

Revisión: Extracción microbiológica y enzimática de pectina

J. C. Contreras-Esquivel^{1,2}, R.A. Hours², C. N. Aguilar¹, M. L. Reyes-Vega¹ y J. Romero³

RESUMEN. A nivel mundial se producen grandes cantidades de residuos agroindustriales ricos en polisacáridos tales como las sustancias pécticas. Algunos de estos desechos se emplean en la producción de pectina. Actualmente, la pectina se extrae industrialmente por métodos físicoquímicos, pero recientemente se han desarrollado métodos biológicos alternativos. En la presente revisión se describen las principales características de las sustancias pécticas y de las enzimas pécticas. Se comenta el método tradicional de extracción por vía química de pectina para luego discutir y comparar detalladamente los métodos de extracción enzimático y microbiológico de pectina.

SUMMARY. Microbial and enzymatic extraction of pectin: A review. Great amounts of agroindustrial wastes rich in polysaccharides, such as pectic substances, are produced worldwide. Some of these wastes are used for the production of pectin. Currently, pectin is extracted at industrial scale by physicochemical means, but lately new biotechnological alternatives have been developed. In this review, the principal characteristics of pectic substances and pectic enzymes are described. The traditional physicochemical method for the pectin extraction is described and the new biotechnological (microbial and enzymatic) methods for pectin extraction are discussed and commented as well.

INTRODUCCION

Las sustancias pécticas son macromoléculas de alto peso molecular presentes en la laminilla media y en la pared celular primaria de las plantas superiores, en donde actúan como material cementante intercelular. De esta manera, las sustancias pécticas proveen rigidez y cohesión a los tejidos, ayudan en la retención de forma e imparten la textura característica de los vegetales (1).

Estas sustancias se usan industrialmente para la obtención de pectina mediante la aplicación de procesos físicoquímicos. Actualmente, el proceso de extracción consiste en un tratamiento térmico en medio ácido de ciertos subproductos sólidos generados por la industria juguera, especialmente de frutos cítricos (cáscaras) y de manzana (orujo o bagazo). Las pectinas se usan ampliamente en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética como viscosantes, espesantes, gelificantes y estabilizantes de emulsiones (2).

Las siguientes consideraciones deben tomarse en cuenta para la manufactura de pectina: (I) El proceso es relativamente complicado y normalmente consiste de numerosas operaciones. (II) La materia prima es de composición variable. (III) El capital de inversión requerido es considerable (3). Desde el punto de vista comercial, el mayor compromiso es obtener una pectina de calidad óptima y uniforme con un alto rendimiento (2,4).

La producción de pectina a escala industrial se realiza, por lo general, en siete etapas que consisten en: (I) Preparación de la materia prima; (II) Separación de algunos compuestos (azúcares, pigmentos, proteínas); (III) Conversión de la protopectina insoluble contenida en la materia prima en pectina soluble; (IV) Separación de los

residuos insolubles de la solución conteniendo pectina; (V) Precipitación de la pectina extraída; (VI) Purificación y secado de la pectina; (VII) Envasado, almacenamiento y comercialización. Existen diversas revisiones enfocadas al proceso de fabricación de pectina por vía química en las cuales se discuten en detalle los aspectos teóricos, prácticos, comerciales y tecnológicos del proceso (2-32).

Una operación clave en la obtención de pectina es la extracción (33) la cual es un proceso físicoquímico complejo en el que tiene lugar una hidrólisis restringida de ciertas uniones químicas de la molécula de protopectina y la subsecuente extracción de la pectina solubilizada. Estos procesos están condicionados por diversos factores tales como el tipo de material vegetal, el tipo y concentración del ácido utilizado, el pH, el diseño y modo de operación del reactor, el tiempo y la temperatura del proceso (34). Algunas condiciones reportadas para la extracción de pectina por vía química se presentan en la Tabla 1.

Considerando el rendimiento y la calidad del producto, el proceso físicoquímico es económicamente aceptable. Prueba de ello es que las empresas productoras de pectina lo utilizan desde hace varias décadas. Sin embargo, este método posee algunas desventajas tales como: la pectina solubilizada se despolimeriza significativamente durante el proceso (35), el material vegetal se macera durante la extracción con lo cual se dificulta su posterior filtración, los ácidos utilizados ocasionan corrosión del equipamiento (5) y los residuos generan altos índices de contaminación en virtud de su acidez y alto contenido en materia orgánica. Por estas razones, se han iniciado investigaciones con el propósito de desarrollar procesos alternativos para la extracción de la pectina por medios biotecnológicos tales como los métodos microbiológico y enzimático.

En esta revisión se incluyen primeramente la nomenclatura de las sustancias pécticas, las estructuras químicas de la protopectina y la pectina, y la clasificación de las enzimas pécticas con la finalidad de comprender mejor las interacciones enzima-sustrato. Luego, se describe y analiza detalladamente la información disponible relativa a los nuevos métodos de extracción de pectina, tanto por vía microbiológica como enzimática.

1. Departamento de Investigación en Alimentos (DIA). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila.
2. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata.
3. Departamento de Biopolímeros. Centro de Investigación en Química Aplicada. Coahuila, México.

TABLA 1
Características fisicoquímicas y condiciones de la extracción de pectinas cítricas

	Método de extracción				
	Producto comercial ⁸⁷	Fisicoquímico Producto comercial ³²	Muestra de laboratorio ⁸⁸	Microbiológico PPasa tipo A ³²	Enzimático PPasa tipo B ⁸⁹
Características fisicoquímicas					
Grupos metoxilo (%)	10.0	9.2	8.6	8.6	9.6
Grupos carboxilo esterificados (%)	65.4	63.1	63.2	73.8	79.4
Acido anhidrogálgacturónico (%)	94.5	85.0	77.4	68.2	74.1
Azúcares neutros (%)	N.R.	5.7	N.R.	23.2	N.R.
Peso molecular (kDa)	137	102	92	105	141
Viscosidad relativa de una solución al 0.1 %					
	N.R.	1.53	N.R.	1.46	1.80
pH de solución al 0.5 %					
	3.78	3.96	N.R.	3.24	N.R.
Condiciones de extracción					
Tiempo de extracción (h)	0.30-5.0 ²²		0.30	20-25	20
Temperatura de extracción (°C)	60-95 ²²		90	30	50
pH de extracción	1.5-3.0 ²²		N.R.	N.R.	4.1
g de pectina/kg de cáscara cítrica seca	N.R.		172	25	109

N.R.: No reportado

Los superíndices indican el número de la referencia de la cual se ha tomado el dato

Nomenclatura de la sustancias pécticas: Las primeras referencias sobre sustancias pécticas son confusas porque se utilizaron muchos términos diferentes para designar los materiales pécticos extraídos a partir de fuentes vegetales (18).

En 1944, la American Chemical Society (36) adoptó una «Nomenclatura Revisada de las Sustancias Pécticas», que muchos científicos aun usan como terminología y es la siguiente:

Sustancias pécticas son un grupo complejo de coloides derivados de carbohidratos los cuales se encuentran presentes en vegetales o se preparan a partir de ellos y que contienen gran proporción de unidades de ácido anhidrogálgacturónico. Los grupos carboxilos de los ácidos poligálgacturónicos pueden estar parcialmente esterificados con grupos metil éster y neutralizados parcial o completamente con una o más bases. El término protopectina se aplica a aquellas sustancias insolubles en agua, las cuales se encuentran en las plantas y, bajo hidrólisis restringida, producen ácidos pectínicos. El término, ácido pectínico es usado para definir a los ácidos poligálgacturónicos coloidales que contienen una proporción considerable de grupos metil éster. El ácido pectínico, bajo condiciones adecuadas, es capaz de formar geles con azúcar y ácido; si el contenido de metoxilo es bajo, el gel podría formarse con ciertos iones metílicos. En forma de sal se llaman pectinatos. El término general de pectina(s) designa ácidos pectínicos solubles en agua, con diferente contenido de grupos metil éster y grado de neutralización, los cuales son capaces de formar geles con ácido y azúcar bajo condiciones adecuadas. Se denomina ácido péctico a las sustancias pécticas compuestas principalmente de ácidos poligálgacturónicos coloidales y esencialmente libres de grupos metil éster. En forma de sal se llaman pectatos. Es interesante notar que esta nomenclatura no hace mención de otros constituyentes estructurales de las sustancias pécticas tales como azúcares neutros o ésteres de acetilo (37).

Estructura de la protopectina: La existencia de la protopectina se reporta desde hace 150 años. Sin embargo, su estructura química

todavía esta parcialmente dilucidada, en contraste con la estructura de la pectina, debido a las dificultades experimentales inherentes a su determinación. Joslyn (38) realizó una excelente revisión sobre la química de la protopectina hasta 1962, en donde discute las razones de su insolubilidad.

Se sabe que la protopectina es un material insoluble que está enlazado fuertemente a otros componentes constituyentes de las paredes celulares vegetales (39), jugando probablemente un papel importante en la interconexión entre ellos (40). Keegstra et al. (41) propusieron un modelo de inserción en donde se menciona que el ramnogálgacturonano se une a la red de cadenas hemicelulosa (xiloglucano) a través de ramificaciones laterales formadas por restos de azúcares neutros (Figura 1a).

Recientemente se han realizado estudios para determinar la estructura de la protopectina presente en las paredes celulares de la manzana. Para ello se emplearon técnicas químicas (42) y enzimáticas (40, 43-47) con las cuales se determinó la forma de conexión del material péctico con los otros polímeros de la pared celular. Dentro de los tratamientos químicos (ácidos y alcalinos), los álcalis diluidos son los más eficientes para solubilizar pectina de relativamente alto peso molecular.

Por otro lado, los tratamientos enzimáticos utilizaron glicosidasas solas o en combinación que incluyeron además el uso de enzimas pécticas. Las enzimas pécticas son necesarias para llevar a cabo una extracción significativa de urónidos, mientras que para liberar la mayoría de azúcares neutros se utilizaron enzimas no pécticas, tales como exo- y endo-b-(1,4)-glucanasas, endo-b-(1,4)-xilanas, endo-(1,4)-b-gálgactanasas, arabinofuranosidasas y endo-a-(1,4)-arabinasas, todas generalmente de origen fúngico.

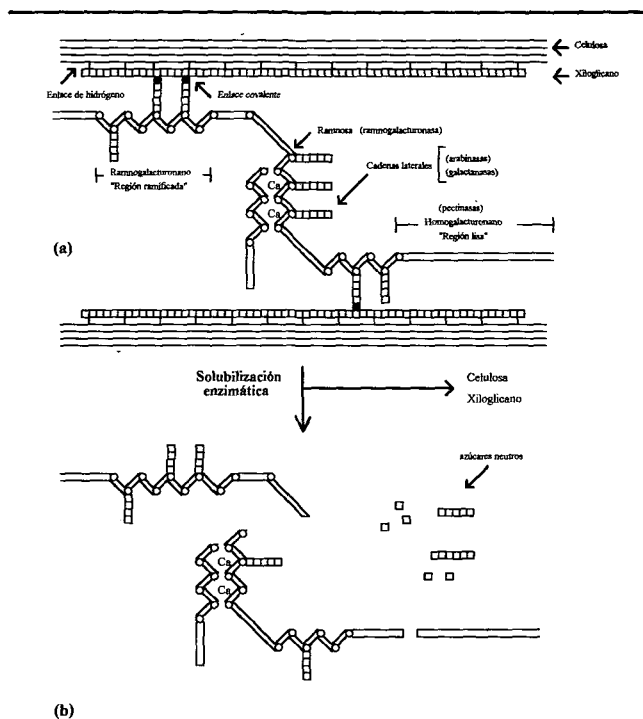
Renard et al. (40) observaron que en la extracción de pectina a partir de protopectina existe un gran sinergismo entre diversas combinaciones de enzimas pécticas y endogálgactanasas. La endogálgactanasas degrada el fucogálgactoxiloglucano de las paredes celulares de manzana; lo que permite suponer que el

ramnogalacturonano y el xiloglicano están unidos químicamente entre sí. Por eso se ha propuesto que los xiloglicanos juegan un papel importante en la conexión entre el material péctico insoluble y otros polímeros de la pared celular. Este nuevo modelo no concuerda con el propuesto por Keegstra et al. (41) donde se involucran a las cadenas laterales como conexiones directas. Esta diversidad de resultados se puede adjudicar al hecho de que las características estructurales de la pectina (48) y la protopectina dependen en gran medida del origen y del grado de madurez de los tejidos vegetales estudiados.

En la Figura 1a se muestra un modelo de inserción de las sustancias pécticas por medio de las cadenas laterales, el cual representa una posible estructura de protopectina (49-50). Aun se requieren estudios complementarios que brinden más información sobre la estructura de la protopectina de diversos materiales vegetales.

FIGURA 1

(a) Modelo de protopectina y los sitios de acción de las enzimas pécticas y no pécticas (marcadas entre paréntesis). (b) Pectina solubilizada enzimáticamente.



Estructura de la pectina: La molécula de pectina se divide estructuralmente en dos partes: la cadena principal y las cadenas laterales (35). La cadena principal está formada de unidades lineales de ácido D-galacturónico unidas mediante enlaces α -(1,4) interrumpidas por enlaces α -(1,2) de unidades de L-ramnosa. De tal forma, la cadena principal está formada por dos regiones: la región «lisa» u homogalacturonano integrada por unidades lineales de ácido D-galacturónico y la región «ramificada» o ramnogalacturonano que está interrumpida por unidades de L-ramnosa. Las cadenas laterales están formadas por restos de azúcares neutros que se encuentran unidos covalentemente al C4 de las unidades de ramnosa dentro de la región del ramnogalacturonano (48).

La distribución de las inserciones de L-ramnosa a lo largo del ramnogalacturonano no se ha elucidado completamente (22). Powell et al. (52) sugieren la presencia de las cadenas laterales y las

inserciones de L-ramnosa de manera uniforme, mientras que De Vries et al. (48) indican que la incidencia es de forma aleatoria. Por otra parte, se sabe que las cadenas laterales de la pectina consisten principalmente de unidades de D-galactosa, L-arabinosa, D-xilosa, y con menos frecuencia de D-manosa, L-fucosa y D-apiosa, todas ellas unidas a la cadena principal a través del C4 de los residuos de ramnosa (35). En la Figura 1b se muestra un modelo de la estructura química de la pectina.

Dentro de la cadena principal se encuentran algunos substituyentes no glucídicos sobre los restos de ácido galacturónico, tales como metanol, ácido acético, ácidos fenólicos, y en algunas muestras comerciales grupos amido (52). Los grupos carboxilos del ácido poligalacturónico pueden estar esterificados con metanol y algunos grupos hidroxilo en el carbono C2 y C3 de las unidades del ácido galacturónico pueden estar esterificados con ácido acético (37).

Clasificación de las enzimas pécticas: Las enzimas pécticas se clasifican de acuerdo al mecanismo de ataque sobre las sustancias pécticas en dos grupos: desesterificantes y despolimerizantes. Las enzimas despolimerizantes se clasifican de acuerdo al esquema descrito por Sakai et al. (32) usando el siguiente criterio: si la ruptura de enlaces glicosídicos es hidrolítica o transeliminativa, si el mecanismo de la reacción es de tipo exo o endo y si muestran mayor actividad sobre ácido péctico o pectina como sustratos. Las enzimas desesterificantes, a su vez, se clasifican de acuerdo al tipo de éster (metil o acetil) que hidrolizan.

La pectin metilesterasa o pectinesterasa (PE, pectin pectilhidrolasa, EC 3.1.1.11) se encuentra en la mayoría de las plantas superiores y es producida también por hongos filamentosos, bacterias y algunas levaduras. Hidroliza los grupos metil éster convirtiendo las pectinas de alto metoxilo (PAM) en pectinas de bajo metoxilo (PBM).

La pectin acetilesterasa (PAE) y la ramnogalacturonano acetilesterasa (RGAE) hidrolizan los grupos acetil éster de los restos de ácido galacturónico presentes en la región «lisa» del homogalacturonano y de la región «ramificada» del ramnogalacturonano de las sustancias pécticas, respectivamente (52).

Las poligalacturonasas (PG, poli- α -1,4-D-galacturonoido glicanohidrolasa, EC 3.2.1.15 y EC 3.2.1.67) son producidas por hongos filamentosos, levaduras, ciertas bacterias y están presentes en plantas superiores. Actúan sobre PBM o ácido péctico preferentemente, debido a que pueden hidrolizar enlaces glicosídicos adyacentes a grupos carboxilos libres. Las poligalacturonasas pueden clasificarse en aquellas que degradan sustratos por ataque al azar (endo-PG) y en aquellas que actúan sobre las terminaciones no reducidas del sustrato removiendo ácido mono o digalacturónico (exo-PG).

Las pectatoliasas (PAL, poli- α -1,4-D-galacturonoidoliasa) también se presentan como endo (EC 4.2.2.2) y exo (EC 4.2.2.9) enzimas, atacando el enlace glicosídico adyacente a los grupos carboxilo libres por un mecanismo de transeliminación. De esta forma, los sustratos de mayor preferencia para las endo-pectatoliasas son las PBM más que el ácido péctico.

Las pectinliasas (PIL, poli- α -1,4-metoxigalacturonoido liasa; EC 4.2.2.10) son producidas solamente por mohos, y atacan el enlace glicosídico entre residuos del galacturónido metoxilado por una reacción de transeliminación, por lo que las PAM resultan ser los sustratos mejor degradados (52).

Las ramnogalacturonasas (RGAs) son enzimas pécticas que

han sido descritas recientemente (53). Actúan junto con una RGAE únicamente sobre regiones de la pectina altamente ramificada, liberando oligosacáridos que consisten de secuencias alternadas de residuos L-ramnosilos con uniones α -(1,2) y D-galactosilos con uniones α -(1,4), con grupos galactosilos con uniones α -(1,4) sobre algunas de las unidades ramnosilos. La terminación no reductora siempre es una unidad de ramnosa.

Las enzimas liberadoras o solubilizadoras de pectina, también llamadas protopectinasas (PPasas) son capaces de catalizar la solubilización de protopectina liberando pectina soluble altamente polimerizada (32). En la sección sobre extracción enzimática de pectina se describen detalladamente este tipo de enzimas.

En la Figura 1a también se muestran los sitios de acción de las enzimas pécticas sobre el modelo de la protopectina.

Procesos de extracción de pectina: Según Kertesz (7) el proceso de extracción de pectina por vía química consiste principalmente de dos fases. La protopectina (material insoluble en agua encontrado en tejidos vegetales) es el precursor de la pectina (material soluble en agua). Esta conversión se realiza por despolimerización restringida de la protopectina constituyendo este proceso la primera fase de la extracción. La segunda fase consiste en la difusión de la pectina solubilizada desde la matriz del tejido vegetal hacia la solución extractante. Si el proceso de extracción se realiza por métodos físicoquímicos, una fracción de la pectina solubilizada se degrada simultáneamente al proceso de extracción en componentes de menor peso molecular cuya presencia hace que tanto el rendimiento como las propiedades del producto obtenido sean negativamente afectadas (33). Se debe recordar que las propiedades funcionales de las pectinas dependen en gran medida del grado de polimerización (o peso molecular). Consecuentemente, la extracción química disminuye en gran medida las propiedades funcionales de la pectina obtenida (35).

Se han propuesto otros modelos que tratan de explicar y predecir el fenómeno de la solubilización de pectina, los cuales consideran los aspectos relevantes que determinan la eficiencia en el proceso de extracción (33, 54-56). Para considerar este proceso es necesario evaluar experimentalmente diversos factores (temperatura, tiempo de reacción, acidez del medio extractante, características morfológicas y estructurales del material vegetal a extraer, etc.) que afectan el rendimiento y calidad de la pectina obtenida.

El proceso de extracción de pectina también puede efectuarse con solubilizantes de origen biológico tales como enzimas (PPasas), ya sea en procesos microbiológicos (fermentación) o directamente mediante el uso de enzimas solubles de origen microbiano. A continuación se analizan y discuten ampliamente estos dos tipos de procesos biotecnológicos.

Extracción de pectina por métodos microbiológicos: La extracción microbiológica de pectina se refiere principalmente a la producción de este heteropolisacárido mediante el cultivo de microorganismos productores de PPasas en medios conteniendo la materia prima. En las referencias acerca de este bioproceso (57-58) se menciona la utilización de levaduras (*Trichosporon penicillatum*, *Kluyveromyces marxianus* y *Endomycopsis capsularis*) que producen PPasas (en el caso de *T. penicillatum* se trata de una endo-PG denominada PPasa-SE) por fermentación en medio líquido, las cuales son capaces de liberar pectina altamente esterificada y aceptable peso molecular (Tabla 1) bajo hidrólisis restringida de la protopectina (Figura 1a). Sin embargo, se produce un aumento en el consumo de energía del biorreactor para poder mantener condiciones

de agitación y aireación adecuadas porque la viscosidad del medio de cultivo se incrementa a medida que se va extrayendo la pectina. Esto podría limitar el empleo de este proceso a nivel industrial a pesar de que los rendimientos en escala de laboratorio sean aceptables. Los microorganismos mencionados no producen otras enzimas pécticas que puedan modificar el contenido de sustituyentes no glucídicos (tales como PE, PAE) o el peso molecular de la pectina extraída (para el caso de PIL, PAL).

Sakai y Okushima (57) fueron los primeros en reportar la solubilización de la pectina a partir de la protopectina presente en cáscaras de frutos cítricos por un método microbiano que consiste en la extracción enzimática de pectina sin la simultánea maceración de las cáscaras. Este proceso representó la primera alternativa al método tradicional para la extracción de la pectina. Dichos autores utilizaron *Trichosporon penicillatum* SNO-3, el cual produce PPasa del tipo A1 con actividad endo-PG (Tabla 2). Este microorganismo crece sobre cáscaras cítricas como única fuente de carbono y energía. La relación apropiada de cáscara:agua es de 1:2 a 1:3. A 30 °C, la pectina comienza a aparecer después de 5 horas de cultivo y la cantidad extraída se incrementa proporcionalmente al tiempo de fermentación, necesitando de 20 a 25 horas para obtener la máxima cantidad de pectina. Las propiedades físicas y químicas de las pectinas producidas por este método son muy semejantes a las pectinas producidas comercialmente (por métodos físicoquímicos), excepto que esta pectina contiene una mayor cantidad de azúcares neutros (59) (Tabla 1). Esto es debido a que el microorganismo no produce enzimas específicas para hidrolizar a las cadenas laterales de la pectina. Sakai et al. (32, 57-59) describen detalladamente la producción de pectina por vía microbiológica.

TABLA 2
Microorganismos productores de protopectinasas (PPasas) con sus respectivas actividades enzimáticas

Microorganismo	Nombre de la enzima	Tipo de PPasa	Tipo de Actividad	Referencia
Bacterias				
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 12113	PPasa-B	A	endo-PAL	(90,97)
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134	PPasa-N	A	endo-PAL	(85)
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134	PPasa-R	A	endo-PIL	(85)
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134	PPasa-C	B	endo-Ara	(84,92)
Levaduras				
<i>Galactomyces reessii</i> L.	PPasa-L	A	endo-PG	(83)
<i>Geotrichum</i> sp.	PPasa*	A	endo-PG	(60)
<i>Kluyveromyces fragilis</i> IFO 0288	PPasa-F	A	endo-PG	(91)
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> IFO 1675	PPasa-W	A	endo-PG	(93,94)
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	PPasa*	A	endo-PG	(98)
<i>Trichosporon penicillatum</i> SN-3	PPasa-SE	A	endo-PG	(82)
<i>Trametes sanginea</i> IFO 6490	PPasa-T	B	RGasa	(89)
Hongos filamentosos				
<i>Aspergillus awamori</i> IFO 4033	PPasa-AW	N.C.	N.C.	(95,96)

PAL: pectatoliasa PIL: pectin liasa. Ara: arabinasa. PG: poligalacturonasa. RGasa: ramnogalacturonasa. N.C.: No conocida. IFO: Institute for Fermentation Osaka.

* Sin nombre específico.

Este método tiene como ventajas la disminución del grado de despolimerización, el fácil control de las condiciones (pH y temperatura), y un rendimiento aceptable, como se aprecia en la Tabla 1. Las cepas usadas para este proceso fueron *Trichosporon penicillatum*

(57), *Geotrichum* spp. (60-61) y *Kluyveromyces fragilis* (62), *K. marxianus* y *Endomycopsis capsularis* (62) todas productoras de actividad de endo-PG con propiedades solubilizantes de pectina (PPasas); y como materia prima se emplearon cáscaras de mandarina (57), de naranja (62-63) y pulpa de remolacha azucarera (60-61, 64).

Recientemente, Khodzhaeva et al. (65) implementaron un proceso de fermentación en medio sólido para la manufactura de pectina a partir de residuos provenientes de la manufactura de sacarosa de remolacha azucarera. Estos autores emplearon diferentes hongos filamentosos tales como, *Flamulina velutipes*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus ustus*, y *Penicillium notatum*.

Extracción de pectina por método enzimático: Actualmente existen algunos grupos de investigación que están estudiando el proceso de extracción de pectina por vía enzimática. Estos estudios se fundamentan en un mejor conocimiento, aunque todavía no completo, de la estructura química de la protopectina y la forma en la cual se unen químicamente los diferentes polímeros presentes tanto en la pared celular primaria como en la laminilla media del tejido vegetal. Como se muestra en la Figura 1a, la cadena principal y las cadenas laterales están unidas a otros materiales vegetales, tales como xilosa y celulosa, la cual forman en conjunto la protopectina.

La extracción enzimática de pectina se utiliza como una herramienta analítica en estudios fitoquímicos para determinar la estructura química fina de las sustancias pécticas (40, 43-47, 66-76), pero también se puede utilizar en la extracción industrial de pectina. Para la extracción de la pectina con fines comerciales se utilizan enzimas de origen microbiano, ya sea enzimas purificadas (77) o extractos crudos (78-79) provenientes de levaduras, bacterias y hongos filamentosos. Cuando se utilizan enzimas de origen fúngico es necesario llevar a cabo su purificación (al menos parcial) para evitar el efecto que la presencia de enzimas contaminantes (particularmente otras despolimerasas) pueda ocasionar al polímero. Al utilizar extractos de enzimas provenientes de bacterias o levaduras, no siempre es necesario llevar a cabo una purificación, ya que algunos de estos microorganismos no producen enzimas que puedan afectar la estructura de la pectina extraída.

Por procesos enzimáticos la pectina se libera por polisacaridasas, tales como las enzimas pécticas (endo-PG, endo-PAL y endo-PIL) y no pécticas (arabinasas, arabinofuranosidasas, galactanasas, xilanasas, glucanasas) que son capaces de actuar sobre sus respectivos sitios específicos de acción. Algunas de estas enzimas reaccionan sobre las regiones «lisas» de la protopectina y otras actúan sobre las regiones «ramificadas», mientras que hay enzimas que trabajan sobre la estructura que conecta al material péctico (Figura 1a). Estas pueden utilizarse para extraer pectina de manera individual o en combinaciones.

La extracción de pectina por vía enzimática depende de las interacciones enzima(s)-sustrato, la cual puede estar influenciada fuertemente por la microestructura de la materia prima. La protopectina se considera como un material de baja densidad (no muy compacto) y por lo tanto puede ser más penetrable por las enzimas (80), en contraste con la celulosa y la hemicelulosa. Por lo tanto, las limitaciones en este bioproceso son mínimas ya que las enzimas específicas o sistemas enzimáticos tienen un fácil acceso sobre el material vegetal. Las consideraciones principales que deben tomarse en cuenta para realizar una extracción enzimática de pectina es la estructura química del sustrato y la capacidad de la enzima o enzimas para liberar eficientemente a la pectina sin despolimerización.

Con el fin de determinar la estructura química de las sustancias pécticas, en Europa se han empleado las enzimas arabinasa y galactanasa para extraer pectinas a nivel laboratorio, usando diferentes materias primas tales como cáscaras de naranja, bagazo de manzana y pulpa de remolacha azucarera (67). Las dos enzimas mencionadas, en adición con la PIL, se han empleado para extraer pectina de paredes celulares de manzana (43). En otro estudio enzimático, Renard et al. (47) encontraron que la RGasa es una enzima capaz de liberar material rico en ácidos urónicos de alto peso molecular, en contraste con lo obtenido con otras enzimas pécticas (44). En los estudios mencionados anteriormente se han utilizado enzimas solas o combinadas para efectuar el proceso de extracción. En la Tabla 3 se muestran algunos microorganismos productores de enzimas usadas por investigadores europeos para la extracción enzimática de pectina ya sea con fines analíticos o industriales.

TABLA 3
Microorganismos productores de enzimas utilizadas en la extracción de pectina por vía enzimática

Microorganismos	Preparado	Aplicación	Fuente de protopectina	Tipo de actividad	Referencia
Bacterias					
<i>Bacillus polymixa</i>	Extracto	Industrial	• Remolacha azucarera • Calabaza	N.R.	(78)
Levaduras					
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Extracto	Industrial	• Cáscaras de naranja y limón	endo-PG	(79)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Purificado	Analítica	• Paredes celulares de manzana	endo-PG	(44)
Hongos filamentosos					
<i>Aspergillus aculeatus</i>	«	«	«	RG-asa	(47)
<i>Aspergillus niger</i>	«	«	«	Arafasa	(44)
<i>Aspergillus niger</i>	«	«	«	endo-Ara	(44)
<i>Aspergillus niger</i>	«	«	«	endo-Gal	(44)
<i>Aspergillus niger</i>	«	«	«	endo-PL	(44)
<i>Aspergillus awamori</i>	«	«	«	endo-XL	(44)
<i>Trichoderma viride</i>	«	«	«	endo-Glu	(44)

NR: no reportada. PG: poligalacturonasa. RGasa: ramnoglacturonasa. Arafasa: arabinofuranosidasa. Ara: arabinasa. Gal: galactanasa. PL: pectinlasi. XL: xilanasas. Glu: glucanasas.

Sakai et al. en Japón han utilizado PPasas para extraer pectina a nivel laboratorio e industrial. El término PPasa se aplica a las enzimas que hidrolizan o disuelven la protopectina con liberación de pectina hidrosoluble, ocasionando la separación de las células vegetales del tejido utilizado como materia prima. El primer estudio sobre enzimas que liberan pectina fue el de Sakai y Okushima (81), quienes aislaron un microorganismo que produce una enzima que solubiliza protopectina, la cual libera pectina soluble altamente polimerizada. Se han encontrado varias enzimas con actividad PPasa, las cuales han sido aisladas y clasificadas en dos tipos, dependiendo de su mecanismo de acción (82-84). Las PPasas del tipo A reaccionan sobre una región específica del homogalacturonano (región «lisa») de la protopectina liberando pectina de alto peso molecular por despolimerización restringida. Las PPasas del tipo B actúan sobre las cadenas de azúcares neutros que conectan la región del ramnogalacturonano (región «ramificada») con los constituyentes de la pared celular, liberándose por lo tanto un tipo de pectina de mayor peso molecular que en el caso de usar PPasas del tipo A (Figura 1a). La estructura postulada de la protopectina, así como los sitios y mecanismos de acción de las PPasas de los tipos A y B pueden encontrarse en Sakai (59) y Sakai et al. (32).

Las PPasas del tipo A pueden ser subclasificadas en PPasas tipo A1, con actividad hidrolizante del ácido poligalacturónico (endo-PG) y la PPasas tipo A2 que tienen actividad de transeliminadas del ácido poligalacturónico esterificado o no (endo-PIL o endo-PAL). A su vez, las PPasas tipo B presentan actividades glicosidasas, y dentro de ellas pueden distinguirse las que poseen actividad de RGasa (65) y de arabinasa (84). Otras enzimas solubilizadoras de pectina, que bien pueden ser consideradas PPasas, con actividades de galactanasas, glucanasas, arabinofuranosidasas y xilanasas podrían ser incluidas en este subgrupo a pesar de que los autores que han trabajado con ellas no lo han hecho. En la Tabla 2 se muestran algunos microorganismos productores de PPasas que se emplean para extraer pectina de diversos materiales vegetales.

Si se comparan las actividades enzimáticas de los diversos microorganismos que se presentan en la Tabla 2, se puede observar que las enzimas llamadas tentativamente PPasas poseen actividad catalítica muy semejante a la del grupo de enzimas presentadas en la Tabla 3. Por ejemplo, Sakai et al. (85) mencionan que la RGasa de *Aspergillus aculeatus* (53) muestra semejanza en su mecanismo de acción con la PPasa-T del tipo B de *Trametes sanguinea* IFO 6490 con actividad RGasa. La PPasa-T tiene un peso molecular de 55 kDa y un punto isoeléctrico a pH 8.1, estable a valores de pH entre 3 y 6 por encima de los 50 °C. El pH y la temperatura óptimas de la enzima fueron de 4,0 y entre 40-50 °C, respectivamente. Mientras que la RGasa tiene un peso molecular de 51 kDa, un pH óptimo entre 3 y 4 y una temperatura óptima de 40-50 °C. La RGasa utilizada por Renard et al. (47) aislada por Schols et al. (53) cataliza la liberación de pectina de alto peso molecular a partir de paredes celulares de manzana. Para una mejor comparación de las enzimas se requiere de más información sobre el punto isoeléctrico de la RGasa y otras características (composición de aminoácidos, inhibidores, etc.) de ambas enzimas.

Desde el punto de vista de rendimiento y calidad de la pectina extraída por vía enzimática existen diferencias en cuanto al tipo de enzima que se utiliza. De los datos disponibles está claro que las enzimas con actividad RGasa tienen un alto potencial en la extracción industrial de pectina a partir de materiales vegetales (subproductos) ricos en protopectina, ya que se obtienen pectinas de alto peso

molecular bajo condiciones suaves de temperatura y pH (Tabla 1). La PPasa-T del tipo B de *Trametes sanguinea* IFO 6490 con actividad RGasa se recomienda para la producción industrial de pectina por vía enzimática a partir de cáscaras de limón (77). Las condiciones de extracción enzimática a nivel laboratorio, así como las propiedades de la pectina obtenida se muestran en la Tabla 1. Los rendimientos obtenidos con la PPasa-T, en pruebas de laboratorios, son superiores a los de métodos microbiológicos y probablemente comparables a los de métodos químicos. Con respecto a sus características fisicoquímicas, las pectinas son comparables a las obtenidas con el método comercial.

La extracción de pectina de diferentes materiales vegetales ricos en protopectina depende del tipo de PPasas (PPasa-C,-N,-R,-S,-T) empleadas y la interacción con el material vegetal. Esto es un ejemplo de la catálisis heterogénea, en donde las constantes cinéticas y termodinámicas de las reacciones son características y diferentes de las de aquellos sistemas homogéneos en los que se utilizan sustratos solubles (por ejemplo, la desesterificación enzimática de pectina por PE), y depende de las interacciones enzima-sustrato (86). Por las razones anteriores podemos decir que el proceso enzimático presenta importantes ventajas, tales como: es fácilmente controlable, existe bajo consumo de energía, hay facilidad en la manipulación de la materia prima ya que se evita la maceración del tejido vegetal (con lo cual la separación del material sólido agotado en pectina de la solución conteniendo pectina soluble se ve muy facilitada) y se obtienen polímeros de alto peso molecular y en general con mayor contenido en azúcares neutros. Sin embargo, la hidrólisis de la protopectina por vía enzimática es actualmente comparativamente más costosa que la vía fisicoquímica (fundamentalmente por el costo de las enzimas utilizadas) y se requiere de un tiempo mayor de extracción (56). Un abaratamiento en el precio de las enzimas utilizadas, fundamentalmente en base a la optimización en las metodologías de producción, podría hacer más competitivos a este tipo de procesos industriales. Por otra parte, el hecho de que los residuos obtenidos en procesos de extracción enzimática de pectina sean mucho menos contaminantes del medio ambiente en comparación con aquellos derivados del proceso fisicoquímico y que a su vez los sólidos obtenidos puedan ser utilizados como fuentes de fibras para alimentación animal hace que este tipo de biotecnología tenga buenas posibilidades de aplicación a nivel industrial una vez resueltos los problemas antes mencionados.

CONCLUSIONES

El conocimiento estructural de las sustancias pécticas permite el uso de enzimas específicas para liberar pectina de alto peso molecular. Sin embargo aún se requiere de más información sobre la estructura de la protopectina de diversos materiales vegetales con el fin de hacer más eficiente el proceso de extracción. De los dos métodos biológicos disponibles, el método enzimático tiene grandes perspectivas de aplicación a nivel industrial, ya que se obtienen productos de alto peso molecular, en contraste con el método microbiológico. El proceso de extracción biológico (microbiológico y enzimático), depende principalmente de las interacciones enzima-sustrato para liberar eficientemente la pectina soluble a partir de la protopectina. El desarrollo científico y tecnológico de estos bioprocesos permite nuevas alternativas de extracción aplicables en la industria de obtención de pectina.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte de la línea de investigación sobre enzimas y sustancias pécticas (DIA). El primer autor agradece a la Agencia Española de Cooperación Internacional por la beca concedida del Programa MUTIS y a la Universidad Autónoma de Coahuila, México, para la realización de estudios de Doctorado en el Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. También agradece a la Ing. M.C. Gómez-Abril por sus valiosos comentarios y a los Ing. H. Silva y J.H. Juárez.

REFERENCIAS

1. Van Buren JP. Function of pectin in plant tissue structure and firmness. En: *The Chemistry and Technology of Pectin*. RH Walter (Ed.). San Diego, Academic Press, Inc. p. 1-22. 1991.
2. Swisher HE & Swisher LH. Specialty citrus products. En: *Citrus Science and Technology*. Vol. 2. Nagy, S, PE Shaw & MK Veldhuis (Eds.). Westport, Connecticut, The AVI Publishing Company Inc. p. 290-235. 1977.
3. May, CD. Commercial sources and production of pectins. En: *Gums and Stabilizers for the Food Industry*. Vol. 5. Phillips, G.O.; PA Williams & DP Welloch (Eds.). London, Oxford University Press. p. 223-232. 1990.
4. Sudhakar DV & Maini SB. Pectins from fruit processing waste - a review. *Ind. Fd. Packer* 49:39-56, 1995.
5. Towle GA. & Christensen O. Pectin. En: *Industrial Gums*, Whistler, RL (Ed.). 2TM ed. New York, Academic Press. p. 429-461. 1973.
6. Braverman JBS. Citrus products - chemical composition and technology, New York, Interscience, 1949.
7. Kertesz ZI. *The Pectic substances*. New York, Interscience Publishers, 1951.
8. Kertesz ZI. Pectinas. En: *Enciclopedia de Tecnología Química*. Kirk R. & Othmer D. (Eds.). México. Editorial Unión Tipográfica Hispano-americana. p. 792-809. 1962.
9. Joseph GH & Hariorst CR. Engineering quality of pectins. *Food Eng* 24:87-89, 160-162, 1952.
10. Hull WQ., Lindsay CW. & Baier WE. Chemicals from oranges. *Ind Eng Chem* 45:876-890, 1953.
11. Doesburg JJ. Pectic substances in fresh and preserved fruits and vegetables. Institute for Research on Storage and Processing of Horticultural Produce. I.B.T.V. Wageningen, The Netherlands, 1965.
12. Potter RS. Extraction of pectin. *Process Biochem* 1:378-384, 1966.
13. Blumer HP. New plant for powdered pectin. *Food Manuf* 42:37-39, 1967.
14. Glicksman, M. Pectins. En: *Gum Technology in the Food Industry*. Glicksman, M (Ed.). New York, Academic Press. 1969, p. 159-190.
15. Pilnik W. & Zwikey P. Pektine. *Gordian* 70:202-204, 252-257, 302-305, 343-346, 1970.
16. Francis BJ & Bell JMK. Commercial pectin: a review. *Tropical Sci* 17:25-44, 1975.
17. Rouse AH. Pectin: distribution, significance. En: *Citrus Science and Technology*. Vol 1. Nagy, S, PE Shaw & MK Veldhuis (Eds.). Westport, Connecticut, The AVI Publishing Company Inc. p. 110-207. 1977.
18. Nelson DB., Smit CJB. & Wiles RR. Commercially important pectic substances. En: *Food Colloids*. Graham HD (Ed.) Westport, Conn, The AVI Publishing Co. p. 418-437. 1977.
19. Lawrence AA. Pectins. En: *Natural Gums for Edible Purposes*. Lawrence AA (Ed.). New Jersey, U.S.A. *Food Technology Review*. No. 36. p. 58-103. 1979.
20. Pedersen JK. Pectins. En: *Hand Book of Water-Soluble Gums*. Davidson, RL (Ed.). New York, McGraw-Hill. p. 15 -21. 1980.
21. Valet R & Schoon A. Manufacture and use of commercial pectin. *Inter Zeitschrift fur Lebensmittel Technol und Vertahvenstechnik* 34:249-251, 1983.
22. Christensen, SH. Pectins. En: *Food Hydrocolloids*. Glicksman, M (Ed.). Boca Raton, FL. CRC Press. p. 205-230. 1986.
23. Keller, J. Pectin. En: *Gum and Starch Technology*. 18th Annual Symposium. Special Report No. 53. Cornell University, Geneva Campus, New York, 1983.
24. Keller, J. Commercial important pectic substances. En: *Food Hydrocolloids*. Graham HD (Ed.). Westport, Conn, AVI Publishing. p. 418-437. 1984.
25. Sheluhina N.P, Abaeva RCh. & Aimuhamedova JB. Pectin and parameters of its production, *Isd. Ilim, Frunze, USSR*. 1987.
26. Gentshev, L.N. Advances in science and technology of apple pectin production. *Ind Obst und Gemüeverwertung* 72:43-49. 1987.
27. May CD. Industrial pectins: source, production and applications. *Carbohydr Polym* 12: 79-99. 1990.
28. Pilnik W. Pectin-a many splendoured thing. En: *Gums and Stabilizers for the Food Industry* 5. Phillips GO, DJ Wedlock & PA Williams (Eds.). Oxford, IRL Press. p. 209-235. 1990.
29. Pilgrim GW, Walter RH & Oakenfull DG. Jams, Jellies, and Preserves. En: *The Chemistry and Technology of Pectin*. Walter, R.H. (Ed.). New York, Academic Press. p. 24-25. 1991.
30. Pilnik W & Voragen AGJ. Gelling agents (pectins) from plants for the food industry. *Adv in Plant Cell Biochem Biotechnol* 1:219-270. 1992.
31. Lowers, ES. Pectin and derived acids - Manufacture properties uses. *S+FW-Journal*. 118, 655-659. 1992.
32. Sakai T, Sakamoto T., Hallert J. & Vandamme J. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. *Adv Appl Microbiol* 39:213-294, 1993.
33. Panchev IN, Kirtchev NA, & Kratchanov C. Kinetic model of pectin extraction. *Carbohydr Polym* 11:193-204, 1989.
34. Kirtchev N, Panchev I, & Kratchanov Chr. Pectin extraction in the presence of alcohols. *Carbohydr Polym* 11:257-263. 1989.
35. Hwang J, Pyun YR, & Kokini JL. Sidechains of pectins: some thoughts on their role in plant cell walls and foods. *Food Hydrocolloids* 7:39-53. 1993.
36. American Chemical Society. Report of Committee for the revision of the nomenclature of pectic substances. *Chem Eng News* 22:105-106. 1944.
37. Kravtchenko TP. Studies on the structure of industrial high methoxyl pectins. PhD. Thesis. Department of Food Science. Agricultural University of Wageningen. The Netherlands, 1992.
38. Joslyn MA. The chemistry of protopectin: a critical review of historical data and recent developments. *Adv Food Res* 11:1-107. 1962.
39. Pilnik W. & Voragen AGJ. Pectic substances and other uronides. En: *The Biochemistry of Fruits and Their Products*. Vol. 1. Hulme AC (Ed.). London, Academic Press. p. 53-87. 1970.
40. Renard CMGC, Schols HA, Voragen AGJ, Thibault JF & Pilnik W. Studies on apple protopectin. III: Characterization of the material extracted by pure polysaccharidases from apple cell wall. *Carbohydr Polym* 15:13-32. 1991.
41. Keegstra K, Talmadge KW, Bauer WD & Albersheim P. The structure of plant cell walls III: A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interactions of the macromolecular components. *Plant Physiol* 51:158-173. 1973.
42. Renard CMGC, Voragen AGJ, Searle-van Leeuwen MJF, Geraeds CGJM, Schols HA & Pilnik W. I: Extraction of insoluble pectin by chemical means. *Carbohydr Polym* 12:9-25.
43. Renard CMGC, Voragen AGJ, Thibault JF & Pilnik W. Comparison between enzymatically and chemically extracted pectins from apple cell walls. *Animal Feed Sci Technol* 32:69-75. 1991.
44. Renard CMGC, Searle van Leeuwen MJF, Voragen AGJ, Thibault JF. & Pilnik W. Studies on apple protopectin. II: Apple cell wall degradation by pure polysaccharidases and their combinations. *Carbohydr Polym* 14:295-314, 1991.
45. Renard CMGC, Voragen AGJ, Thibault JF. & Pilnik W. Studies on apple protopectin. IV: Apple xyloglucans and influence of pectin extraction treatments on their solubility. *Carbohydr Polym* 15:387-403, 1991.

46. Renard CMGC, Voragen AGJ, Thibault JF. & Pilnik W. Studies on apple protopectin. V: Structural studies on enzymatically extracted pectins. *Carbohydr Polym* 16:137-154, 1991.
47. Renard CMGC, Thibault JF, Voragen AGJ, van den Broek LAM & Pilnik W. Studies on apple protopectin. VI: Extraction of pectins from apple cell walls with rhamnogalacturonase. *Carbohydr Polym* 22:203-210, 1993.
48. De Vries JA., Voragen AGJ, Rombouts FM. & Pilnik W. Structural studies of apple pectins with pectolytic enzymes. En: *Chemistry and Function of Pectins*. ML Fishman y JJ Jen (Eds.). Washington, DC, American Chemical Society. p. 38-48, 1986.
49. John MA. & Dey PM. Postharvest changes in fruit cell wall. *Adv Food Res* 30:139-193, 1986.
50. Renard C. Etude des polysaccharides parietaux de la pomme. Extraction at caracterization par des methodes chimiques et enzymatiques. These de Doctorat, Université de Nantes, France, 1989.
51. Powell DA, Morris ER, Gidley MJ & Rees DA. Conformation and interactions of pectins. II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *J Mol Biol* 155:517-531, 1982.
52. Voragen AGJ, Pilnik W, Thibault JF, Axelos MAV & Renard CMGC. Pectins. En: *Food Polysaccharides and Their Applications*. Stephen AM (Ed.). New York, Marcel Dekker, Inc. p. 287-339, 1995.
53. Schols HA, Geraeds CCJM, Searle-van Leewen MF, Kormelink FJM & Voragen AGJ. Rhamnogalacturonase: A novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins. *Carbohydr Res* 206:105-115, 1990.
54. Kratchanov CK., Marev, Kirchev K. & Bratanoff A. Improving pectin technology: extraction using pulsating hydrodynamic action. *J Food Technol* 21:751-761, 1986.
55. Gentschev L, Kumsin K, Vladimirov G. & Grantschev D. Modellierung und Optimierung des Extraktionsvorganges von Citruspektin. *Flussiges Obst* 58:65-67, 1991.
56. Minkov S, Minchev A. & Paev K. Modeling of the hydrolysis and extraction of apple pectin. *J Food Eng* 29: 107-113, 1996.
57. Sakai T. & Okushima M.. Microbial production of pectin from citrus peel. *Appl Environ Microbiol* 39:908-912, 1980.
58. Sakai T. & Katsuragi T. Process for preparing pectin from plant tissues. *US Patent* 4,686,187, 1987.
59. Sakai T. Degradation of pectins. En: *Microbial Degradation of Natural Products*. Winkelmann (Ed). VCH Publishers, Inc. New York, pp 57-81, 1992.
60. Hallert J., van Heetvelde I., Seynaeve R. & Vandamme E. Pectin liberation from sugar-beet pulp by *Geotrichum* sp. protopectinase waste-disposal. *Ferment Technol Ind Appl* 32:190-197, 1990.
61. Ralet MC., Thibault JF, Hallert J., Vandamme E. & Van Loo J. Characteristics of pectins extracted from sugar-beet pulp by *Geotrichum penicillatum*. *Sci Aliments* 10:865-876, 1990.
62. Donaghy JA & McKay AM. The use of *Kluyveromyces fragilis* for the extraction of orange peel pectins. *J Appl Bacteriol* 76:506-510, 1994.
63. Elias, AN, Foda MS. & Attia L. Production of pectin and pigments from orange peels by using microbial enzymes. *Egypt J Food Sci* 12:159-162, 1984.
64. Ghanem KM, Elrefai AH & Elgazaerl MA. Microbial extraction of beet pulp pectin. *Res Conserv Recycl* 6:35-44, 1991.
65. Khodzhaeva MA, Turakhozhaev MT, Kristallovich EL, Abdullaev ND & Azimkhodzhaev MN. Isolation of beet pectin in solid-state fermentation. *Kim Prir Soedin* 1:3-6, 1996. (Original no consultado; compendiado en *Chem Abst* 125:245755c, 1996).
66. Konno H., Yamasami Y. & Katoh K. Enzymatic degradation of pectic substances and cell walls purified from carrot cell cultures. *Phytochemistry* 25:623-627, 1986.
67. Thibault, JF, De Dreu R, Geraeds CJ & Rombouts FM. Studies on extraction of pectins from citrus peels, apple marks and sugar beet pulps with arabinase and galactanase. *Carbohydr Polym* 9:119-131, 1988.
68. Rombouts FM & Pilnik W. Enzymes for structural analysis of plant polysaccharides. En: *Inter. Workshop on Plant Polysaccharides, Structure and Function*. Marcier, C & M Rinaudo (Ed.). France, Institute National de la Recherche Agronomique & Centre National de la Recherche Scientifique. p. 19-29, 1984.
69. Vries JA de, Rombouts FM, Voragen AGJ & Pilnik W. Enzymic degradation of apple pectin. *Carbohydr Polym* 2:25-33, 1982.
70. Rombouts, FM & Thibault JF. Enzymatic and chemical degradation and fine structure of pectins from the sugar beet pulp. *Carbohydr Res* 154:189-203, 1986.
71. Rouau X, & Thibault JF. Apple juice pectic substances. *Carbohydr Polym* 4:111-121, 1984.
72. Saulnier L & Thibault JF. Enzymic degradation of isolated pectic substances and cell wall from pulp of grape berries. *Carbohydr Polym* 7:345-356, 1987.
73. Knee M, Fielding AH, Archer SH. & Laborda F. Enzymic analysis of cell wall structure in apple fruit cortical tissue. *Phytochemistry* 14:2213-2222, 1975.
74. Voragen AGJ, Heutink R. & Pilnik W. Solubilization of apple cell walls with polysaccharide-degrading enzymes. *J Appl Biochem* 2:452-468, 1980.
75. Voragen AGJ, Schols HA, Clement AJJ, Pilnik W. Enzymic analysis of pectins. En: *Gums and Stabilizers for the Food Industry*. Vol. 2. Phillips GO, DJ Wedlock & PA Williams (Eds.). Oxford, Pergamon Press. p. 517-521, 1984.
76. Sakamoto T & Sakai T. Analysis of structure of sugar-beet pectin by enzymatic methods. *Phytochemistry* 39:821-823, 1995.
77. Sakamoto T & Sakai T. Protopectinase-T: a rhamnogalacturonase able to solubilize protopectin from sugar beet. *Carbohydr Res* 259:77-9, 1994.
78. Matora AV, Korshunova VE, Shkodina OG, Zhemerichkin DA, Ptitchkina NM & Morris ER. The application of bacterial enzymes for extraction of pectin from pumpkin and sugar beet. *Food Hydrocolloids* 9:43-46, 1995.
79. Donaghy JA & McKay AM. Pectin extraction from citrus peel by polygalacturonase produced on whey. *Bioresource Technol* 47:25-28, 1994.
80. Nakamura T., Hours RA & Sakai T. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *J Food Sci* 60:468-472, 1995.
81. Sakai T. & Okushima M. Protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric Biol Chem* 42:2427-2429, 1978.
82. Sakai T & Okushima M. Purification and crystallization of a protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric Biol Chem*. 46:667-676, 1982.
83. Sakai T. & Yoshitake S. Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme from *Galactomyces reessii*. *Agric Biol Chem* 48:1941-1950, 1984.
84. Sakai T & Sakamoto T. Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme that has potent activity on sugar beet protopectin. *Agric Biol Chem* 54:879-889, 1990.
85. Sakamoto T., Hours RA & Sakai T. Purification, characterization, and production of two pectic transeliminases with protopectin activity from *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotech Biochem* 58:353-358, 1994.
86. Sakamoto T, Hours RA & Sakai T. Enzymic pectin extraction from protopectins using microbial protopectinases. *Process Biochem* 30:403-409, 1995.
87. Smit CJB & Bryant EF. Properties of pectin fractions separated on diethylaminoethyl-cellulose columns. *J Food Sci* 32:197-199, 1967.
88. Alexander MM & Sulebele GA. Characterisation of pectins from indian citrus peels. *J Food Sci Technol* 17:180-182, 1980.
89. Sakamoto M, Shirane Y., Naribayashi I, Kimura K, Morishita N, Sakamoto T & Sakai T. Purification and characterization of a rhamnogalacturonase with protopectinase activity from *Trametes sanguinea*. *Eur J Biochem* 226:285-291, 1994.
90. Sakai, T, K Ikemoto & Y Ozaki. Purification, crystallization of a novel protopectinase from *Bacillus subtilis*. *Agric Biol Chem* 53:1213-1223, 1989.
91. Sakai T, Okushima M & Yoshitake S. Purification, crystallization and some properties of end-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric Biol Chem* 48:1951-1961, 1984.
92. Sakamoto, T, Yoshnaga J, Shogaki T. & Sakai T. Studies on

- protopectinase-C mode of action: Analysis of the chemical structure of the specific substrate in sugar beet protopectin and characterization of the enzyme activity. *Biosci Biotech Biochem* 57:1832-1837. 1993.
93. Yoshitake S, Numata T, Katsuragi T, Hours RA & Sakai T. Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. *J Ferm Bioeng* 77:370-375. 1994.
94. Sakai T, Yagyu T., Katsuragi T. & Tonomura K. Production of monoclonal antibody against protopectinase from *Kluyveromyces wickerhamii*. *J Ferm Bioeng* 67:309-311. 1994.
95. Hours RA & Sakai T. Protopectinase production in solid state culture of *Aspergillus awamori*. *Biotech Lett* 16:721-726. 1994.
96. Hours RA, Katsuragi T. & Sakai T. Growth and protopectinase production of *Aspergillus awamori* in solid-state culture at different acidities. *J Ferm Bioeng* 78:426-430, 1995.
97. Sakai T & Ozaki Y. Protopectin solubilizing enzyme that does not catalyze the degradation of polygalacturonic acid. *Agric Biol Chem* 52:1091-1093, 1988.
98. Jaticavanich, S. & Juntungjin K. Protopectin solubilizing enzyme (PPase): isolation and optimization of the PPase-producing microorganisms. *Thai J Agric Sci* 16:185-196, 1983. (Original no consultado; compendiado en *Food Sci Technol Abst* 16:6G455. 1994).

Recibido: 07-08-1996

Aceptado: 28-05-1997