

## EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PECTINA DE POMAZA DE LIMÓN CON ENDO-POLIGALACTURONASA DE *Aspergillus niger*

J.C. Contreras-Esquivel<sup>1</sup>, C.E. Voget<sup>2</sup> y C. Renad<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Apartado Postal 252 – CP 25000. Saltillo, Coahuila, **México**. <sup>2</sup>Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI). Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 115 (1900). La Plata, **Argentina**. <sup>3</sup>Recherches Cidricoles et Biotransformation des Fruits et Légumes. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). BP 35327 - 35653. Le Rheu Cedex, **France**.

**Introducción.** La pectina es un heteropolisacárido de amplia aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica. Industrialmente la pectina es extraída a través de una ruta química que emplea generalmente ácidos fuertes, altas temperaturas, y tiempos relativamente cortos de extracción. Durante el proceso de extracción de la pectina, estos ácidos generan grandes problemas de contaminación en los efluentes y además incrementan los costos de operación en planta por el empleo de material resistente a agentes corrosivos. Por otro lado, los *métodos biológicos* y *físicos* son rutas alternativas en la extracción de polisacáridos pécicos los cuales generan un índice menor de contaminación ambiental. Los métodos biológicos pueden ser subdivididos como fermentativos y enzimáticos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de una endo-poligalacturonasa (endo-PG) purificada de *A. niger* sobre la extracción de pectina a partir de pomaza de limón, y la caracterización físico – química del polisacárido extraído.

**Materiales y métodos.** Se compró una endo-PGasa de *Aspergillus niger* en Megazyme (Irlanda). Se recibió pomaza de limón proveniente de la empresa productora de jugos Citrinor (Tucumán, Argentina). Los demás reactivos utilizados fueron grado analítico.

**Extracción enzimática y química de pectina.** Se pusieron 120 ml de buffer ácido acético - acetato de sodio 50 mM (pH 4.5) en un reactor de vidrio, se agregaron 4 µl (~ 36 U; pH 4.5, 37°C) de enzima endo-PG y enseguida se agregaron 5 g de pomaza de limón (malla 50). La reacción fue conducida durante 12 h a 37°C. La extracción de pectina por método químico fue realizada de acuerdo al método propuesto por Royo-Iranzo y col.<sup>1</sup>

**Recuperación de pectinas.** Al término de la extracción el material fue filtrado a través de tela muselina y el líquido fue precipitado con dos volúmenes de etanol y luego acetona. Luego se filtró nuevamente y el coágulo fue secado a 40°C hasta peso constante.

**Purificación de pectinas.** El material sólido (~1 g) fue molido y suspendido en 100 ml de agua destilada y agitado durante toda la noche. El material luego fue precipitado con dos volúmenes de alcohol, centrifugado, suspendido en agua, congelado, y liofilizado.

**Cromatografía de permeación por gel (CPG).** La distribución de peso molecular de los polisacáridos pécicos fue determinando utilizando un sistema HPLC que involucra una bomba programable de laboratorio con control de datos y equipada con cuatro columnas Bio-Gel (300 x 7.8 mm cada una) en serie (PWXL 50, 40, 30 y 25; Tosohaas, Stuttgart, Alemania), y en combinación con una guarda columna TSK XL (40 x 6 mm) a 35°C. Fueron inyectadas soluciones (300 µL) de extractos (2-5 mg/mL) y eluidas con buffer acetato de sodio 0.4 M pH 3.8 a 0.8 mL/min. El eluido fue monitoreado continuamente a través del método automatizado del m-hidroxidifenilo (mdhf)<sup>2</sup> y orcinol<sup>3</sup> en un equipo auto- analizador Alliance Instruments (Méry/Oise, Francia).

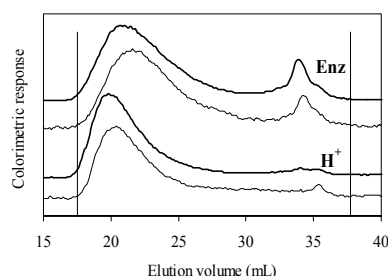
**Cromatografía de intercambio iónico (CII).** La densidad de carga de la pectina fue caracterizada a través de CII utilizando una columna de intercambio aniónico TSK DEAE 5PW (75 x 7.5 mm, Toyosoda, Japón) conectada a un equipo de HPLC. La muestra de la columna fue eluida con

buffer acetato de amonio 0.05M pH 6.0, seguido por un gradiente lineal de 0.05-0.5M de acetato de amonio pH 6.0 a 0.6 ml/min. Se aplicaron soluciones (300  $\mu$ L) de extractos (2-5 mg/mL). El eluido fue evaluado continuamente como se describió en el apartado anterior.

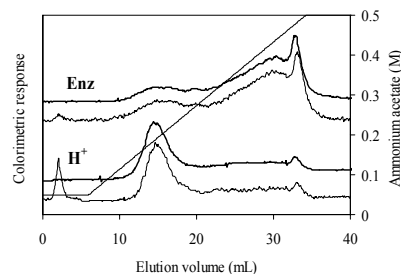
## Resultados y discusión.

**Rendimientos.** Se encontró un 0.880 g de pectina por cada 5 g de pomaza de limón por el método enzimático; esto corresponde a un 17.6% de rendimiento. Mientras que por el método químico se obtuvo un rendimiento del 20.2%. La purificación de las pectinas mostró un 76.8 y 81.7% de rendimiento para la pectina extraída químicamente y enzimáticamente, respectivamente.

**CPG y CII.** Los perfiles de CPG fueron muy similares en las dos muestras. Estas muestras de ambos biopolímeros están compuestas de polímeros de alto peso molecular; sin embargo la pectina extraída químicamente mostró un pico de menor tiempo de elución y más angosto (Figura 1). Esto indica un alto peso molecular promedio y un material menos polidisperso. El perfil obtenido por orcionl (azúcares totales) y mhdf (ácido urónicos) fueron similares en ambos casos. A pesar de la purificación de las muestras, en ambos casos, pero más en el extracto enzimático se observaron poblaciones de bajo peso molecular, correspondiente a oligómeros. Por otro lado, el perfil de CII fue muy diferente en ambas muestras (Figura 2). La pectina extraída químicamente mostró un poco principal de ácido urónicos a una baja fuerza iónica, indicativo de pectina de alto peso molecular<sup>4</sup>. Un componente neutro o fue retenido en la columna (reacción con orcionl pero no con mhdf). Sobre todo, este patrón presentó un patrón típico de CII de pectinas extraídas químicamente a partir de manzana y cítricos<sup>5</sup>. La pectina extraída enzimáticamente mostró material retenido conforme se realizó la elución de la muestra, pero en mayor proporción a elevada fuerza iónica. Esta pectina presenta un bajo grado de esterificación cual fue confirmada por la alta densidad de carga. La densidad de carga también fue muy heterogénea. Se requiere realizar un estudio de optimización de la extracción enzimática de pectina. Se realizó un estudio de desorción de la pectinesterasa (PE) de la pomaza de limón (Tirs-HCl 0.1M, NaCl 0.25M, pH 7.5, 4 h). La actividad PE fue encontrada en la pomaza de limón, esto indica que la enzima actuó en conjunto con la endo-PG durante el proceso de extracción de la pectina. Una consideración clave en la extracción enzimática de pectina es eliminar a la actividad PE de la pomaza de limón.



**Figura 1.** CPG de pectina extraída enzimáticamente y químicamente.



**Figura 2.** CII de pectina extraída enzimáticamente y químicamente.

- Referencias bibliográficas**
1. Royo-Iranzo, J.; Miralles, M.C.; Claramunt, P. (1975). *Rev. Agroquim. Technol. Alm.*, **15**, 539-546.
  2. Thibault, J.-F. (1979). *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, **12**, 246-251.
  3. Tollier, M.T.; Robin, J.P. (1979). *Ann. Technol. Agric.*, **28**, 1-15.
  4. Anger, H.; Dongowski, G. (1984). *Nahrung*, **28**, 19-26.
  5. Renard, C.M.G.C.; Voragen, A.G.J.; Thibault, J.-F.; Pilnik, W. *Carbohydr. Polym.* **12**, 9-25.