del tejido vegetal que se encuentra en las frutas inmaduras) y las transforma en pectinas de bajo metoxilo; su resistencia térmica es mayor que

de las otras. Tienen una actividad muy parecida a la poligalacturonasa (1).

1.2. Elaboración de jugos

En la actualidad el consumo de jugos de frutas naturales se ha ido incrementando debido a una mayor conciencia sobre el cuidado de la salud, pasando a ser bebidas que se toman durante todo el día. Este aumento en el consumo de jugos, obliga a mejorar la calidad de los mismos desde el punto de vista organoléptico hasta nutricional.

El jugo de manzana es uno de los jugos que más se consumen en la actualidad.

1.2.1. Proceso de elaboración

Industrialmente el proceso lo puede ser dividido en 3 etapas (14):

i. Preparación para la extracción

Incluye las etapas preliminares como son las de lavado, selección y su posterior molienda. El tipo de equipos utilizados dependerá de la calidad del jugo que se quiere obtener.

ii. Extracción del jugo

Este proceso de extracción depende la capacidad de la planta, calidad y clase de jugo. El más utilizado es el proceso de prensado (prensas hidráulicas, neumáticas, a tornillo, etc.).

iii. Operaciones post extracción

Se incluyen operaciones como la clarificación, centrifugación, filtración, homogenización, almacenamiento y envasado.

1.2.1.1. Jugo de Manzana. Características

El jugo de manzana lo definen como un líquido sin fermentar preparado con el primer prensado del jugo de manzanas frescas (15). Se elabora sin dilución o adición de agentes edulcorantes, y puede o no añadirse antioxidantes, y queda conservado por pasteurización para garantizar su uso en recipientes de plástico, vidrio o metal.

La calidad de un jugo depende de la calidad de la fruta, y esta a su vez depende de factores como la variedad, el grado de maduración, de los métodos de recolección.

El proceso de elaboración del jugo de manzana clarificado se realizó como se indica en el diagrama de flujo de la Figura 1.7.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

- a) Selección: Se separaron las manzanas que presentaron magulladuras o daños visibles.
- b) Lavado y desinfección: Se lavaron y se sumergieron las manzanas en solución de hipoclorito de sodio a 5 ppm.
- c) Descorazonado: Se retiró manualmente el corazón de las manzanas con un cuchillo, así no se van las pepas que le dan un sabor amargo al jugo.
- d) Escaldado: Se sumergió los pedazos de manzana en agua a 70°C x 3 minutos, de esta manera se inactivaron las enzimas responsables de la oxidación.

- e) Molienda: Se realizó en licuadora casera para poder desintegrar la estructura de la manzana y facilitar la extracción del jugo.
- f) Maceración: A la pulpa del jugo obtenida, se le colocó la enzima patrón (EC), y la enzima en investigación CIBE-223, y se dejó incubar a 45° y 7°C por 24 horas, con una concentración de 40 ml/hl.
- g) Filtración- prensado: El jugo ya macerado se pasó por filtro de tela y se prensó para obtener la mayor cantidad de jugo.
- h) Clarificación: Se colocaron las enzimas EC y CIBE-223 al jugo de manzana ya filtrado, y se incubó a 45 °C ya 7°C durante 72 horas, con una concentración de 0.5 ml/500 ml de jugo.
- i) Centrifugación: Pasada el tiempo de incubación se procedió a centrifugar el jugo a 5000 rpm por 15 minutos, para así retirar todos los restos de tejido que se encuentren suspendidos.
- j) Filtración: El jugo ya centrifugado se pasó por papel filtro de 0.22 μ de grosor y se colocó en un vaso de precipitación.
- k) Almacenaje: El jugo clarificado se almacenó bajo refrigeración para proceder a realizar las mediciones.

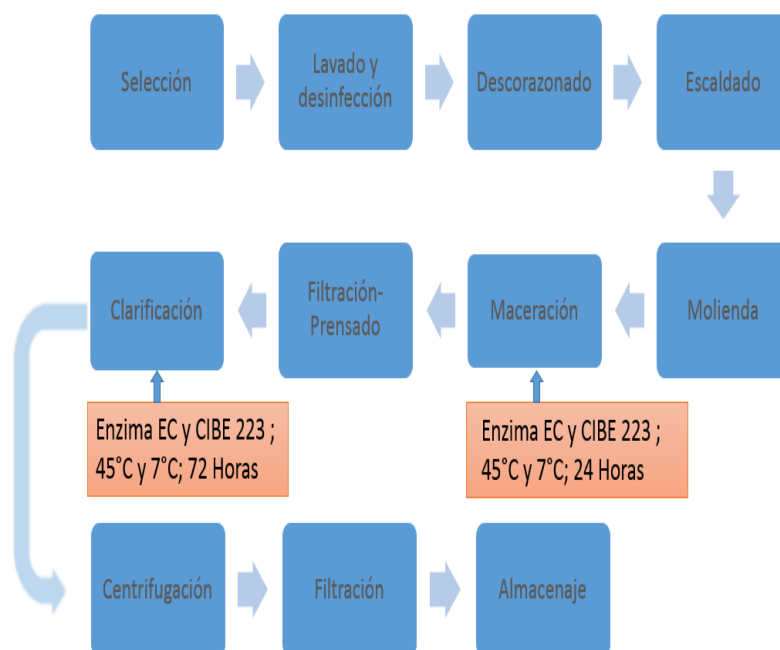


FIGURA 1.7 Diagrama de flujo de proceso para el jugo de manzana clarificado.

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

1.2.1.2. Clarificación del jugo de manzana

La clarificación es una etapa importante en la elaboración de jugos, ya que está relacionada con la calidad y la comercialización del producto final.

En la industria del jugo se utiliza gelatina, carbón activado para el proceso, y en industrias más modernas se utilizan membranas y micro filtración (15).

El jugo clarificado de manzana tiene las siguientes características (15):

- pH: 3.5 – 4.2
- Azúcares reductores (glucosa, fructosa, sorbitol) 90 mg/kg
- Azúcares totales (reductores + sacarosa): 110 mg/Kg
- Aminoácidos: 6 meq/l
- Acidez (expresada como ácido málico): 4 g/Kg

1.3. Objetivos

Este trabajo pretende lograr los siguientes objetivos:

1. Encontrar al menos una cepa de hongo extremófilo con capacidad de producir enzimas pectinolíticas que trabajen a temperaturas de

congelación y obtener la enzima a través del crecimiento del hongo en medios minerales con sustratos específicos.

2. Identificar los tipos de enzimas pectinolíticas producidas por los aislados seleccionados.
3. Determinar la Temperatura y pH óptimos.
4. Determinar la aplicabilidad en la clarificación de un jugo de manzana.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen los materiales y métodos utilizados para la realización de este trabajo, que consiste en la búsqueda de cepas de hongos con actividad pectinolítica, para poder extraer enzimas y su posterior utilización en el proceso de clarificación de jugos. Las pruebas se basan en determinar qué tipo de enzima está presente en los hongos aislados y sus condiciones óptimas.

2.1. Obtención y caracterización de pectinasas extremófilas

Para esta prueba se utilizaron cepas de hongos preservados en el Laboratorio de Fitopatología del CIBE, que fueron aislados de las muestras recogidas en la expedición a la Estación Antártica Ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado.

2.1.1. Aislamiento y selección de microorganismos productores de pectinasas

Se colocó 1 gramo de la muestra del suelo en tubo con 10 ml de agua estéril e incubada durante 2 horas a 4°C. En la siembra de las muestras del suelo se utilizaron diferentes diluciones de hasta 10⁻³. Se colocaron 30 µl de cada dilución de la muestra en cajas petri con agar y se sembraron por el método superficial con la ayuda de una Asa de Digralski para extender en la superficie. Los medios de cultivos utilizados para el crecimiento de los hongos fueron YEC (Yeast Extrac Cloramphenicol), SAB (Sabouraud Dextrose Agar) y PDA (Potato Dextrose Agar). Las muestras sembradas en los diferentes medios fueron incubadas a 10°C entre 15 a 28 días de acuerdo a la observación de crecimiento del hongo.

Para el aislamiento de hongos con mayor actividad pectinolítica, se sembraron 15 muestras en placas con agar nutritivo más pectina, que se incubaron a 16°C por 8 días. La selección se realizó visualizando el halo transparente que presentaron las colonias en presencia de un revelador, en este caso la solución de bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB) al 10%, que produce una lisis celular y precipita los polisacáridos durante la reacción enzimática con la

pectina (16). Las cepas que presentaron halo se sembraron en un medio de extracto de levadura más pectina seguido de incubación a 16°C por 15 días. Se escogieron las cepas que presentaron mayor relación entre el diámetro halo / diámetro colonia (Figura 2.1).

Las cepas de hongos utilizados se codificaron como: CIBE-201, CIBE-202, CIBE-203, CIBE-213, CIBE-214, CIBE-222, CIBE-223, CIBE-224, CIBE-225, CIBE-233, CIBE-235, CIBE-252, CIBE-253, CIBE-254 y CIBE-255.

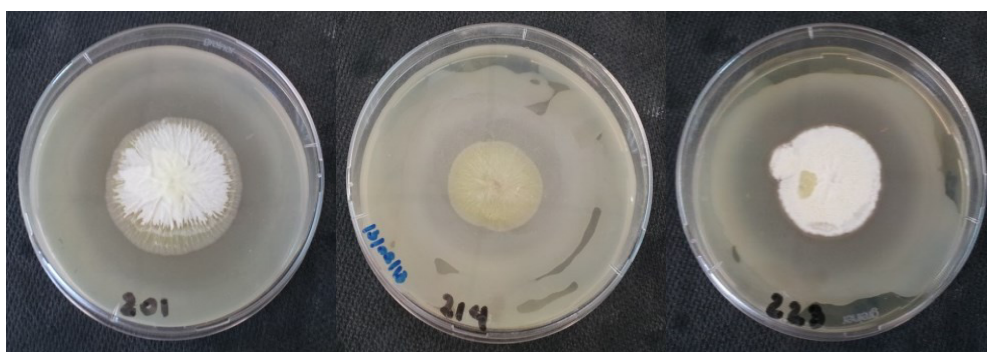


FIGURA 2.1 Hongos CIBE-201, CIBE-214 y CIBE-223

2.1.2. Producción de pectinasas

De las cepas de hongos seleccionadas que presentaron la mayor actividad enzimática, se las sembraron en un medio mineral Czapec modificado, conteniendo 30 g/l de pectina, 3 g de NaNO_3 , 1 g de K_2HPO_4 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de KCl y 0.01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Ajustado pH a 7.3 ± 0.2 , autoclavado a 121°C y 15 psi por 15 min, donde se utilizó la pectina al 3% como fuente de carbono (17). Se inocularon las cepas de hongos seleccionadas en los frascos Erlenmeyer de 1000 ml conteniendo el medio mineral y se dejó en la incubadora rotatorio a 16°C y 119 rpm por 20 días.

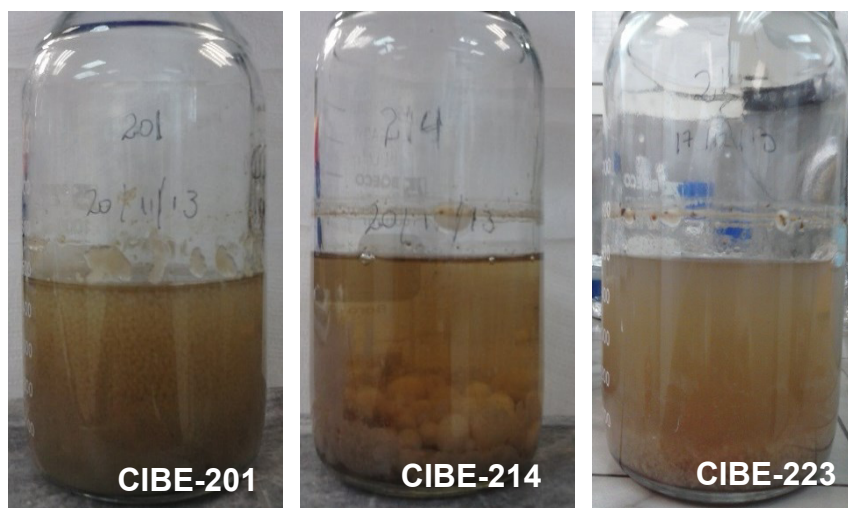


FIGURA 2.2 Hongos en medio mineral

Luego se procedió a la centrifugación a 5000 rpm por 15 min a 4°C, después el sobrenadante se filtró con papel filtro de 0.22 µm. Este sobrenadante filtrado se colocó en tubos de 45 ml, se congeló a -80°C y luego se liofilizó a -40°C y 133×10^{-3} bar por 4 días. El sobrenadante liofilizado se almacenó a -17°C para realizar las pruebas de caracterización, de actividad y su uso en el jugo.

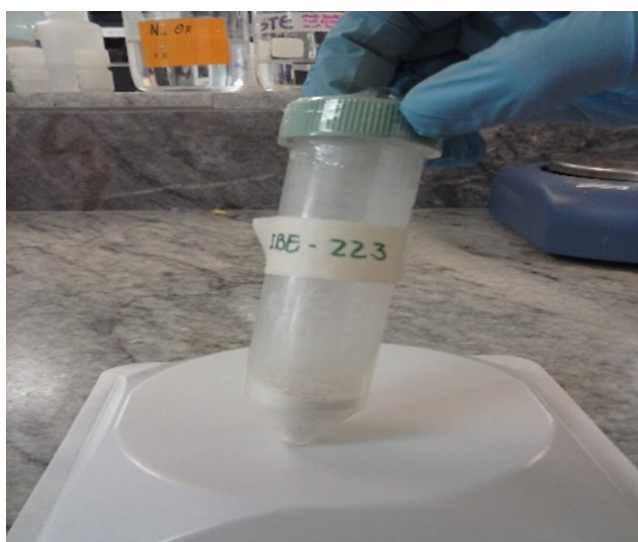


FIGURA 2.3 Sobrenadante liofilizado

2.1.3. Caracterización de la enzima

Para determinar la clase de enzima producida por las cepas hongos, se procedió a las siguientes pruebas.

2.1.3.1. Determinación de actividad de pectin esterasa

La actividad de pectin esterasa se evalúa mediante la medición del metanol liberado o por el aumento en grupo carboxilo libre por valoración con medidor de pH (18). En este estudio se siguió el método de valoración con NaOH. Se colocó 4 ml solución del sobrenadante liofilizado al 10 % en 20 ml de una solución de pectina al 1% disuelta en NaCl 0.15 M con pH 7, luego se incubó a 25°C por 72 horas.

Después de la incubación se titularon las muestras con NaOH 0.02N usando la fenolftaleína como indicador (19,20). Todas las pruebas se realizaron por triplicado y se reportó el promedio. En cada prueba se tituló tanto para el tiempo de inicio (t_0) así como para el tiempo de incubación (t_f).

La actividad de pectin esterasa se determinó utilizando la siguiente fórmula (18):

$$APE = \frac{(V_s - V_b)(Normalidad\ de\ NaOH)}{V_t} \times 100$$

Dónde:

V_s = Volumen (ml) consumido de NaOH por titular la muestra

V_b = Volumen (ml) consumido de NaOH por titular el blanco

V_t = Volumen (ml) de la muestra utilizada

La actividad de pectin esterasa se reportó como el consumo de NaOH en mili equivalente ($\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) de extracto de enzima.



FIGURA 2.4 Determinación de la actividad pectin esterasa

2.1.3.2. Determinación de actividad de pectato liasa

La actividad de pectato liasa se ensayó midiendo el aumento en la absorbancia a 232 nm debido a la producción de enlaces insaturados durante la despolimerización del ácido galacturónico (20). La muestra se disolvió en 2.5 ml de pectato de sodio al 0.5%, Buffer Tris HCl 50 mM y Cloruro de Calcio 1 mM. La solución se incubó a 25°C durante 72 horas. La solución del sobrenadante liofilizado sin incubar se mantuvo como control. Una unidad de la actividad de pectato liasa se define como la cantidad de enzima causado por la absorbancia a 232 nm en aumentar a un ritmo de $0.1 \text{ OD min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ de la enzima (19).

Se determinó los valores de la actividad con la siguiente fórmula:

$$APL = M_1 - M_0$$

Dónde:

M_1 = Absorbancia de la muestra incubada

M_0 = Absorbancia de la muestra de control

2.1.3.3. Determinación de actividad de endo polimetil galacturonasa

La actividad de endo polimetil galacturonasa se midió por la reducción de la viscosidad de una solución de pectina en un viscosímetro rotacional (21).

La muestra de la reacción contenía 10 ml de la solución de pectina al 2%, 2 ml de Buffer Acetato pH 4.5 y 5 ml de solución del sobrenadante liofilizado al 10%. Se incubó a 25°C por 72 horas. Se procedió a leer la viscosidad de las muestras: el blanco; solución de pectina sin el sobrenadante liofilizado, el control; solución de pectina con el sobrenadante liofilizado sin incubar y la muestra incubada. La medición se realizó a 200 rpm y con el rotor # 61.

Para determinar los valores de la actividad utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Reducción de la viscosidad (\%)} = \frac{Vb - Vm}{Vb} \times 100$$

Dónde:

V_b = Viscosidad del blanco

V_m = Viscosidad de la muestra incubada



FIGURA 2.5 Viscosímetro rotacional BROOKFIELD

2.2. Determinación de condiciones óptimas de actividad enzimática

Para ver las condiciones óptimas de la actividad enzimática, primeramente se determinó la temperatura óptima de cada una de las enzimas, y luego se determinó el pH óptimo a la temperatura óptima ya determinada.

2.2.1. Ensayos de temperatura

En la determinación de la temperatura óptima a la que actúa la enzima, se procedió a medir la actividad enzimática mediante el método colorimétrico de DNS modificado que contiene 1% de Ácido 3,5-Dinitrosalicílico, 0.2% de Fenol, 0.05% de Na_2SO_3 y 1% de NaOH. DNS reacciona sólo con los azúcares reductores, en este caso la sacarosa que es un azúcar no reductor después de actuar en el medio ácido, libera la glucosa, que es un azúcar reductor y se observa un producto final de color café oscuro (22).

Se colocó 0.5 ml de solución del sobrenadante liofilizado al 1%, 2 ml de solución de pectina al 1% en Buffer Acetato pH 4.6 en tubos. Se incubaron a temperaturas de 3°C, 7°C, 12°C, 16°C, 20°C, 27°C, 34°C, 45°C y 55°C por 5 días. Se midió al tiempo 0 y cada 12 horas. En el caso de las pruebas en la enzima comercial se incubó por 8 horas para las temperaturas de 27°C, 34°C, 45°C y 55°C, midiendo al tiempo 0 y a cada hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 2.5 ml de DNS en la muestra y se colocó en baño maría a 90°C por 15 min e inmediatamente se añadió 1 ml de solución de Tartrato de Na y K al 20% para detener la reacción (23). Posteriormente se dejó enfriar la muestra en un recipiente con agua

a temperatura ambiente y luego se añadió 9 ml de agua destilada. Se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm.

2.2.2. Ensayos de pH

Para determinar el pH óptimo de la actividad de las enzimas se realizaron ensayos a temperatura óptima determinada previamente.

Se midió mediante el método colorimétrico de DNS modificado descrito anteriormente, utilizando Buffer Acetato 0.1 M (pH 3-5), Buffer Fosfato 0.1 M (pH 6-8) y Buffer Tris Cl 0.1 M (pH 9) para la preparación de la solución de pectina al 1% (23).

Se colocó 0.5 ml de solución del sobrenadante liofilizado al 1%, 2 ml de solución de pectina al 1% en Buffer Acetato pH 4.6 en tubos. Se incubaron a pH de 3, 3.5, 4.5, 6, 7, 8 y 9 a temperatura de 34°C. Para las enzimas antárticas, se incubó por 5 días y se midió al tiempo 0 y cada 12 horas. En caso de la enzima comercial se incubó por 8 horas; midiendo al tiempo 0 y después cada hora. Terminado el tiempo de incubación se añadió 2.5 ml de DNS en la

muestra y se colocó en baño maría a 90°C por 15 min e inmediatamente se añadió 1 ml de solución de Tartrato de Na y K al 20% para detener la reacción (23). Posteriormente se dejó enfriar la muestra en un recipiente con agua a temperatura ambiente y luego se añadió 9 ml de agua destilada. Se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm.

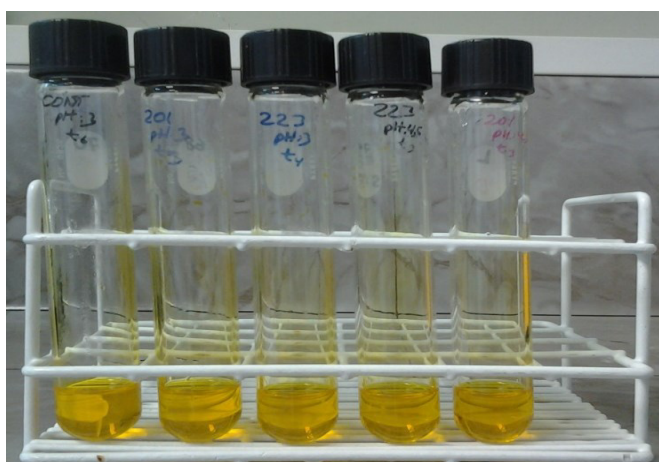


FIGURA 2.6 Muestras antes de la reacción enzimática con DNS



FIGURA 2.7 Muestras después de la reacción enzimática con DNS



FIGURA 2.8 Espectrofotómetro para medir la absorbancia

2.2.3. Análisis estadísticos y determinación de condiciones óptimas

Todos los datos de absorbancias obtenidos en los ensayos de temperatura y de pH fueron sometidos a análisis estadísticos para determinar las condiciones óptimas de las enzimas.

Con la curva de calibración de la glucosa (APÉNDICE A), se graficaron los valores de absorbancia. Luego se obtuvieron los valores de las pendientes de cada curva a las diferentes temperaturas de ensayo para obtener la curva de la actividad de cada enzima.

Finalmente se utilizó XLSTAT 2014, que es una herramienta estadística para Microsoft Excel, de donde se obtienen la temperatura óptima y el pH óptimo usando la ecuación de Rosso (24,25).

Para determinar los valores de temperatura, se utilizó la siguiente ecuación (24):

$$\mu T = \frac{\mu_{opt}(T - T_{min})^2(T - T_{max})}{(T_{opt} - T_{min})[(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)]}$$

Dónde:

μT = Es la actividad enzimática a la temperatura específica

T_{min} = Es la temperatura mínima

T_{max} = Es la temperatura máxima

μ_{opt} = Es la actividad enzimática óptima

T_{opt} = Es la temperatura óptima

Para determinar los valores de pH, se utilizó la siguiente ecuación

(24):

$$\mu pH =$$

$$\frac{\mu_{opt}(pH - pH_{min})^2(pH - pH_{max})}{(pH_{opt} - pH_{min})[(pH_{opt} - pH_{min})(pH - pH_{opt}) - (pH_{opt} - pH_{max})(pH_{opt} + pH_{min} - 2pH)]}$$

Dónde:

μpH = Es la actividad enzimática a pH específico

pH_{min} = Es el pH mínimo

pH_{max} = Es el pH máximo

pH_{opt} = Es la actividad enzimática óptima

pH_{opt} = Es el pH óptimo

2.3. Uso de pectinasa en el proceso de clarificación del jugo de manzana

Una vez determinado la temperatura óptima y el pH óptimo de las enzimas a través de análisis estadístico, se procedió a los ensayos de la clarificación del jugo de manzana utilizando el sobrenadante liofilizado y la enzima comercial.



FIGURA 2.9 Jugo sin clarificar

2.3.1. Clarificación por pectinasas antárticas

Se realizó en 2 etapas. La primera etapa fue la maceración añadiendo la solución del sobrenadante liofilizado CIBE-223 al 10% en una proporción de 40ml/hl a la pulpa de manzana que fue obtenido con una licuadora industrial. Se incubó la muestra por 24 horas para la maceración a las temperaturas de 7°C y 45°C. Luego se filtró con un lienzo para extraer el jugo. En la segunda etapa, al jugo obtenido se le añadió nuevamente la solución del sobrenadante liofilizado CIBE-223 al 10% en una proporción de 0.5 ml/500 ml de jugo para el proceso de clarificación y se incubó la muestra a 7°C y 45°C por 72 horas. Se centrifugó a 5000 rpm por 15 min y se filtró con papel filtro de 0.22 µm para obtener el jugo clarificado. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 630 nm para ver la turbiedad. Finalmente los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA).

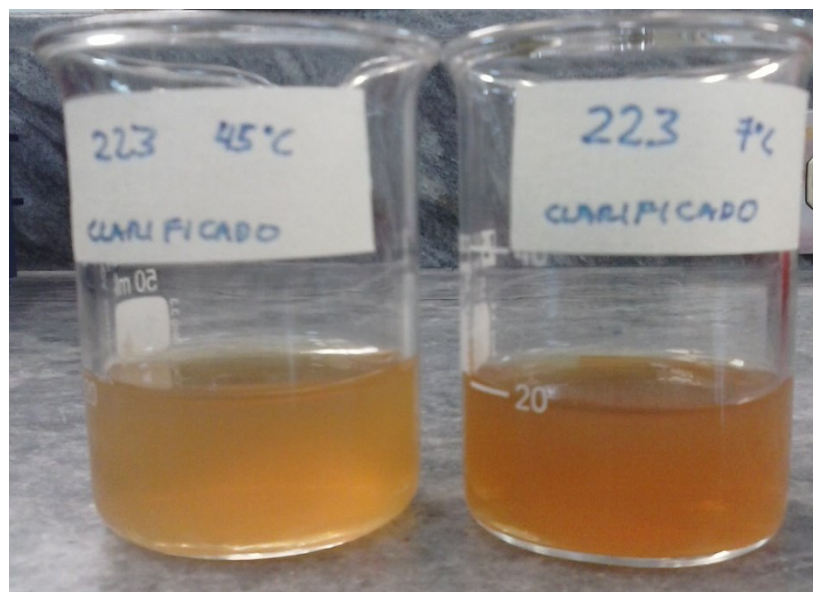


FIGURA 2.10 Jugo clarificado con el sobrenadante liofilizado

2.3.2. Clarificación usando enzimas comerciales

Se realizó en 2 etapas. La primera etapa es la maceración con la solución de enzima comercial al 1% a la pulpa de manzana que fue obtenido con una licuadora industrial. Se incubó la muestra por 24 horas para la maceración a las temperaturas de refrigeración 7°C y 45°C. Luego se filtró con un lienzo para extraer el jugo. En la segunda etapa se añadió la solución de enzima comercial al 1% al jugo de manzana para el proceso de clarificación y se incubó la muestra a 7°C y 45°C por 72 horas. Se centrifugó a 5000 rpm por 15 min y se lo paso por papel filtro de 0.22 μm para obtener el jugo

clarificado. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 630 nm para ver la turbiedad. Finalmente los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA).

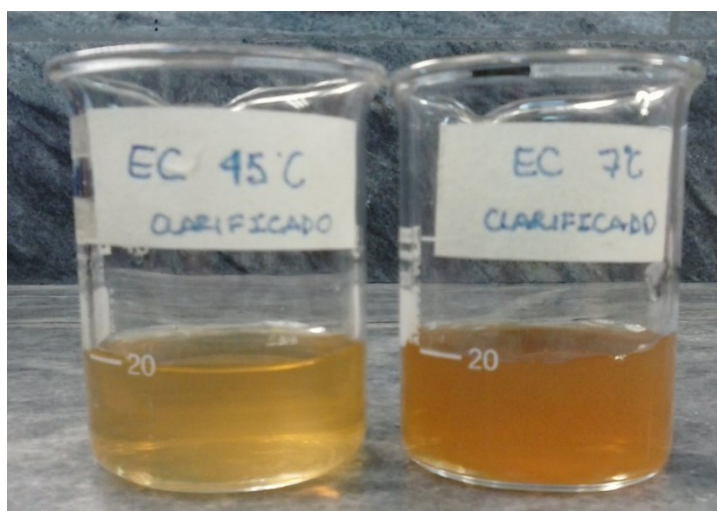


FIGURA 2.11 Jugo clarificado con enzima comercial

2.3.3. Evaluación turbidimétrica

Para determinar si fue clarificado el jugo, se midió la reducción de la absorbancia del jugo una vez clarificado a 630 nm y los resultados se evaluaron usando ANOVA con significancia reportada a $p < 0.05$.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

En este capítulo se describen todos los resultados de los ensayos realizados para la caracterización de los sobrenadantes liofilizados.

3.1. Microorganismos productores de pectinasas

De las 15 cepas de hongos sembradas en placas en medio con pectina, 6 mostraron degradación de la pectina por el microorganismo, denotado por un halo de 0.2 a 0.9 cm al revelarlas con el reactivo CTAB, demostrando que había actividad pectinolítica (Tabla 1).

Las 6 cepas de hongos seleccionadas se volvieron a sembrar en placas con medio Yeast Extract Agar y pectina como sustrato; se escogieron las 3 cepas de hongos descritas como CIBE-201, CIBE-

214 y CIBE-223 por presentar mayor diferencia entre el diámetro de la colonia y el diámetro del halo. La actividad para el hongo CIBE-201 fue de 0.7 cm, para el hongo CIBE-213 fue de 0.5 cm, para el hongo CIBE-214 fue de 0.7 cm, para el hongo CIBE-223 fue de 0.9 cm, para el hongo CIBE-235 fue de 0.5 cm y para el hongo CIBE-255 fue de 0.2 cm (Tabla 2).

TABLA 2

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA
EN HONGOS A LOS 15 DÍAS**

HONGO	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA				
	8 días	15 días	Ø Halo (cm)	Ø Colonia (cm)	Diferencia (cm)
CIBE-201	++	++	2.6	1.9	0.7
CIBE-202	+-	--	--	--	--
CIBE-203	+-	--	--	--	--
CIBE-213	++	++	1.5	1	0.5
CIBE-214	++	++	2.2	1.5	0.7
CIBE-222	+-	-	-	-	-
CIBE-223	++	++	2.2	1.4	0.9
CIBE-224	+-	--	--	--	--
CIBE-225	+-	--	--	--	--
CIBE-233	+-	--	--	--	--
CIBE-235	++	++	1.7	1.2	0.5
CIBE-252	+-	--	--	--	--
CIBE-253	+-	--	--	--	--
CIBE-254	+-	--	--	--	--
CIBE-255	++	++	1.6	1.4	0.2

ELABORADO POR: Gabriela García – Abel Chafía, 2014

3.2. Determinación de los tipos de pectinasa

Se determinó la presencia de 3 tipos específicos de actividad enzimática; pectin esterasa, pectato liasa y endopolimetil galacturonasa, las mismas que actúan en la degradación de la pectina durante el proceso de clarificación.

Determinación de pectin esterasa

La medición de la actividad de pectin esterasa está basado en el incremento de los grupos carboxilos que se da durante la reacción de degradación de la pectina a azúcares reductores. Esto se mide por titulación utilizando hidróxido de sodio al 0.1 N.

Los resultados mostraron un incremento significativo del consumo de la solución titulante en las muestras incubadas en comparación con la del consumo del blanco, indicando así la presencia de esta actividad enzimática en las 4 muestras que se utilizaron. En la Tabla 3 se muestran los resultados de la titulación, dados en mili-equivalentes por minuto, donde se evidencia que la enzima CIBE-223 es la que tiene mayor actividad ($p < 0.05$) (APÉNDICE I).

TABLA 3
ACTIVIDAD DE PECTIN ESTERASA¹

Enzima	Consumo NaOH inicial (ml)	Consumo NaOH final (ml)	Actividad a 72 H (meq/min) ²
EC	15.4 ± 0.09	16.8 ± 0.15	0.17
CIBE-201	19.6 ± 0.09	24 ± 0.03	0.89
CIBE-214	18.3 ± 0.15	22.4 ± 0.12	0.73
CIBE-223	20.3 ± 0.18	26.8 ± 0.23	1.17

Elaborado por: Gabriela García - Abel Chafra, 2014

Determinación de la pectato liasa

La actividad de la pectato liasa se midió por el incremento de la absorbancia a 232 nm. Los resultados obtenidos de las mediciones de la absorbancia para los medios incubados con los sobrenadantes liofilizados y la enzima comercial, demuestran que no hay incremento significativo de la absorbancia durante el tiempo de incubación (Tabla 4). El valor de significancia observado fue de $p > 0.05$, indicando así que no hay actividad significativa (APÉNDICE I).

¹ Valores representan el promedio ± del error estándar de 3 réplicas.

² Actividad significativa a un valor $p < 0.05$.

TABLA 4

ACTIVIDAD DE PECTATO LIASA³

Enzima	Absorbancia Control	Absorbancia a 72 horas
Blanco	2.64 ± 0.01	2.7 ± 0.01
EC	3.26 ± 0.01	3.24 ± 0.11
CIBE-201	3.84 ± 0.01	3.84 ± 0.01
CIBE-214	3.8 ± 0.01	3.96 ± 0.01
CIBE-223	3.86 ± 0.01	3.9 ± 0.01

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafía, 2014

Determinación de la endopolimetil galacturonasa

Se midió la reducción de la viscosidad de las muestras incubadas con las muestras de los sobrenadantes liofilizados y la enzima comercial.

Los resultados positivos, determinados como la medida de la reducción de la viscosidad, fueron para el sobrenadante liofilizado CIBE-223 y EC, ya que fueron las únicas muestras que demostraron

³ Valores representan el promedio ± del error estándar de 3 réplicas.

reducción significativa ($p < 0.05$) de la viscosidad a las condiciones establecidas para el ensayo (Tabla 5) (APÉNDICE I).

TABLA 5

ACTIVIDAD DE ENDOPOLIMETIL GALACTURONASA⁴

Enzima	Viscosidad inicial (Cp)	Viscosidad final (Cp)	% Reduccion
EC	86.3 ± 2.33	36 ± 1.73	58,4
CIBE-201	139.3 ± 1.33	88.7 ± 0.88	36,3
CIBE-214	135.7 ± 1.45	103.7 ± 3.28	23,6
CIBE-223	184.3 ± 3.48	90 ± 1.15	51,2

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

3.3. Determinación de las condiciones óptimas de operación

Las determinación de las condiciones óptimas de pH y temperaturas fueron obtenidas de las curvas de absorbancias a las diferentes temperaturas a las que se incubó las muestras y evaluadas matemáticamente por una regresión no lineal, usando el modelo paramétrico de Rosso (24).

⁴ Valores representan el promedio ± del error estándar de 3 réplicas.

3.3.1. Temperatura óptima

Los datos obtenidos demostraron que había mayor actividad en los sobrenadantes liofilizados en temperaturas mayores a 16 °C, aunque demuestran actividad en rangos muchos más amplios de temperaturas desde 2°C hasta 40°C.

A la temperatura de 3°C se trabajó con el sobrenadante liofilizado CIBE-223 y la EC (Figura 3.1) (APÉNDICES B, C, D y E).

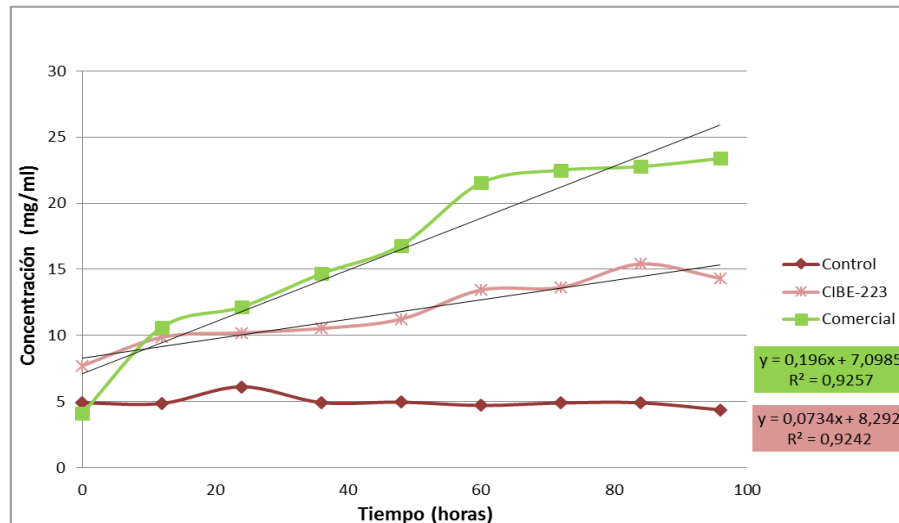


FIGURA 3.1 Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 3°C

Elaborado por: Gabriela García - Abel Chafla, 2014

Para las temperaturas de 7°C, 12°C, 16°C y 20°C se hicieron las pruebas a los mismos tiempos para todos los sobrenadantes liofilizados (Figuras 3.2, 3.3, 3.4, 3.5).

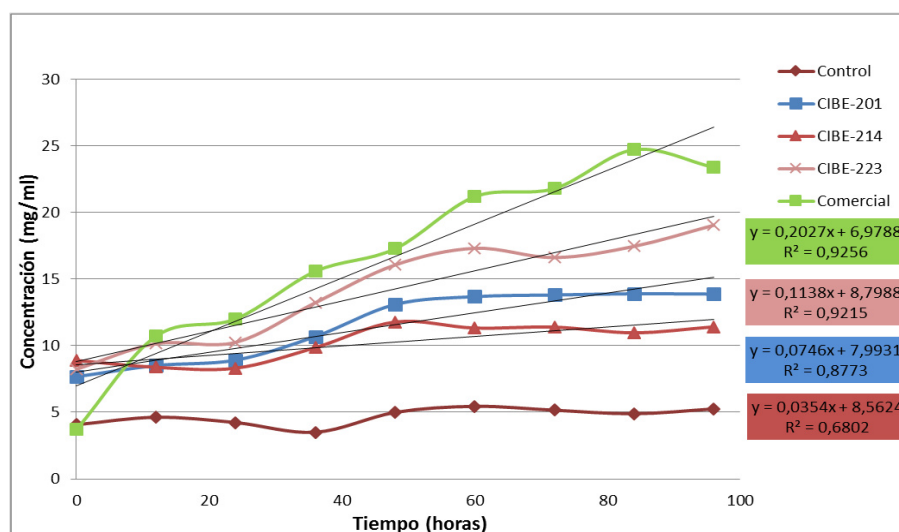


FIGURA 3.2 Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 7°C

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafía, 2014

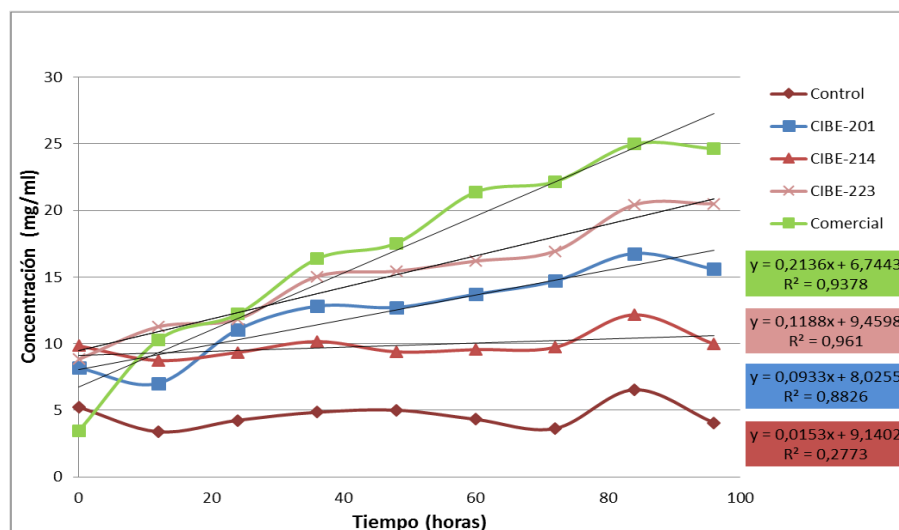


FIGURA 3.3 Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a
12°C

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

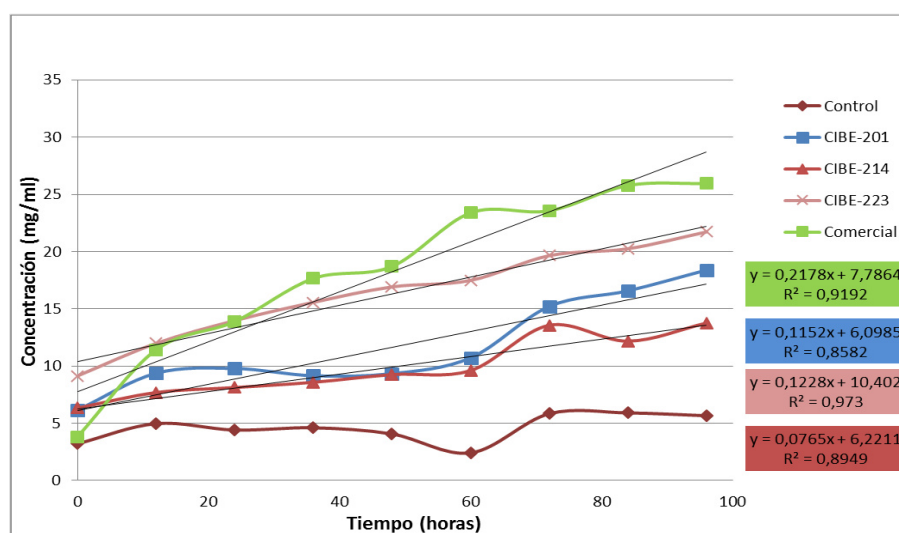


FIGURA 3.4 Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a
16°C

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

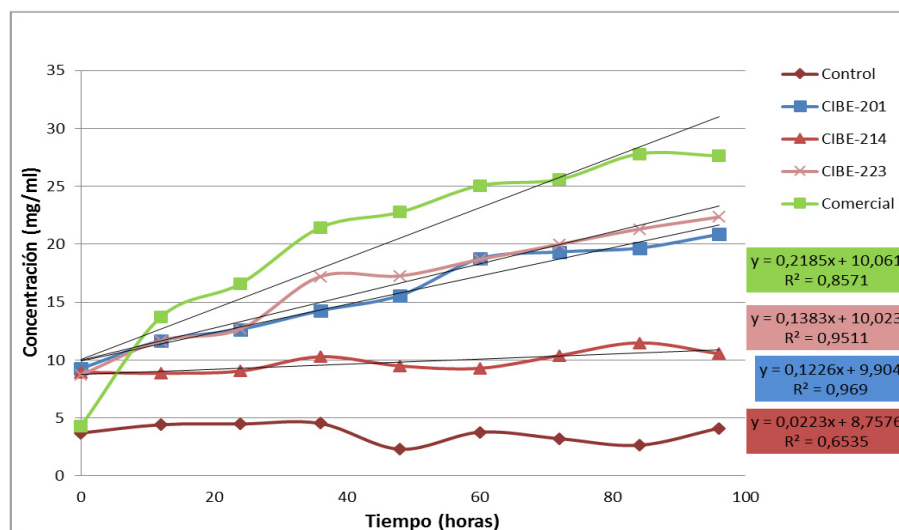


FIGURA 3.5 Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 20°C

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

A las temperaturas de 27°C, 34°C, 45°C y 50°C se evaluó la actividad de la EC cada hora durante un periodo de 8 horas, ya que esta enzima actúa rápidamente.

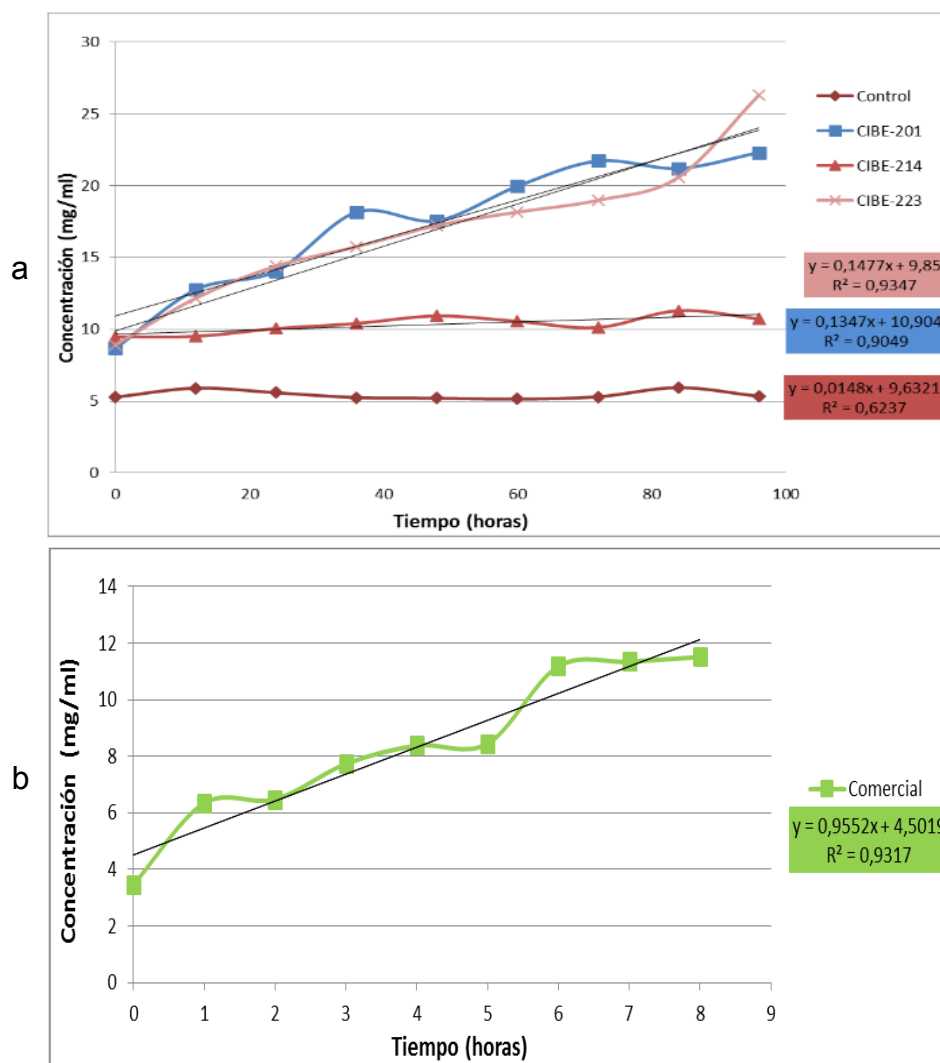


FIGURA 3.6 Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 27°C

Elaborado por: Gabriela García - Abel Chafra, 2014

A 34°C el sobrenadante liofilizado CIBE-214 no presenta actividad, por eso no se consideró para el estudio con las temperaturas

restantes, tomando en cuenta así solo los sobrenadantes liofilizados CIBE-201, CIBE-223 y la EC pero a diferentes tiempos (Figura 3.7).

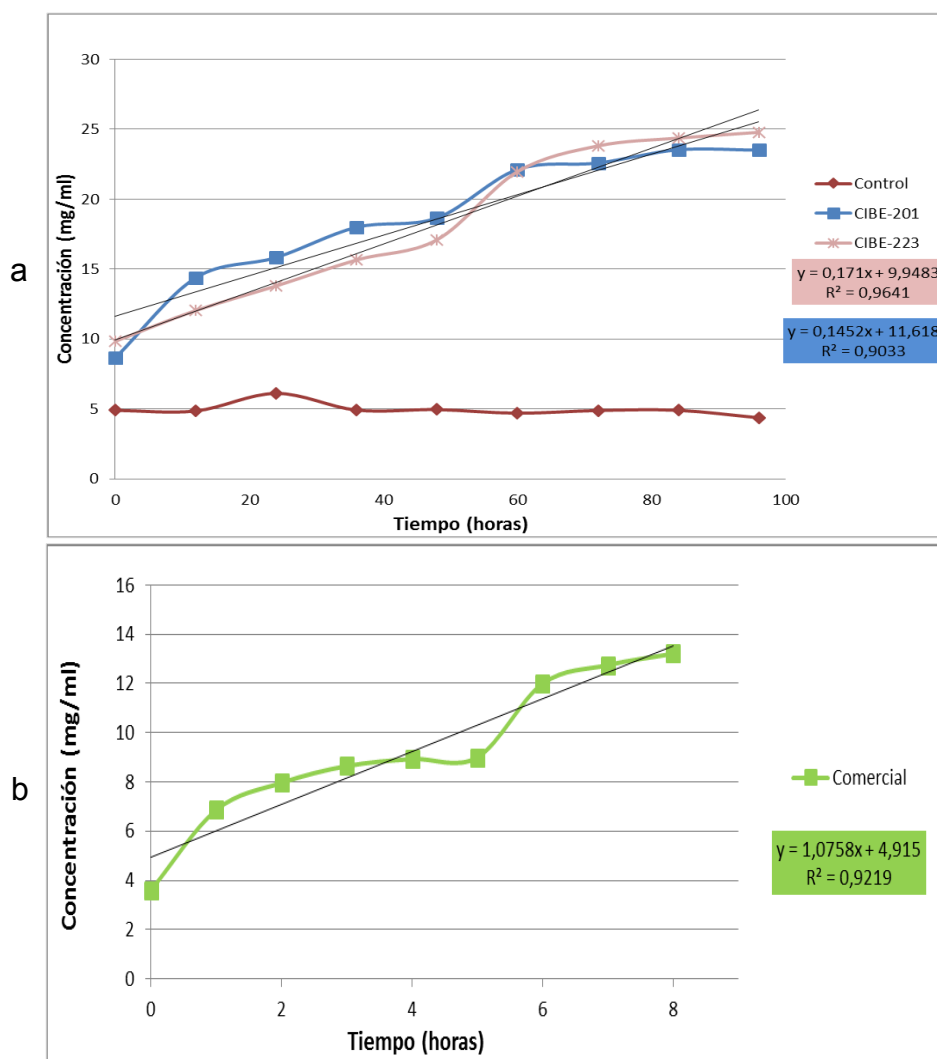


FIGURA 3.7 Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 34 °C

Elaborado por: Gabriela García- Abel Chafía, 2014

A 45°C y a 50°C los sobrenadantes liofilizados CIBE-201 y CIBE-223 empiezan a tener una pendiente más baja, indicando así que su actividad a estas temperaturas va decreciendo (Figuras 3.8, 3.9).

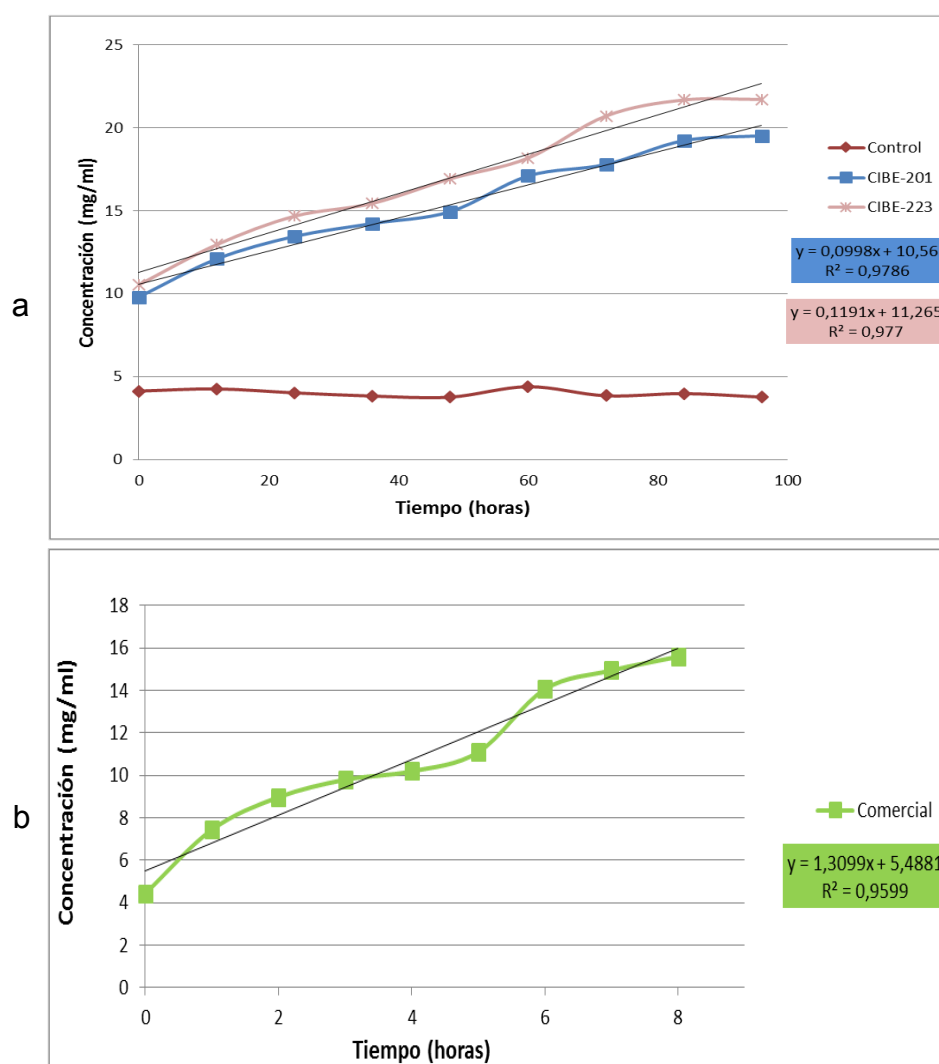


FIGURA 3.8 Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 45°C

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafía, 2014

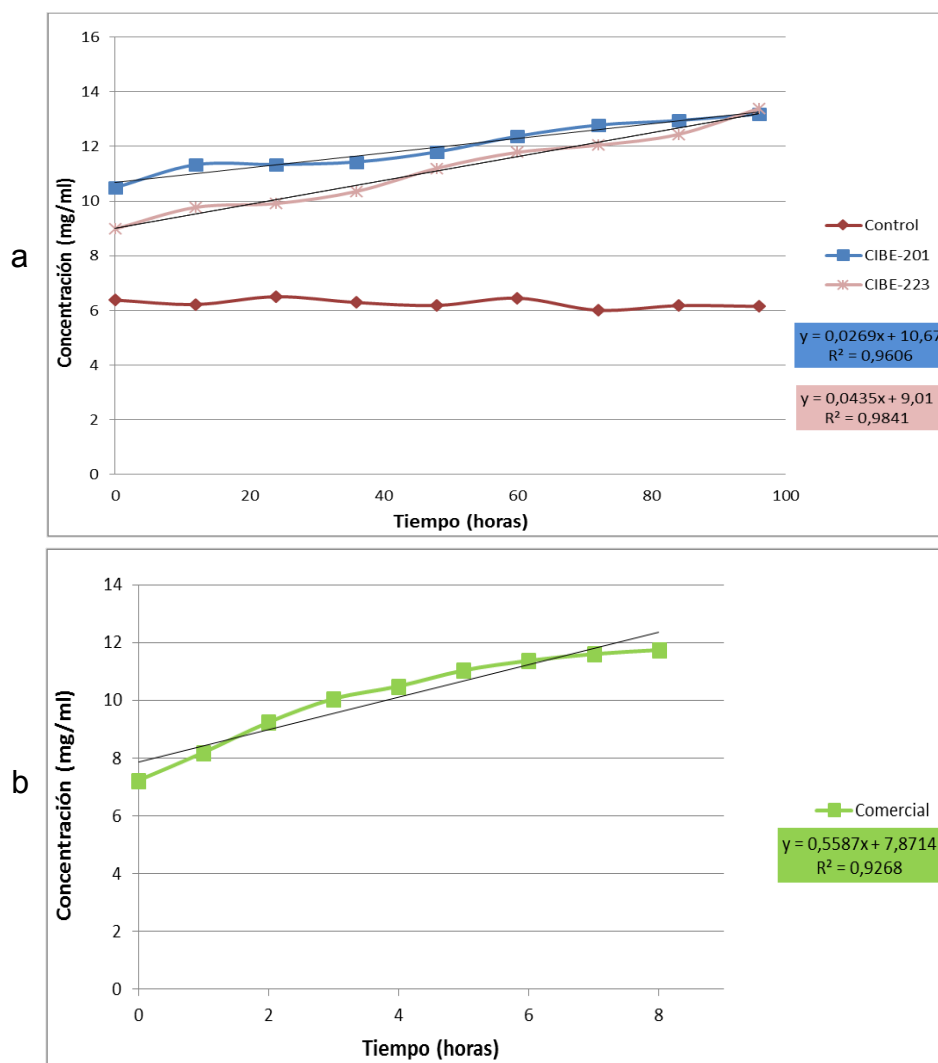


FIGURA 3.9 Efecto de la temperatura en la reacción enzimática a 50°C

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

Con las derivadas de las ecuaciones obtenidas de las curvas se obtienen las pendientes que en nuestro caso representan las

velocidades de reacción de cada enzima a las diferentes temperaturas (Tabla 6).

Estos valores son analizados mediante el modelo matemático de Rosso, el mismo que nos dará para cada enzima el valor de la temperatura óptima, los rangos de temperatura a los que tienen actividad y su actividad enzimática.

TABLA 6

EFFECTO DE LA TEMPERATURA (°C) EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml)

ENZIMA	3	7	12	16	20	27	34	45	50
CIBE-201	-	0,074	0,093	0,115	0,123	0,134	0,145	0,100	0,027
CIBE-214	-	-	-	0,076	-	-	-	-	-
CIBE-223	0,073	0,113	0,118	0,123	0,138	0,148	0,171	0,119	0,044
Comercial	0,196	0,203	0,214	0,218	0,219	0,960	1,075	1,31	0,559

Elaborado por: Gabriela García - Abel Chafía, 2014

La Tabla 6 indica que los sobrenadantes liofilizados CIBE-201 y CIBE-223 son las que muestran actividad a las diferentes temperaturas, mientras que el sobrenadante liofilizado CIBE-214 no trabaja de la misma manera, actuando solo a la temperatura a la que se incubó el microorganismo del que se obtuvo el liofilizado.

Para el sobrenadante liofilizado CIBE-201 los resultados de los valores de actividad enzimática, temperatura óptima, temperatura máxima, temperatura mínima están demostrados en la Figura 3.10. Los rangos de las temperaturas de esta enzima están desde $-31.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $51.3\text{ }^{\circ}\text{C}$, y su actividad óptima es 0.145 U/ml a $33.1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

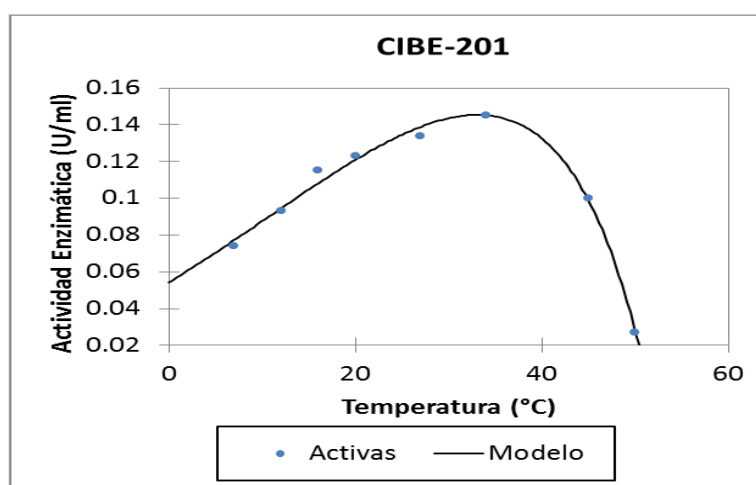


FIGURA 3.10 Actividad enzimática de CIBE-201 con temperatura

Elaborado por: Gabriela García - Abel Chafía, 2014

Los rangos de temperatura obtenidos para el sobrenadante CIBE-223 son de -44.8 a 51.7 °C, siendo la temperatura optima 33.7°C (Figura 3.11).

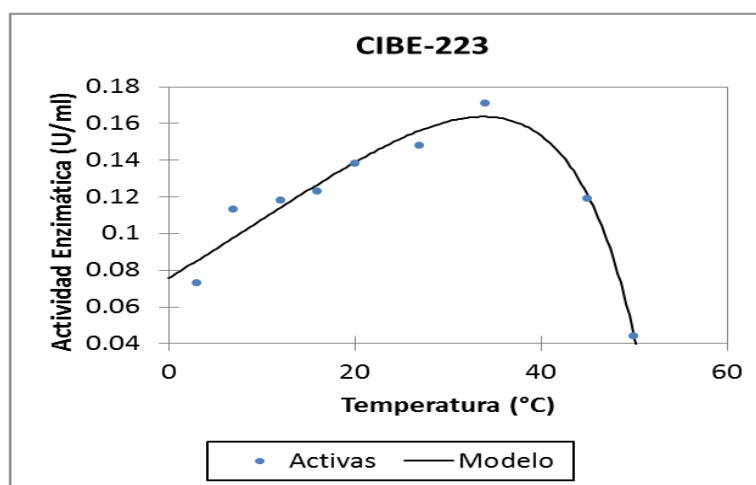


FIGURA 3.11 Actividad enzimática de CIBE-223 con temperatura

Elaborado por: Gabriela García - Abel Chafía, 2014

La enzima comercial, demostró que no trabajaba a temperaturas bajas como lo realizaban las enzimas de origen antártico. La actividad fue presente a temperaturas mayores a 20°C, tal como se demuestra en la figura 3.12.

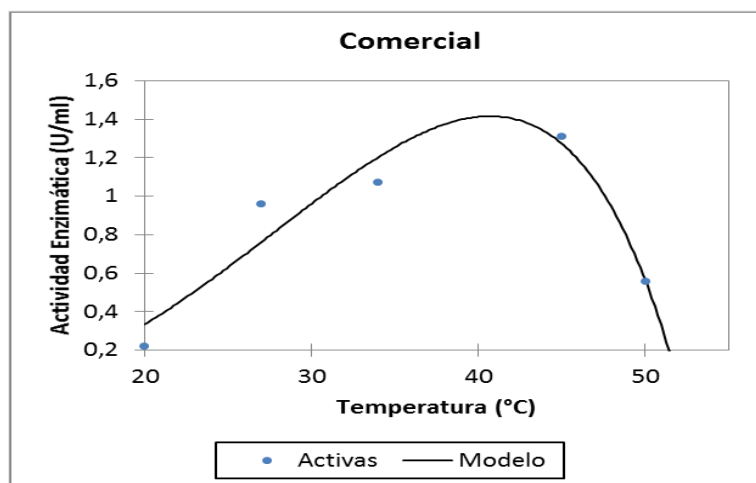


FIGURA 3.12 Actividad enzimática de EC con temperatura

Elaborado por: Gabriela García - Abel Chafra, 2014

Los valores obtenidos de las temperaturas óptimas para cada enzima, indican que la enzima obtenida del sobrenadante liofilizado CIBE-223 trabaja a rangos más amplios de temperatura como - 44.8°C hasta 51.7°C (Tabla 7).

TABLA 7

**COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA
TEMPERATURA**

Temperatura (°C)	CIBE-201	CIBE-223	Comercial
Mínima	-31.4	-44.8	8.5
Óptima	33.1	33.7	40.7
Máxima	51.3	51.7	52.1

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

3.3.2. pH óptimo

Para obtener los valores óptimos de pH de las enzimas en el estudio, se utilizó los valores de absorbancias obtenidos mediante el método de Miller (22).

Se utilizaron los sobrenadantes liofilizados CIBE-201, CIBE-223 y la EC a la temperatura óptima de 34°C determinada experimentalmente. Se excluyó para las pruebas el sobrenadante CIBE-214 por no presentar actividad a esta temperatura (APÉNDICES F, G y H).

Los sobrenadantes CIBE-201 y CIBE-223 mostraron actividad a pH 3, mientras que la EC no. Se evaluó la actividad de esta enzima a pH 3.5 (Figuras 3.13, 3.14).

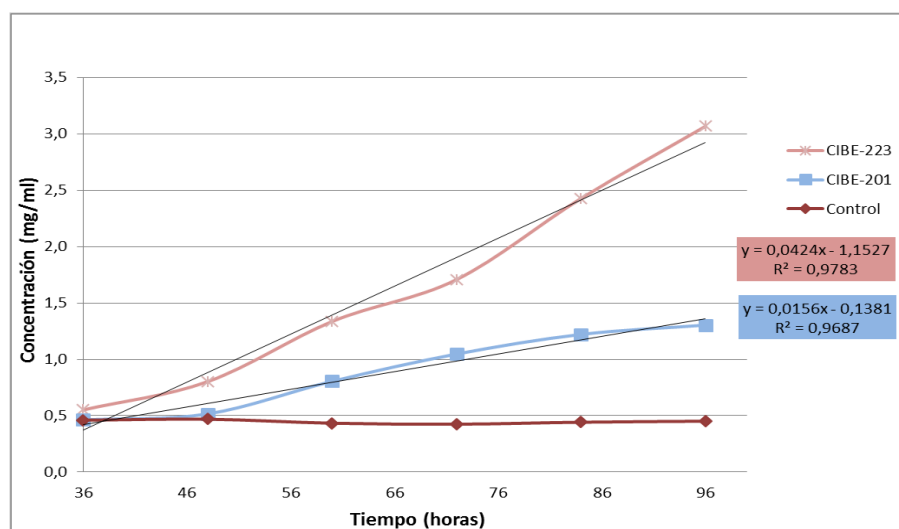


FIGURA 3.13 Efecto de pH 3 en la reacción enzimática

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

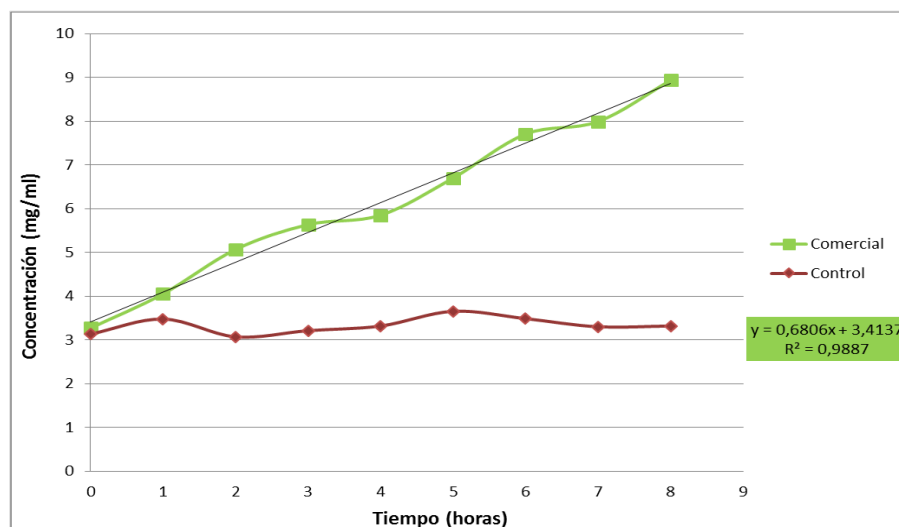


FIGURA 3.14 Efecto de pH 3.5 en la reacción enzimática

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

A partir de pH 3.5, todas las enzimas fueron evaluadas a las mismas condiciones de pH. Se evidencia en los resultados que las enzimas trabajan en rangos amplios de pH como 3.5 hasta 9.8 (Figuras 3.15, 3.16, 3.17).

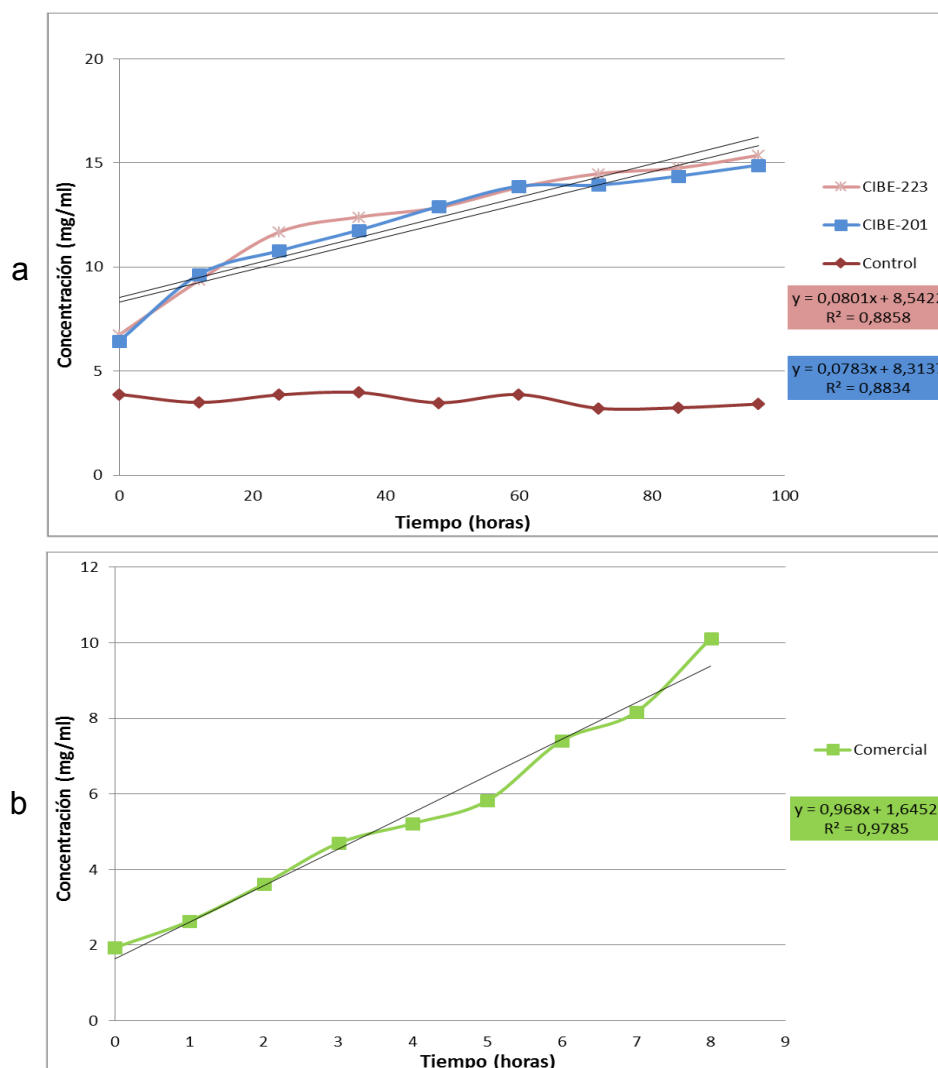


FIGURA 3.15 Efecto de pH 4.5 en la reacción enzimática

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafla, 2014

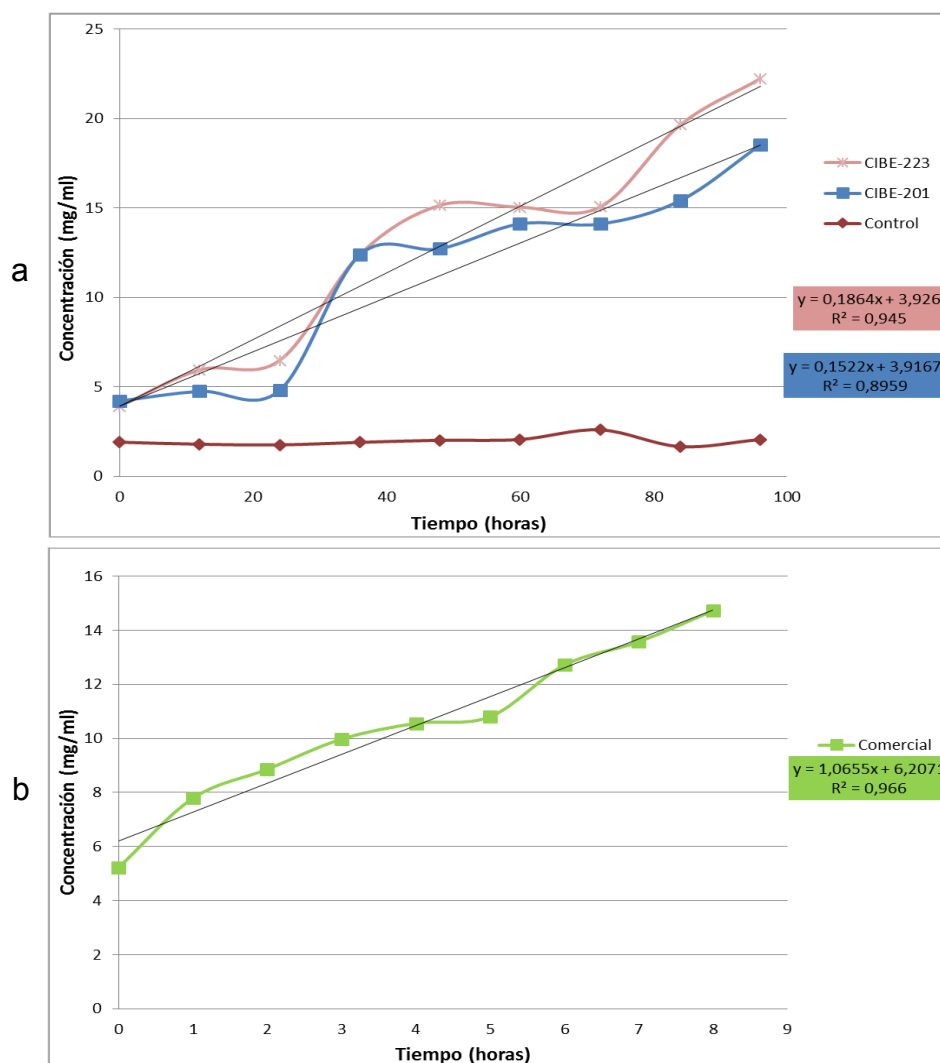


FIGURA 3.16 Efecto de pH 6 en la reacción enzimática

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafía, 2014

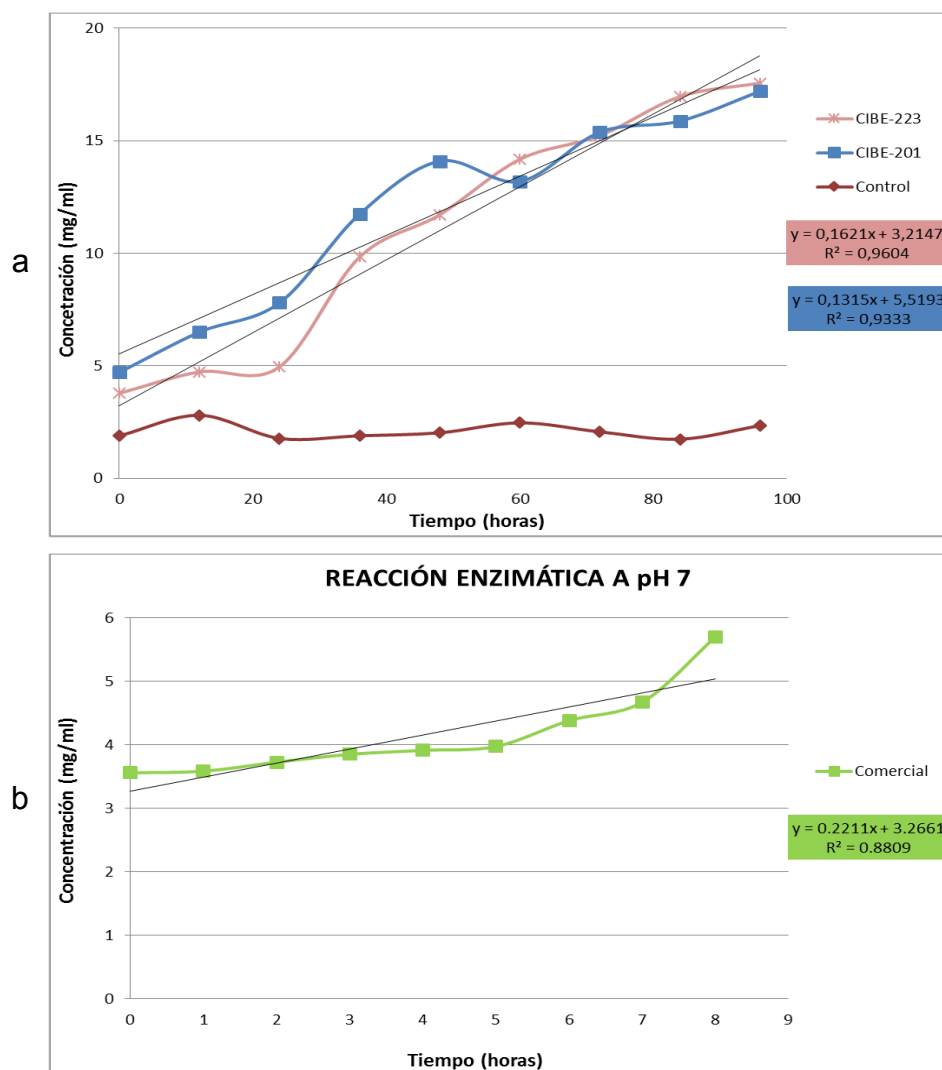


FIGURA 3.17 Efecto de pH 7 en la reacción enzimática

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafía, 2014

Para los pH 8 y 9 se observa en las curvas que la actividad de la EC es baja, mientras que para los sobrenadantes liofilizados CIBE-201 y CIBE-223 si hay actividad (Figura 3.18, 3.19).

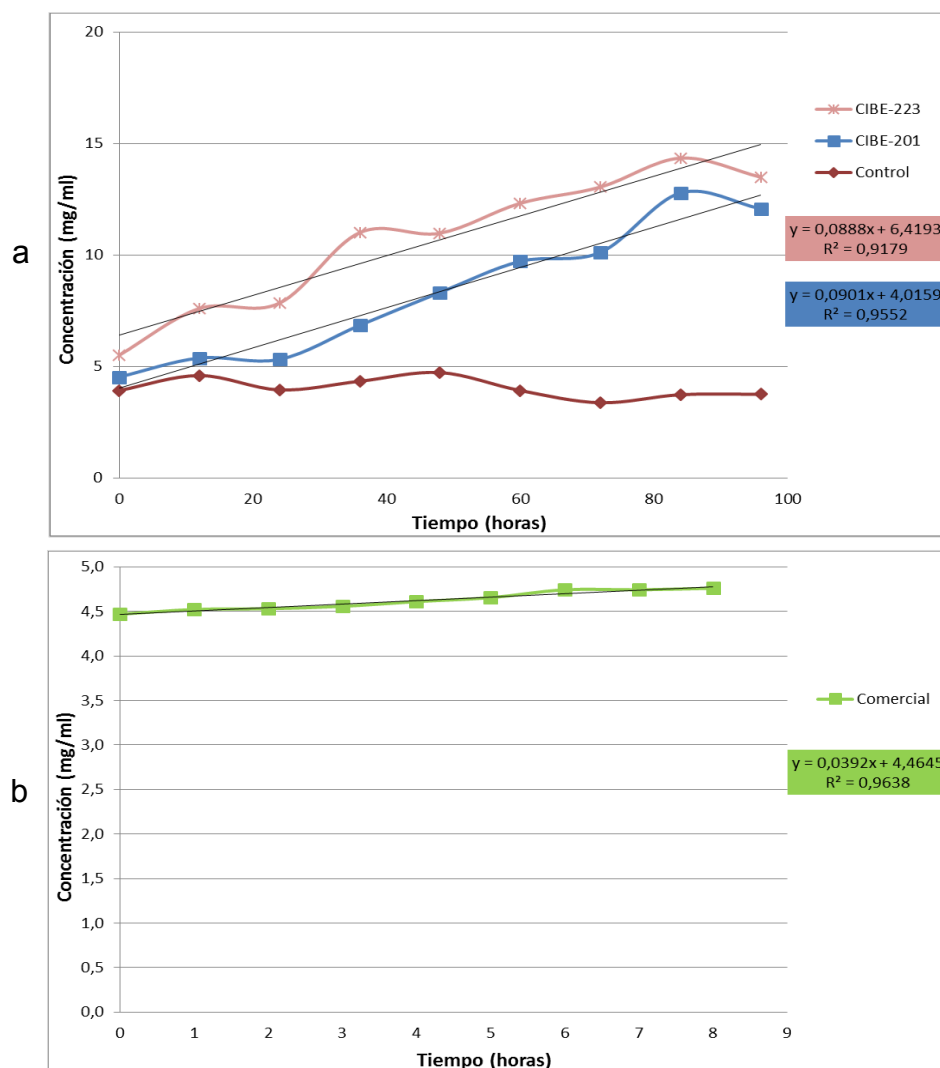


FIGURA 3.18 Efecto de pH 8 en la reacción enzimática

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafla, 2014

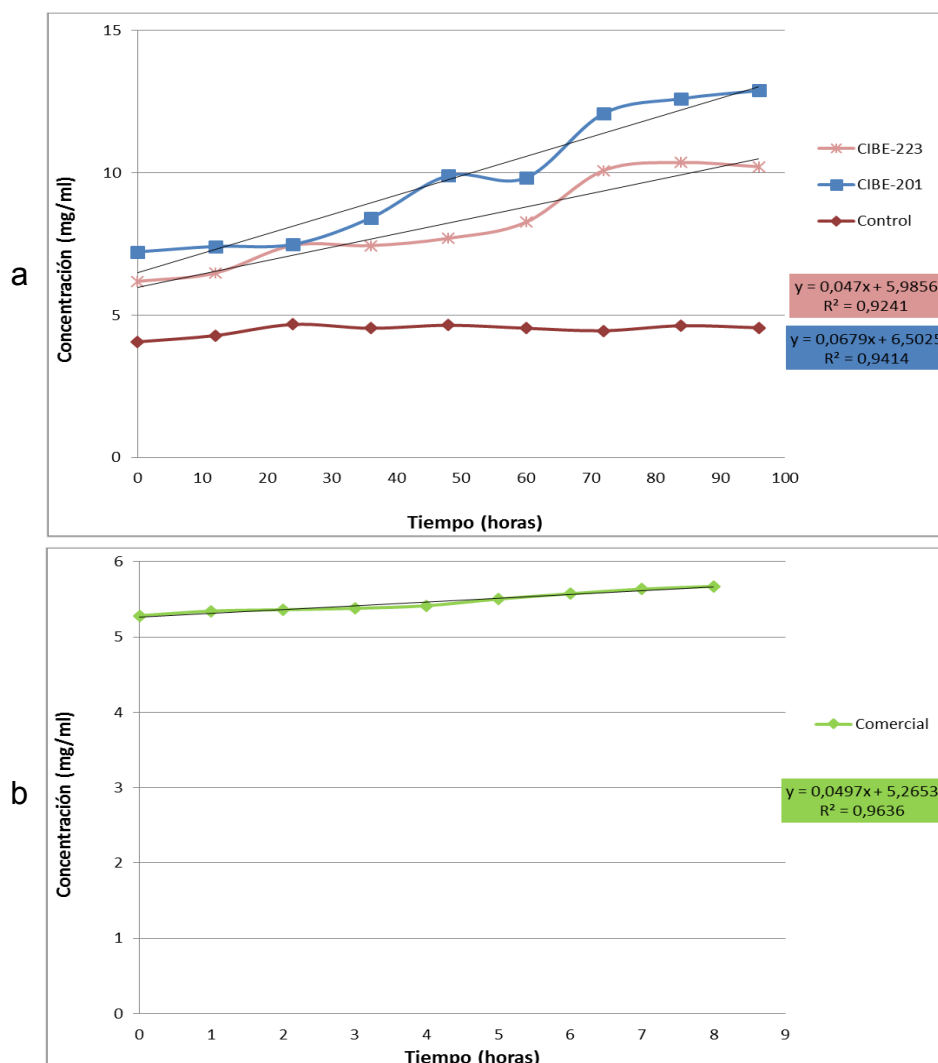


FIGURA 3.19 Efecto de pH 9 en la reacción enzimática

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafla, 2014

Los sobrenadantes liofilizados CIBE-201 y CIBE-223 presentan valores de pH un poco más amplios que la enzima comercial, observando así que la enzima comercial trabaja solo hasta pH de 7,

mientras que los sobrenadantes liofilizados tienen un rango hasta de 9. El valor óptimo de estas enzimas se encuentra en un pH de 6.5, mientras que la enzima comercial lo tiene en 5. Los datos comparativos de pH se muestran en la Tabla 8.

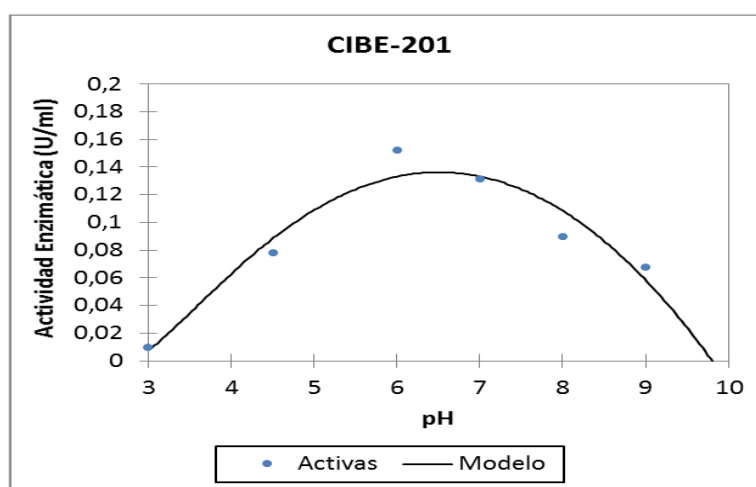


FIGURA 3.20 Actividad enzimática de CIBE-201 con pH

Elaborado por: Gabriela García - Abe Chafía, 2014

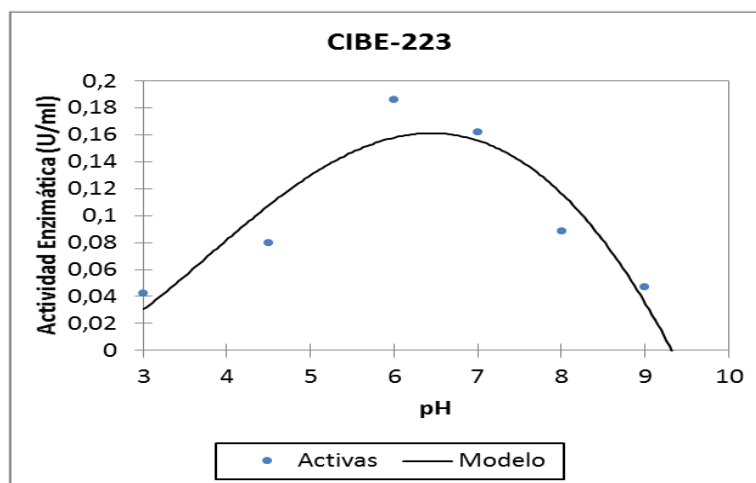


FIGURA 3.21 Actividad enzimática de CIBE-223 con pH

Elaborado por: Gabriela García - Abel Chafra, 2014

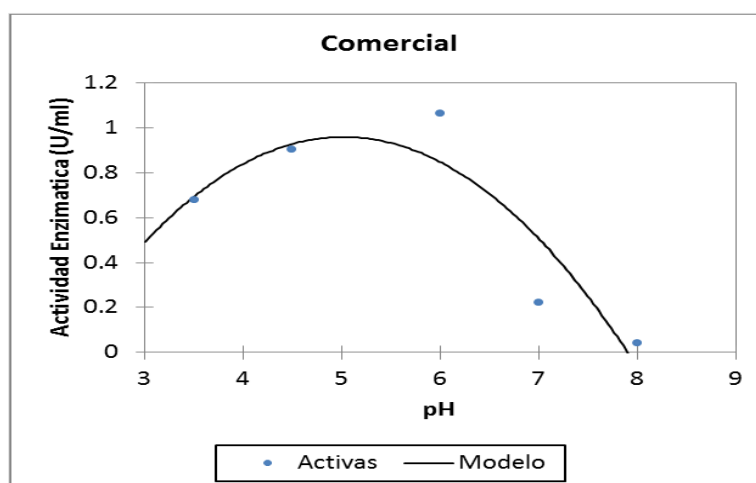


FIGURA 3.22 Actividad enzimática de EC con pH

Elaborado por: Gabriela García - Abel Chafra, 2014

TABLA 8

COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE pH

pH	CIBE-201	CIBE-223	Comercial
Minimo	2,9	1,9	2,1
Optimo	6,5	6,4	5,0
Maximo	9,9	9,3	7,9

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

3.4. Clarificación del jugo de manzana

El proceso de clarificación de jugos por medio de enzimas se da en 2 etapas, que son la maceración y la clarificación propiamente dicha.

Para la maceración se midieron los rendimientos de la pulpa extraída usando el tratamiento enzimático. Los resultados fueron expresados en ml de jugo extraído, y comparados con una extracción utilizando enzima comercial. En la maceración los valores obtenidos muestran que no hay una diferencia significativa

($p > 0.05$) al utilizar a 7°C y si hay una diferencia significativa ($p < 0.05$) a 45°C al utilizar cualquier tipo de enzima (APÉNDICE I).

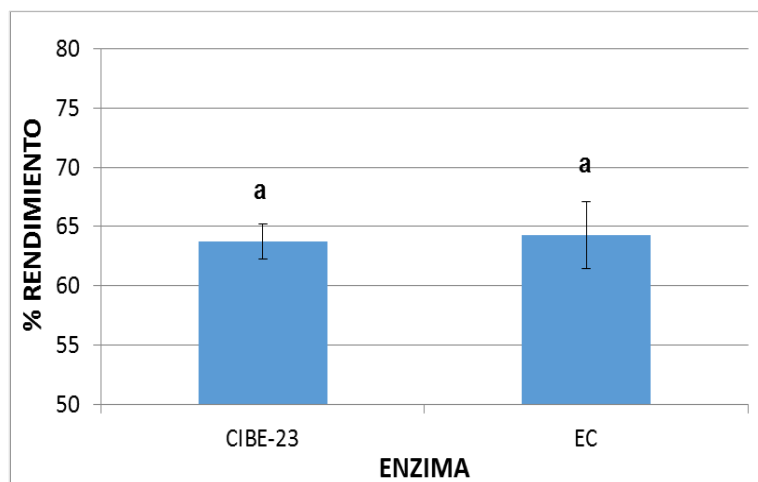


FIGURA 3.23 Actividad enzimática de CIBE-223 y EC a 7°C en la maceración⁵

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafía, 2014

⁵ Barras con las mismas letras no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el ANOVA.

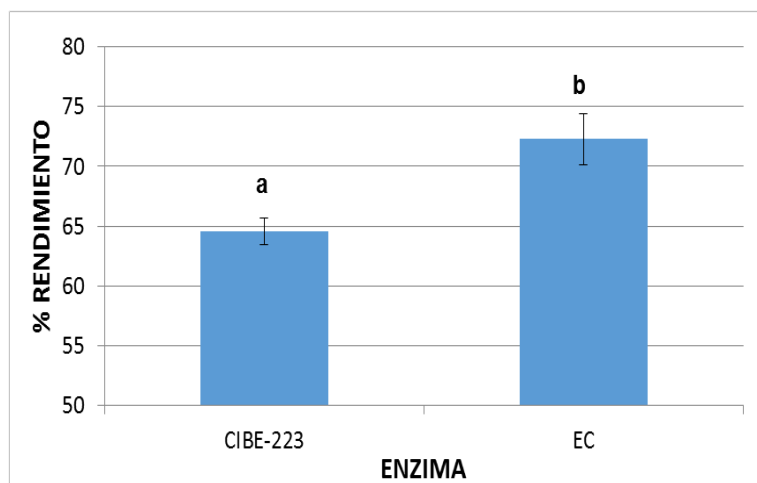


FIGURA 3.24 Actividad enzimática de CIBE-223 y EC a 45°C en la maceración⁶

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafla, 2014

3.4.1. Evaluación turbidimétrica

El proceso de clarificación es evaluado por la medición de la reducción de la viscosidad en los jugos tratados enzimáticamente. Se clarificó usando los sobrenadantes liofilizados y la enzima comercial a 7°C y a 45°C.

⁶ Barras con diferentes letras presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el ANOVA.

Los análisis estadísticos de ANOVA mostraron que la clarificación del jugo fue significativo ($p < 0.05$) con todos los liofilizados y enzimas comercial utilizadas (APÉNDICE I).

TABLA 9

ANÁLISIS DE LA CLARIFICACIÓN CON LIOFILIZADOS Y ENZIMA COMERCIAL

Enzima	Abs. antes de clarificar	Abs. después de clarificar	% Clarificación
CIBE-223 (7°C)	0.950 ± 0.02	0.368 ± 0.01	61.09 ± 1.69
EC (7°C)	0.950 ± 0.02	0.291 ± 0.01	70.01 ± 1.02
CIBE-223 (45°C)	0.950 ± 0.02	0.306 ± 0.01	67.72 ± 1.23
EC (45°C)	0.950 ± 0.02	0.161 ± 0.01	82.78 ± 1.39

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

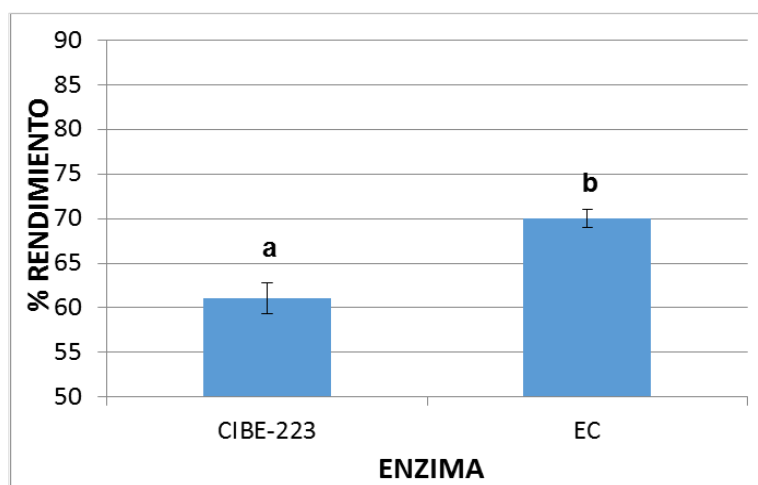


FIGURA 3.25 Actividad enzimática de CIBE-223 y EC a 7°C en la clarificación⁷

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

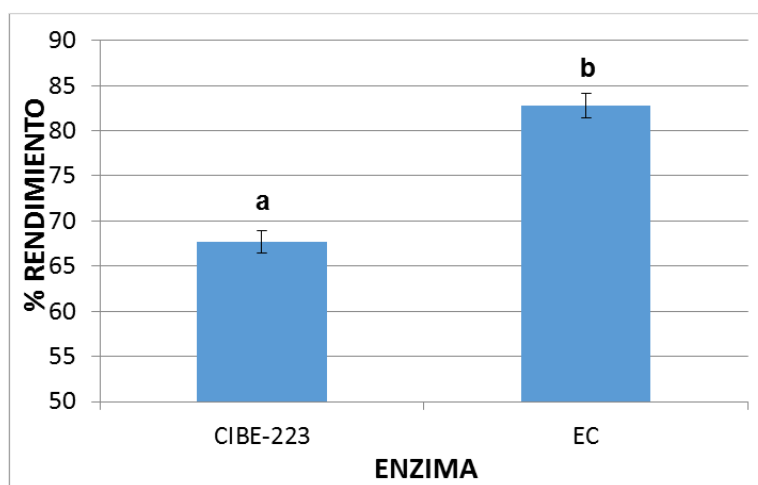


FIGURA 3.26 Actividad enzimática de CIBE-223 y EC a 45°C en la clarificación⁸

Elaborado por: Gabriela García – Abel Chafra, 2014

⁷ Barras con diferentes letras presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el ANOVA.

⁸ Barras con diferentes letras presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el ANOVA.

Discusión

El presente trabajo tuvo el propósito de caracterizar pectinasas antárticas y evaluar su posible utilidad en la industria de alimentos, específicamente en la clarificación del jugo de manzana. En este estudio se utilizó el sobrenadante producido por el microorganismo, ya liofilizado, por lo que los resultados no se pueden comparar frente a una enzima comercial pura. A continuación se presentan las discusiones de los principales hallazgos de esta investigación.

Estudios realizados en cepas de hongos psicrófilos, demuestran que si existe actividad de enzimas pectinasas a temperaturas inferiores a las trabajadas comercialmente, como el hongo *Truncatella angustata* que tiene actividad a 4°C en placas con agar (21). Los liofilizados enzimáticos en estudio presentados en este trabajo presentan actividad a estas temperaturas.

La actividad enzimática de los hongos se evaluó por la diferencia existente entre los diámetros de la colonia y el diámetro del halo. De las 15 cepas de hongos sembradas la diferencia del diámetro fue de 0.2 cm a 0.9 cm. El hongo CIBE-223 fue la que tuvo mayor actividad,

es decir, es mayor a las reportadas de la enzima pectinasa de *Aspergillus niger* cuyo diámetro del halo máximo es de 0.3 cm (27).

El tipo de enzimas presente en nuestros sobrenadantes liofilizados son la pectin esterasa y endopolimetil galacturonasa. Estudios realizados en hongos psicrófilos, demuestran la presencia de actividad de las 3 enzimas pectinolíticas usadas en la industria, PE, PL y EPG (21). La ausencia de la pectato liasa en los liofilizados de este estudio, nos indica que es necesario buscar otra fuente adicional de pectato liasa para obtener el complejo enzimático completo.

Los resultados en el estudio de las temperaturas óptimas de los sobrenadantes liofilizados demostraron que estos pueden trabajar a temperaturas entre -44.8°C y 51.7°C , mientras que las enzimas comerciales su temperatura esta entre 8°C y 50°C . Según referencias de laboratorio comerciales (26) las enzimas pectinasas tienen su mayor actividad entre 24°C a 37°C a un pH de 4. Estudios de enzimas pectinolíticas en hongos como el *Aspergillus niger* indican que la temperatura optima de la enzima es a 40°C a un pH 4 (27). Estos nos da un indicativo del uso que se le podría dar a estas

enzimas obtenidas, si se las trabajara en las temperaturas más bajas que las que se utilizan normalmente.

La aplicación de estas enzimas a temperaturas de refrigeración causaría un ahorro energético en los procesos, debido a que la clarificación se la podría realizar a las temperaturas normales de mantenimiento refrigerado sin necesidad de calentar a 40°C mejorando así el proceso.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES

1. De las 15 cepas de hongos seleccionadas para el estudio, solo 6 formaron halos, de los cuales 3 presentaron una diferencia en el halo mayor a 0.5 mm (CIBE-201, CIBE-214, CIBE-223) identificando así como una buena actividad pectinolítica.
2. Se encontró presencia de actividad enzimática de pectin esterasa y endo polimetil galacturonasa en los 3 sobrenadantes liofilizados CIBE-201, CIBE-214, CIBE-223, mientras que actividad pectato liasa no se encontró en ningún liofilizado. Esta enzima actúa sobre la pectina de bajo metoxilo, y es producida generalmente por bacterias.
3. Los sobrenadante liofilizados CIBE-201 y CIBE-223 tienen un amplio rango de actividad pectinolítica tanto en temperatura y pH.

El sobrenadante CIBE-201 presenta actividad en rangos de temperatura entre -31.4°C a 51.3°C , mientras que la actividad CIBE-223 está en rangos de -44.8°C a 51.7°C . Comparando estos rangos con los obtenidos para una enzima comercial utilizada comúnmente en la industria, cuyo rango de temperatura está entre 8.5°C a 52.1°C . Queda demostrado que los sobrenadantes pueden ser trabajados en la clarificación en bajas temperatura.

Las enzimas antárticas tendrían un rol muy importante en el área de la biotecnología, ya que se pueden trabajar en condiciones extremas de temperaturas, dándole a los procesos en los que se aplique una gran versatilidad y una mejora en los mismos.

Con respecto a la actividad de los sobrenadantes liofilizados frente a las diferentes condiciones de pH, podemos denotar que pueden trabajar en pH muy bajos como 2.7 hasta muy alcalinos como 9.8. Comparando estos valores con los de la enzima comercial, esto da una ventaja con respecto a los tipos de procesos en los que se puedan usar los sobrenadantes liofilizados que se encuentran en estudio.

4. El uso de los sobrenadantes liofilizados en la clarificación del jugo de manzana dio como resultado una actividad significativa en la degradación de la pectina, al medir la disminución de la absorbancia tanto en las condiciones de proceso frío a 7°C y en condiciones de trabajo normal 45°C en la industria. El demostrar que este tipo de microorganismos extremófilos, pueden tener uso tecnológico en diferentes industrias, nos asegura que en algún momento futuro podamos obtener otras fuentes de recursos biotecnológicos.

Recomendaciones

- Para poder utilizar los liofilizados y comparar resultados frente a las enzimas existentes ya en la industria, es necesario realizar la purificación de las mismas, ya que al no estar puras presentan sales y contaminantes que interfieren en la medición de la actividad.
- Para trabajar con estas enzimas, se debería hacer un estudio más específico sobre su actividad a temperaturas de congelación y evaluarlas en un proceso industrial. De esta manera se le puede dar mayor uso tecnológico.

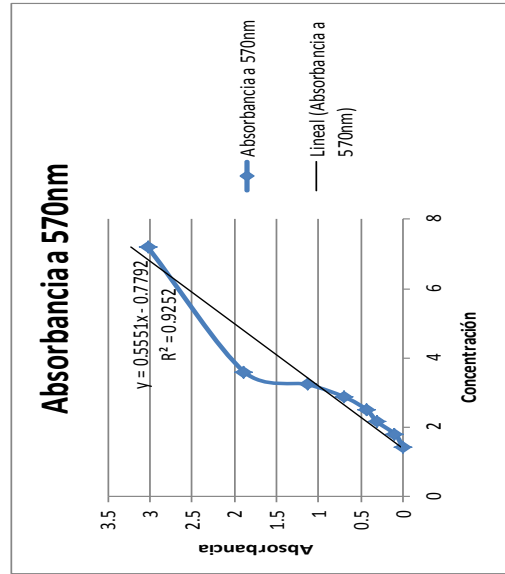
- La ausencia de actividad de la pectato liasa, la cual es importante para el proceso de la clarificación, nos indica que es necesario obtenerla de otra fuente, para poder así trabajar con estas enzimas encontradas en el proceso completo de clarificación.

APÉNDICES

APÉNDICE A

CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA GLUCOSA

TUBO	CONCENTRACION (mM)	AGUA DESTILADA	GLUCOSA 40mM	Absorbancia a 570nm	Absorbancia a 570nm	Absorbancia a 570nm	Absorbancia a 570nm	Absorbancia a 570nm	Absorbancia a 570nm	promedio
	0	5	0	0.23	0.119					0.175
	2	4.75	0.25	0.28	0.249					0.265
	4	4.5	0.5	0.449	0.501					0.475
	6	4.25	0.75	0.641	0.579					0.610
1	8	4	1	0.905	0.861					0.865
2	10	3.75	1.25	1.189	1.176					1.191
3	12	3.5	1.5	1.43	1.426					1.436
4	14	3.25	1.75	1.705	1.668					1.686
5	16	3	2	1.91	1.873					1.891
6	18	2.75	2.25	2.098	2.088					2.059
7	20	2.5	2.5	2.33	2.346					2.339
	40	0	5	3.32	3.08					3.200

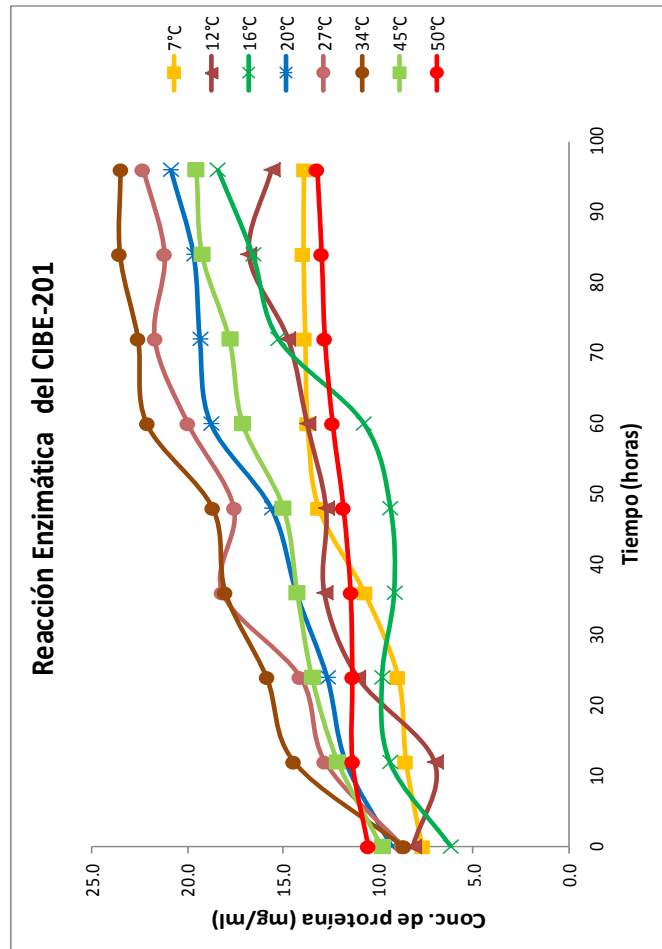


TUBO	CONCENTRACION (M)	CONCENTRACION (g)	Absorbancia a 570nm
0	0.008	1.4408	0
1	0.01	1.801	0.09
2	0.012	2.1612	0.3005
3	0.014	2.5214	0.4355
4	0.016	2.8816	0.6965
5	0.018	3.2418	1.135
6	0.02	3.602	1.8805
7	0.04	7.204	3.0255

APÉNDICE B

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DEL CIBE-201

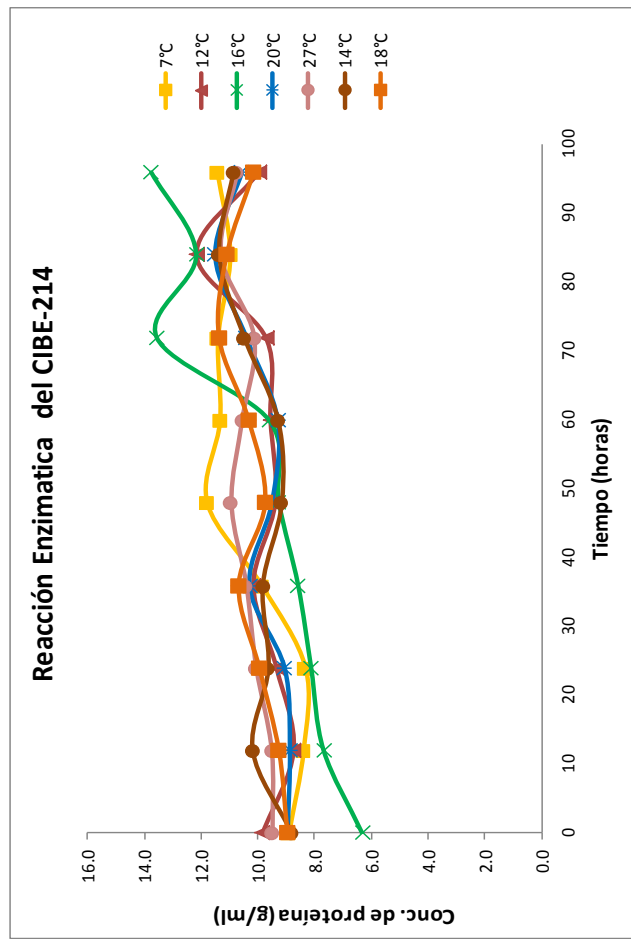
Temperatura	Tiempo (h)									
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	
7°C	7.7	8.5	8.9	10.7	13.1	13.7	13.8	13.9	13.9	
12°C	8.2	7.0	11.0	12.8	12.7	13.7	14.7	16.8	15.6	
16°C	6.2	9.4	9.8	9.1	9.3	10.7	15.2	16.6	18.4	
20°C	9.3	11.7	12.7	14.3	15.6	18.8	19.3	19.7	20.9	
27°C	8.7	12.8	14.1	18.2	17.6	20.0	21.7	21.2	22.3	
34°C	8.6	14.4	15.8	18.0	18.7	22.1	22.6	23.5	23.5	
45°C	9.8	12.1	13.5	14.2	14.9	17.1	17.8	19.2	19.5	
50°C	10.5	11.3	11.3	11.4	11.8	12.4	12.8	12.9	13.2	



APÉNDICE C

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DEL CIBE-214

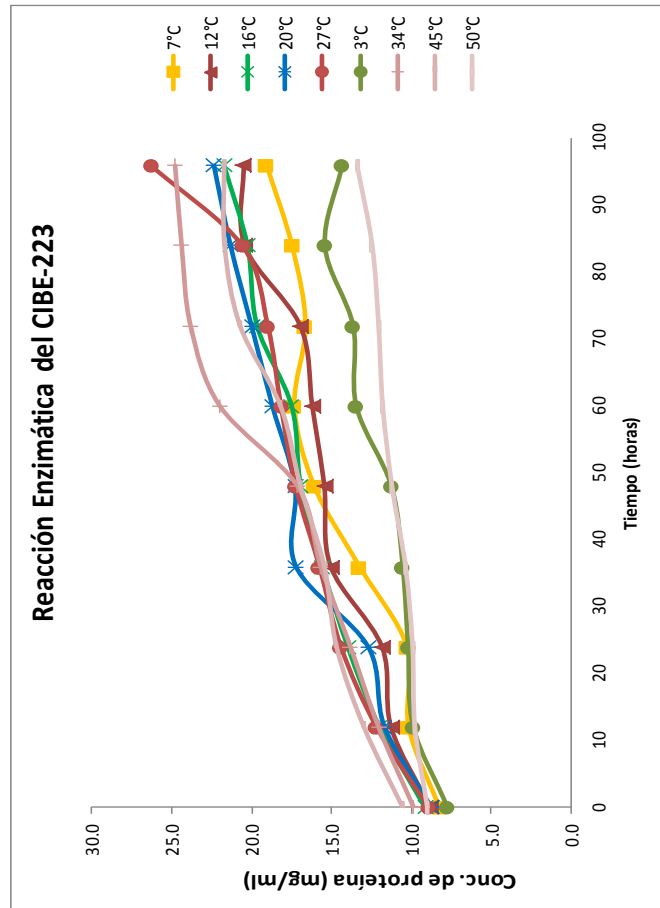
Temperatura	Tiempo (h)									
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	
7°C	8.9	8.4	8.3	9.9	11.8	11.3	11.4	11.0	11.4	
12°C	9.8	8.7	9.3	10.2	9.4	9.6	9.7	12.2	10.0	
14°C	8.8	10.2	9.6	9.8	9.2	9.3	10.5	11.4	10.9	
16°C	6.3	7.7	8.1	8.6	9.3	9.6	13.6	12.2	13.8	
18°C	9.0	9.3	9.9	10.7	9.7	10.3	11.4	11.1	10.1	
20°C	8.9	8.9	9.1	10.3	9.5	9.3	10.4	11.5	10.6	
27°C	9.5	9.5	10.1	10.4	10.9	10.6	10.1	11.3	10.7	



APÉNDICE D

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DEL CIBE-223

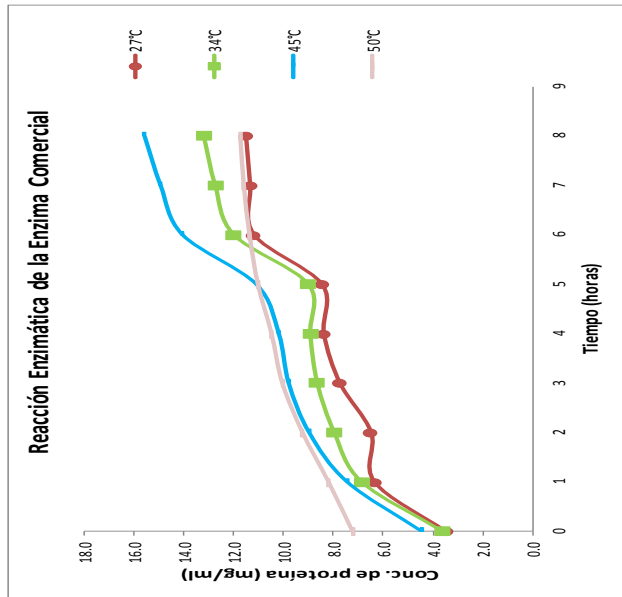
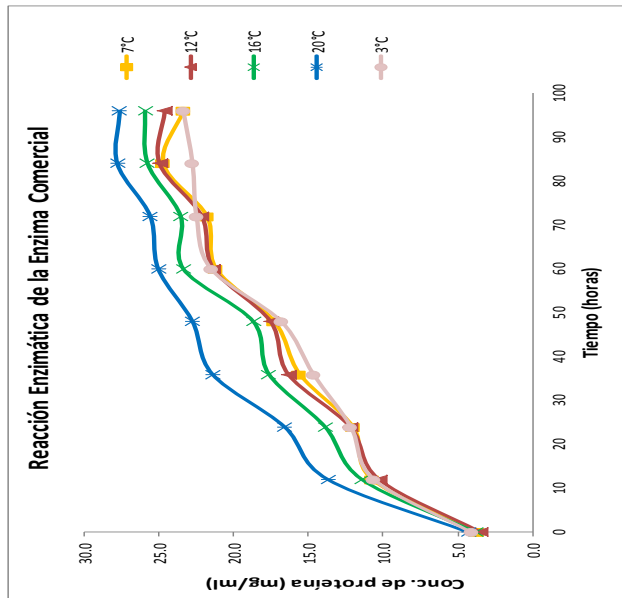
Temperatura	Tiempo (h)									
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	
3°C	7.7	9.9	10.2	10.5	11.2	13.4	13.6	15.4	14.3	
7°C	8.2	10.2	10.3	13.2	16.1	17.3	16.6	17.5	19.0	
12°C	8.8	11.3	11.8	15.0	15.4	16.2	16.9	20.4	20.5	
16°C	9.1	12.0	14.0	15.6	16.9	17.5	19.6	20.3	21.7	
20°C	8.7	11.7	12.7	17.2	17.3	18.7	20.0	21.3	22.4	
27°C	8.9	12.2	14.4	15.7	17.2	18.2	19.0	20.6	26.3	
34°C	9.8	12.0	13.8	15.7	17.1	22.0	23.8	24.4	24.8	
45°C	10.5	13.0	14.7	15.4	16.9	18.2	20.7	21.7	21.7	
50°C	9.0	9.8	9.9	10.4	11.2	11.8	12.0	12.4	13.4	



APÉNDICE E

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COMERCIAL

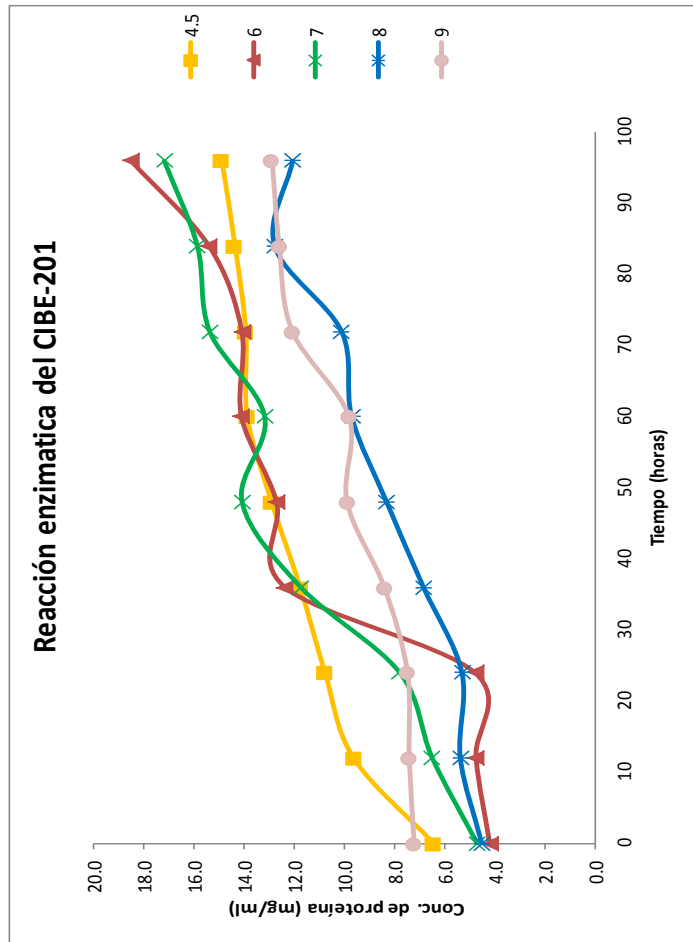
Temperatura	Tiempo (h)									
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	
3°C	4.1	10.6	12.2	14.7	16.8	21.5	22.5	22.8	23.4	
7°C	3.7	10.7	12.0	15.6	17.3	21.2	21.8	24.7	23.4	
12°C	3.5	10.3	12.2	16.4	17.5	21.4	22.2	25.0	24.6	
16°C	3.8	11.4	13.9	17.7	18.7	23.4	23.6	25.8	26.0	
20°C	4.3	13.7	16.6	21.4	22.8	25.1	25.6	27.8	27.6	
27°C	3.5	6.3	6.5	7.7	8.4	8.5	11.2	11.3	11.5	
34°C	3.6	6.9	8.0	8.6	8.9	9.0	12.0	12.8	13.2	
45°C	4.4	7.4	9.0	9.8	10.2	11.1	14.1	14.9	15.6	
50°C	7.2	8.2	9.2	10.1	10.5	11.0	11.4	11.6	11.7	



APÉNDICE F

EFFECTO DE pH EN LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DEL CIBE-201

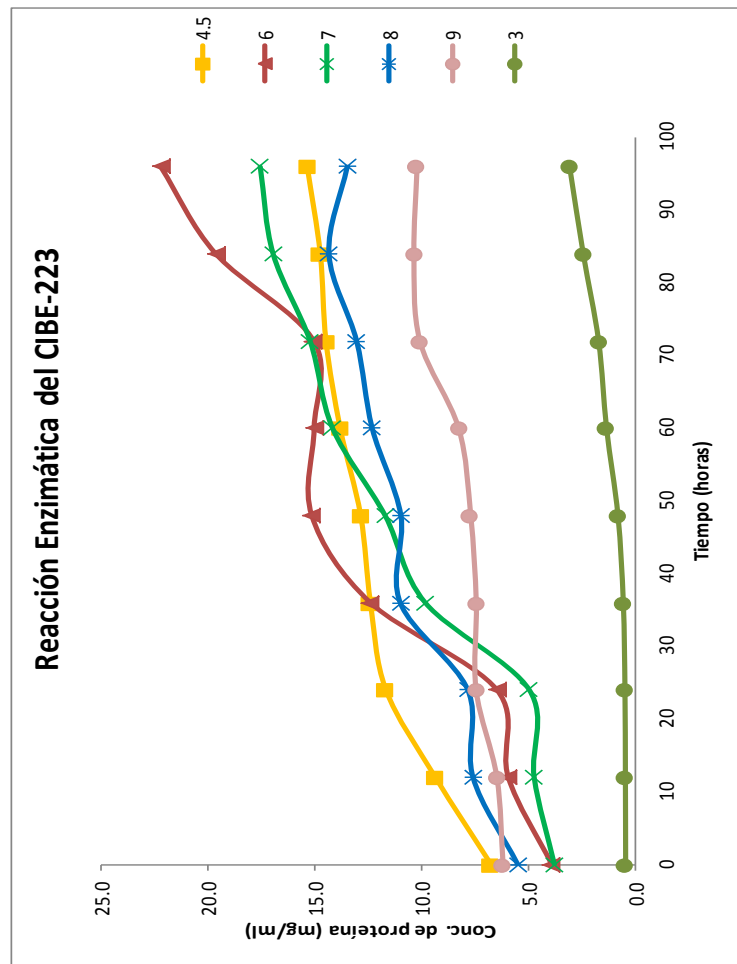
pH	Tiempo (h)									
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	
3	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.8	1.0	1.2	1.3	
4.5	6.5	9.6	10.8	11.8	12.9	13.9	13.9	14.4	14.9	
6	4.2	4.7	4.8	12.4	12.7	14.1	14.1	15.4	18.5	
7	4.7	6.5	7.8	11.7	14.1	13.2	15.4	15.9	17.2	
8	4.5	5.4	5.3	6.8	8.3	9.7	10.1	12.8	12.1	
9	7.2	7.4	7.5	8.4	9.9	9.8	12.1	12.6	12.9	



APÉNDICE G

EFFECTO DE pH EN LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DEL CIBE-223

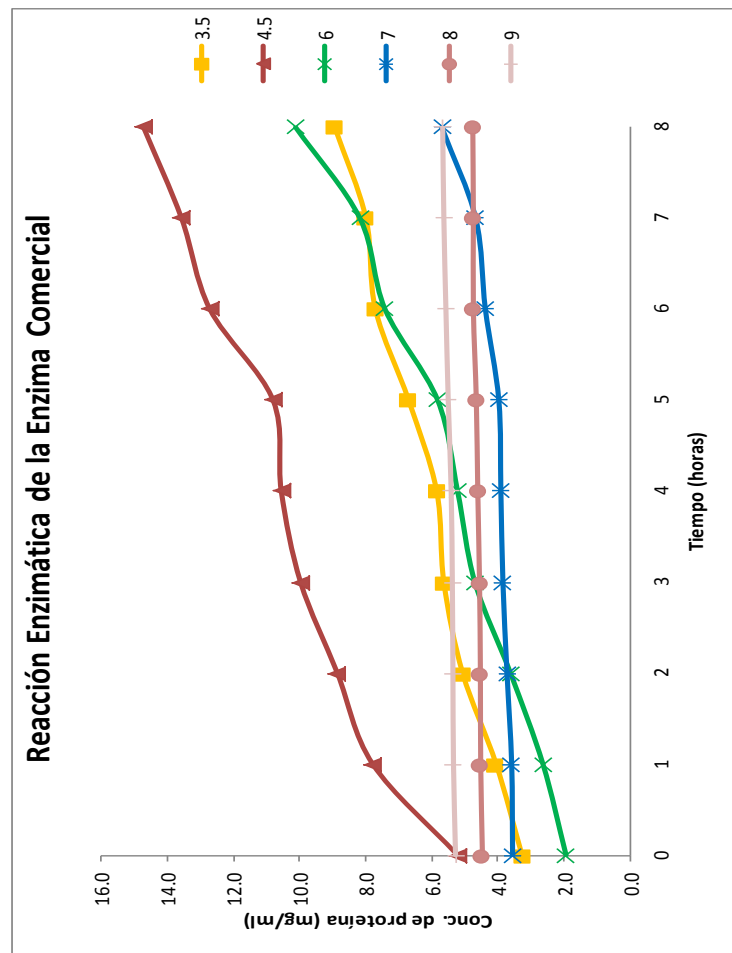
pH	Tiempo (h)									
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	
3	0.4	0.5	0.5	0.6	0.8	1.3	1.7	2.4	3.1	
4.5	6.8	9.4	11.7	12.4	12.9	13.8	14.5	14.8	15.4	
6	3.9	5.9	6.5	12.4	15.2	15.0	15.1	19.6	22.2	
7	3.8	4.7	5.0	9.8	11.7	14.2	15.2	17.0	17.6	
8	5.5	7.6	7.8	11.0	11.0	12.3	13.0	14.3	13.5	
9	6.2	6.5	7.5	7.4	7.7	8.3	10.1	10.4	10.2	



APÉNDICE H

EFFECTO DE pH EN LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA COMERCIAL

pH	Tiempo (h)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
3.5	3.3	4.1	5.1	5.6	5.9	6.7	7.7	8.0	8.9
4.5	5.2	7.8	8.9	10.0	10.6	10.8	12.7	13.6	14.7
6	1.9	2.6	3.6	4.7	5.2	5.8	7.4	8.2	10.1
7	3.6	3.6	3.7	3.8	3.9	4.0	4.4	4.7	5.7
8	4.5	4.5	4.5	4.6	4.6	4.7	4.7	4.7	4.8
9	5.3	5.3	5.4	5.4	5.4	5.5	5.6	5.6	5.7



APÉNDICE I

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

ACTIVIDAD PECTIN ESTERASA DEL CIBE-201

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Inicial CIBE-201	3	1.36	0.453333333	0.00023333
Final CIBE-201	3	2.68	0.893333333	3.3333E-05

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.2904	1	0.2904	2178	1.26098E-06	7.708647422
Dentro de los grupos	0.000533333	4	0.000133333			
Total	0.290933333	5				

ACTIVIDAD PECTIN ESTERASA DEL CIBE-214

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Inical CIBE-214	3	0.95	0.316666667	0.000633333
Final CIBE-214	3	2.19	0.73	0.0004

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.256266667	1	0.256266667	496	2.40643E-05	7.708647422
Dentro de los grupos	0.002066667	4	0.000516667			
Total	0.258333333	5				

ACTIVIDAD PECTIN ESTERASA DEL CIBE-223

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Inicial CIBE-223	3	1.57	0.523333333	0.000933333
Final CIBE-223	3	3.5	1.166666667	0.001633333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.620816667	1	0.620816667	483.7532468	2.52896E-05	7.708647422
Dentro de los grupos	0.005133333	4	0.001283333			
Total	0.62595	5				

ACTIVIDAD PECTIN ESTERASA DE LA ENZIMA COMERCIAL

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Inicial EC	3	0.1	0.03333333	0.00023333
Final EC	3	0.5	0.16666667	0.00063333

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.02666667	1	0.02666667	61.53846154	0.001426315	7.708647422
Dentro de los grupos	0.001733333	4	0.000433333			
Total	0.0284	5				

ACTIVIDAD PECTATO LIASA DEL CIBE-201

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Inicial CIBE-201	3	11.506	3.83533333	0.000592333
Final CIBE-201	3	11.52	3.84	0.0001

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3.26667E-05	1	3.26667E-05	0.094366875	0.774026116	7.708647422
Dentro de los grupos	0.001384667	4	0.000346167			
Total	0.001417333	5				

ACTIVIDAD PECTATO LIASA DEL CIBE-214

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Inicial CIBE-214	3	11.5	3.83333333	0.001733333
Final CIBE-214	3	11.78	3.92666667	0.004433333

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.013066667	1	0.013066667	4.237837838	0.108624782	7.708647422
Dentro de los grupos	0.012333333	4	0.003083333			
Total	0.0254	5				

ACTIVIDAD PECTATO LIASA DEL CIBE-223

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Inicial CIBE-223	3	11.567	3.855666667	0.000204333
Final CIBE-223	3	11.67	3.89	0.0016

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.001768167	1	0.001768167	1.959911325	0.234109392	7.708647422
Dentro de los grupos	0.003608667	4	0.000902167			
Total	0.005376833	5				

ACTIVIDAD PECTATO LIASA DE LA ENZIMA COMERCIAL

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Inicial EC	3	9.78	3.26	0.0001
Final EC	3	9.72	3.24	0.0349

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0006	1	0.0006	0.034285714	0.862110089	7.708647422
Dentro de los grupos	0.07	4	0.0175			
Total	0.0706	5				

ACTIVIDAD ENDOPOLIMETIL GALACTURONASA DEL CIBE-201

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Inicial CIBE-201	3	418	139.3333333	5.333333333
Final CIBE-201	3	266	88.66666667	2.333333333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3850.666667	1	3850.666667	1004.521739	5.90685E-06	7.708647422
Dentro de los grupos	15.33333333	4	3.833333333			
Total	3866	5				

ACTIVIDAD ENDOPOLIMETIL GALACTURONASA DEL CIBE-214

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Inicial CIBE-214	3	407	135.6666667	6.333333333
Final CIBE-214	3	311	103.6666667	32.33333333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1536	1	1536	79.44827586	0.000875772	7.708647422
Dentro de los grupos	77.33333333	4	19.33333333			
Total	1613.333333	5				

ACTIVIDAD ENDOPOLIMETIL GALACTURONASA DEL CIBE-223

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Inicial CIBE-223	3	553	184.3333333	36.33333333
Final CIBE-223	3	270	90	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	13348.16667	1	13348.16667	661.892562	1.35586E-05	7.708647422
Dentro de los grupos	80.66666667	4	20.16666667			
Total	13428.83333	5				

ACTIVIDAD ENDOPOLIMETIL GALACTURONASA DE LA ENZIMA COMERCIAL

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Inicial EC	3	259	86.33333333	16.33333333
Final EC	3	108	36	9

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3800.166667	1	3800.166667	300.0131579	6.5205E-05	7.708647422
Dentro de los grupos	50.66666667	4	12.66666667			
Total	3850.833333	5				

RENDIMIENTO DE MACERACIÓN A 7°C

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
CIBE-223	5	318.5714286	63.71428571	10.81633
EC	5	321.4285714	64.28571429	39.79592

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.816326531	1	0.816326531	0.032258	0.86192822	5.317655072
Dentro de los grupos	202.4489796	8	25.30612245			
Total	203.2653061	9				

RENDIMIENTO DE MACERACIÓN A 45°C

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
CIBE-223	5	322.8571429	64.57142857	6.53061
EC	5	361.4285714	72.28571429	23.0612

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	148.7755102	1	148.7755102	10.0552	0.013175008	5.317655072
Dentro de los grupos	118.3673469	8	14.79591837			
Total	267.1428571	9				

RENDIMIENTO DE CLARIFICACIÓN A 7°C

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
CIBE-223	5	305.4458353	61.08916706	14.33476046
EC	5	350.040797	70.00815941	5.249275967

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	198.8710609	1	198.8710609	20.30950684	0.001984687	5.317655072
Dentro de los grupos	78.33614572	8	9.792018215			
Total	277.2072067	9				

RENDIMIENTO DE CLARIFICACIÓN A 45°C

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
CIBE-223	5	338.6093721	67.72187442	7.58276
EC	5	413.9057606	82.78115213	9.70316

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	566.9546125	1	566.9546125	65.5972	3.99565E-05	5.317655072
Dentro de los grupos	69.14371302	8	8.642964128			
Total	636.0983255	9				

ABSORBANCIA DE LA CLARIFICACIÓN DEL CIBE-223 A 7°C

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Sin clarificar	5	4.751	0.9502	0.0022777
CIBE-223	5	1.842	0.3684	0.0004663

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.8462281	1	0.8462281	616.7843294	7.38812E-09	5.317655072
Dentro de los grupos	0.010976	8	0.001372			
Total	0.8572041	9				

ABSORBANCIA DE LA CLARIFICACIÓN DEL CIBE-223 A 45°C

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Sin clarificar	5	4.751	0.9502	0.0022777
CIBE-223	5	1.53	0.306	0.000404

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.0374841	1	1.0374841	773.7510534	3.01113E-09	5.317655072
Dentro de los grupos	0.0107268	8	0.00134085			
Total	1.0482109	9				

ABSORBANCIA DE LA CLARIFICACIÓN DE EC A 7°C

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Sin clarificar	5	4.751	0.9502	0.0022777
EC	5	1.421	0.2842	0.0001417

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.10889	1	1.10889	916.6652889	1.53741E-09	5.317655072
Dentro de los grupos	0.0096776	8	0.0012097			
Total	1.1185676	9				

ABSORBANCIA DE LA CLARIFICACIÓN DE EC A 45°C

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Sin clarificar	5	4.751	0.9502	0.0022777
EC	5	0.813	0.1626	0.0005383

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.5507844	1	1.5507844	1101.409375	7.41493E-10	5.317655072
Dentro de los grupos	0.011264	8	0.001408			
Total	1.5620484	9				

BIBLIOGRAFÍA

1. BADUI SALVADOR, Química de los alimentos, Alhambra Mexicana Pearson education, 3° Edición reimpressa, México, 2006, pág 281-306
2. FENNEMA OWE, Química de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 2° Edición Ilustrada. 1993, pág 416-495
3. SCHWIMMER SIGMUND, Source Book of Food Enzymology, AVI Publishing Company, Westport. USA, 1981
4. CONN E, STUMPF P, Bioquímica Fundamental, Editorial Limusa, Tercera edición, México DF, México, 1992, pág. 207
5. BYONG H. LEE, Fundamentos de Biotecnología de los alimentos, Editorial Acribia, Zaragoza, España. Edición ilustrada, 2000
6. WISEMAN ALAN, Biotecnología de las enzimas, Editorial Acribia, Edición ilustrada, Zaragoza, España, 1985, pág 281-316, 354-356
7. BROCK, Biology of microorganisms, Prentice Hall International Edition. 10° Edition, 2004, Madrid, España. pp 958
8. NOLLET M.L. LEO, TOLDRA FIDEL, Food Biochemistry and Food Processing, Benjamin K. Simpson Associate Editors, 2° Edition, pp 118 - 119

9. ROBERT J, WHITE H, BARRY A. LAW, Enzymes in food technology, I Sheffield Academic Press, 2002, UK, pp 148
10. VACLAVIK VICKIE A., Fundamentos de ciencias de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 2002, pág 63-73
11. GARCÍA V., YIPMANTIN A., GUZMÁN E., PUMACHAGUA R., MALDONADO H., Estudio de la cinética de biosorción de iones de plomo en pectina reticulada proveniente de cáscaras de cítricos, Rev Soc Quím Perú, 77 (3), 2011, pág. 174
12. CAMPERI S., HOURS R., AUDAY R., MIRANDA M., CASCONO O., NAVARRO A., Jugos de Frutas sin Metanol, Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy, Vol. 6, No. 33, 1996, Disponible en <http://www.cienciahoy.org.ar/ch/hoy33/jugos01.htm>
13. BELTRÁN A., FONSECA O., GUERRERO Y., “Evaluación de la aplicación de la enzima pectinasa obtenida a partir de *Aspergillus niger*, en el proceso de producción de pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* sosoria) concentrada al vacío” (Tesis, Facultad de Ingeniería de Alimentos, Universidad de la Salle), Bogotá, Colombia, 2007
14. MOYANO C., LEON J., MARCHELLI E., Jugo natural integral de manzana, Monografías tecnológicas Serie frutas y hortalizas, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Julio 1981

15. RAIGOSA B., LOPEZ O., Elaboración del jugo de manzana var. Anna clarificado y pasteurizado, Revista Universidad de Caldas, Vol. 17, No. 1-2-3, 1997, pág.114-123
16. SOMMA A., Extracción y purificación de ADN, Manual, Sesión No. 4, Organización Mundial de la Salud – Comisión Europea, Disponible en <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf>
17. RONALD M., Handbook of Microbiological Media, Second Edition. CRC Press, 1997
18. TOLBOYS P., BUSCH V., Pectic enzymes produced by *Verticillium* species, Transactions of the British Mycological Society, 2000; 55: 351-381
19. GEETHA M., SARANRAJ P., MAHALAKSHMI S., REETHA D., Screening of pectinase producing bacteria and fungi for its pectinolytic activity using fruit wastes, International Journal of Biochemistry & Biotech Science 2012, 1:30-42
20. KAPAT A., ZIMAND G., ELAD Y., Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzyme produced by *Botrytis cinerea*, Physiol. Mol. Plant Pathol., 2008; 52: 127-137

21. SINGH P., HAMID B., LONE M., RANJAN K., KHAN A., CHAURSE V., SAHAY S., Evaluation of pectinase activity from the psychrophilic fungal strain *Truncatella angustata*-BPF5 for use in wine industry, *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*, 2012, pp. 57-61
22. MILLER G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 1959, Vo. 31, No. 1, pp. 426-428
23. TORIMIRO N., OKONJI R., A comparative study of pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species, *African Journal of Biotechnology*, 2013, Vol. 12(46), pp. 6498-6503
24. ROSSO L., LOBRY J., BAJARD S., FLANDROIS J., Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth, *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61:610–616
25. CEVALLOS J. M., DEANN E., FRIEDRIH L., DNYLUK M., SIMONNE A., Growth of *Clostridium perfringens* during Cooling of Refried Beans, *Journal of Food protection*, 2012, Vol. 75, No. 10, pp 1783-1790
26. Catalog Number: 151803,198979, Pectinase, MP Biomedicals, Disponible en [http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/\(webtds2\)/198979](http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/(webtds2)/198979)
27. BALADHANDAYUTHAN S., THANGAVELU V., Optimization and Kinetics of pectinase enzyme using *Aspergillus niger* by solid-state

fermentation, Indian Journal of Science and Technology, Aug 2010, Vol 3,
N° 8, pp 867-870