

ACTIVIDAD ENDOPOLIGALACTURONASA DE UN PREPARADO DE LA LEVADURA *Kluyveromyces marxianus* AISLADA DE LA PULPA DEL CAFÉ

Ana R. García[✉], María I. Balbín, J. C. Cabrera y Arlay Castelvi

ABSTRACT. Polygalacturonase enzymes are characterized by their depolymerizing action on the polygalacturonic acid and low methoxilation degree pectins; they can appear in higher plants or be produced by different microorganisms. The objective of the present work is to isolate and characterize the pectinolytic activity of the culture means of *Kluyveromyces marxianus* yeast obtained by coffee pulp fermentation in the University of Oriente. This preparation is characterized through determining enzymatic activities and electrophoresis analyses, also recording the presence of endopolygalacturonase activity. They settle down like favorable conditions for pectic acid degradation by the action of enzymes present in this pH 5.2 preparation at 37°C.

Key words: polygalacturonase, *Kluyveromyces marxianus*, yeast, pectins, degradation, coffee pulp

RESUMEN. Las enzimas poligalacturonasas se caracterizan por su acción depolimerizante sobre el ácido poligalacturónico y las pectinas de bajo grado de metoxilación; estas pueden aparecer en plantas superiores o ser producidas por diferentes microorganismos. El objetivo del presente trabajo es aislar y caracterizar la actividad pectinolítica del medio de cultivo de la levadura *Kluyveromyces marxianus* obtenida por la Universidad de Oriente en la fermentación de la pulpa del café. Se caracteriza este preparado a través de la determinación de actividades enzimáticas y el análisis electroforético, encontrándose la presencia de actividad endopoligalacturonasa. Se establecen como condiciones favorables para la degradación del ácido péctico por acción de las enzimas presentes en este preparado pH 5.2 y temperatura de 37°C.

Palabras clave: poligalacturonasa, *Kluyveromyces marxianus*, levadura, pectinas, degradación, pulpa de café

INTRODUCCIÓN

Las pectinas constituyen una fracción importante de los alimentos vegetales e intervienen en el desarrollo de los órganos de las plantas, desempeñando importantes funciones en la evolución de las estructuras celulares (1). Se encuentran estrechamente relacionados en la pared celular primaria y en la región intercelular de los tejidos vegetales (2). Estas sustancias son degradadas naturalmente por enzimas pécticas, las cuales pueden aparecer en plantas superiores o ser producidas por diferentes microorganismos (3, 4).

Las enzimas pécticas microbianas son determinantes en la patología vegetal (5) y los alimentos fermentados, pero son también producidas industrialmente para su utilización en la industria alimentaria (6, 7) y para el análisis de la pectina y estudios de la pared celular cuando están purificadas.

En las plantas estas enzimas producen importantes cambios estructurales en los frutos y vegetales durante

la maduración. Las enzimas poligalacturonasas se caracterizan por su acción depolimerizante sobre el ácido poligalacturónico y las pectinas de bajo grado de metoxilación (8). En correspondencia con el modo de acción de estas enzimas se clasifican en endopoligalacturonasas (endoPG) (EC 3.2.1.15) y exopoligalacturonasas (exoPG) (EC3.2.1.67).

Las endopoligalacturonasas catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos internos en las cadenas de poligalacturonatos de modo aleatorio, mientras que las exopoligalacturonasas actúan sobre el extremo no reductor del sustrato, liberando ácido monogalacturónico.

Las enzimas poligalacturonasas son producidas por una amplia variedad de organismos como hongos, bacterias, algunas levaduras, plantas superiores y algunos nemátodos parásitos de plantas; tal es el caso de las endopoligalacturonasas. Las exopoligalacturonasas, por su parte, aparecen en diferentes frutas y vegetales, y pueden ser producidas por hongos y algunas bacterias (9).

La actividad exoPG disminuye los rendimientos en oligogalacturónidos durante la hidrólisis de los poligalacturonatos y resulta difícil inhibir selectivamente la actividad de esta enzima regulando las condiciones de reacción, ya que ambas enzimas requieren de condiciones similares para degradar los poligalacturonatos.

Con respecto a la temperatura estas enzimas han sido ampliamente estudiadas en función de las condiciones de trabajo y, en sentido general, se refiere como tem-

Ms.C. Ana R. García, Profesor Instructor y Dra.C. María I. Balbín, Profesor Titular de la Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana; Dr.C. J. C. Cabrera, Investigador Agregado del Laboratorio de Oligosacarinas del Departamento de Fisiología y Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas; Arlay Castelvi, Diplomante de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

✉ regina@isch.edu.cu

peratura óptima para enzimas endoPG el intervalo comprendido entre 30 y 40°C (10). No obstante, algunos hongos como el *Rhizopus nigricans* y *Sclerotinia sclerotiorum* tienen una actividad enzimática poligalacturonasa considerablemente alta a valores de 50°C (11). Por otra parte, se destaca que las enzimas poligalacturonasas secretadas por la levadura *Saccharomyces bayanus* tienen su máxima actividad a los 45°C (12).

Las pectinasas comerciales son preparados fúngicos, principalmente de las especies *Aspergillus*, producidas por diferentes compañías (*Gist-Brocades*, *NOVOZYMES*, *Rahm*, *Biocom*, *Genencon International*, *Miles Kalichemie*, *ABM Sturge*, *Amano*, *A.T.P.*, *Shin-Nihon*).

La *NOVOZYMES* es la multinacional mayor productora de enzimas industriales del mundo. Entre estas enzimas se cuentan los preparados pectinolíticos para la despectinización durante la maceración de frutas, elaboración de zumos y vinos, etc. Existe un surtido diverso de preparados pectinolíticos industriales en función del amplio campo de aplicación de estas enzimas.

El *Pectinex Ultra Spl* es uno de estos preparados pectinolíticos que se obtiene por fermentación de cepas de *Aspergillus niger* modificadas genéticamente y que contiene una actividad PG alta, aunque aparecen en este otras enzimas pectinolíticas como pectinliasas, pectinmetilesterasas y otras carbohidrasas no pectinolíticas como celulasas y algunas hemicelulasas.

Sin embargo, se refiere que un 85-90 % de las proteínas totales secretadas por la levadura *Kluyveromyces marxianus* (CCT 312) son endoPG, no detectándose ni pectinliasas ni pectinmetilesterasas (13).

En Cuba, en la Universidad de Oriente, se informa que las enzimas pécticas obtenidas de la levadura *Kluyveromyces marxianus*, en la fermentación del café presentan un elevado porcentaje de actividad endoPG (14). Por tal motivo nos propusimos para este trabajo el objetivo de aislar y caracterizar la actividad pectinolítica del medio de cultivo de la levadura *Kluyveromyces marxianus* de producción nacional y establecer las condiciones favorables para la degradación del ácido péctico (pH, temperatura y estabilidad térmica) por la acción de las endoPG presentes en el preparado enzimático de la mencionada levadura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparado pectinolítico de levadura Kluyveromyces marxianus. Se utilizó el medio de cultivo de la levadura *Kluyveromyces marxianus* aislada de desechos de la producción cafetalera (14). Se definió este como el extracto crudo enzimático (ECE).

Los componentes de bajo peso molecular presentes en el medio de cultivo se aislaron del extracto crudo enzimático (ECE) por ultrafiltración, utilizando el *Sartocon Micro* de 5 000 Da, obteniéndose dos fracciones: el permeado (MM<5 000 Da) y el retenido (MM>5 000 Da).

Sustrato utilizado. Se preparó ácido péctico a partir de pectina SIGMA (14).

Estudio de la actividad pectinolítica. Determinación de actividades enzimáticas. La actividad endoPG se determinó viscosimétricamente utilizando como sustrato la sal sódica del ácido poligalacturónico (SIGMA) 0.5 % en solución tampón fosfato de sodio 0.02 mol.L⁻¹, pH 5.2 a una temperatura de 37°C. Los datos viscosimétricos fueron convertidos arbitrariamente a unidades de actividad relativa (16).

La actividad poligalacturonasa total (endo+exo) se determinó cuantificando los azúcares reductores liberados por la acción de la enzima sobre el sustrato (17). Las condiciones de reacción fueron las mismas que se utilizaron para el ensayo de las endoPG. Una actividad de exoPG se define como la cantidad de enzima que libera un μmol de grupos reductores por minuto.

La actividad pectato y pectin liasa se determinó cuantificando el incremento de los productos insaturados (λ=235 nm) en *buffer* fosfato de sodio 0.02 mol.L⁻¹ pH 7.5, CaCl₂ 0.004 mol.L⁻¹. Los sustratos empleados fueron el ácido péctico para la determinación de la actividad pectato liasa y la pectina SIGMA para la actividad pectin liasa. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente con una concentración de sustrato de 0.5 %. Una unidad de actividad liasa se define como la cantidad de enzima que libera un μmol de productos insaturados por minuto. *Comportamiento de la actividad poligalacturonasa en función del pH y la temperatura de reacción.* El ensayo se realizó determinando las actividades poligalacturonasas teniendo en cuenta las variables a analizar. Para el estudio del comportamiento de la actividad en función del pH se varía este desde 3.5 hasta 6.5. En el intervalo de pH comprendido en 3.5 y 4.5 se utilizó solución tampón acetato de sodio 0.02 mol.L⁻¹ y entre 5.0 y 6.5 se utilizó *buffer* fosfato de sodio 0.02 mol.L⁻¹. El ensayo para el estudio de la temperatura se realizó en un rango entre 30 y 65°C.

Estudio de la estabilidad de la actividad endopoligalacturonasa a diferentes temperaturas. Una solución de enzima diluida en *buffer* fosfato de sodio 0.02 mol.L⁻¹, pH 5.2 se incubó a 37°C y a diferentes intervalos de tiempo se extrajeron alícuotas de esta, determinándose la actividad endoPG según se define en el Epígrafe 3.3.1. De igual forma el ensayo se realizó para las temperaturas de 43, 49 y 60°C. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad residual.

Análisis electroforético de proteínas. El análisis de proteínas totales se realizó mediante el sistema *SDS-PAGE* (18). Se usó un minigel al 15 % de (8x7)cm, 1.5 mm de grosor. Se utilizó una fuente de corriente constante de 80 mA. La detección se realizó con una tinción plata (19). Se utilizaron marcadores de proteínas de diferentes masas molares para conocer la ubicación de las bandas: fosfolipasa β (94 000 Da), albúmina (67 000 Da), ovoalbúmina (43 000 Da), anhidrasa carbónica (30 000 Da),

inhibidor de tripsina (20 100 Da), α -lactoalbúmina (14 400 Da) e insulina (5 000 Da).

Análisis estadístico. Se utilizó la estadística descriptiva par la interpretación de las muestras, empleando la media (X), la desviación estándar (S) y porcentajes.

Para establecer la diferencia entre los estadígrafos se emplea la dócima de comparación de diferencia para dos medias, según la prueba de *t-Student* y la dócima de comparación de K proporciones con $K \geq 2$ según la prueba de Duncan al 5 %.

Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico *STATGRAPHICS PLUS 3.1* y el *software COMPROM 1*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las actividades correspondientes a las enzimas poligalacturonasas y liasas del ECE de la levadura *Kluyveromices marxianus*, se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Actividades liasas y poligalacturonasas del ECE de la levadura *Kluyveromices marxianus* aislada de los desechos de la producción cafetalera

Enzimas	Actividades (U.ML ⁻¹)
Endopoligalacturonasas (endoPG)	191
Poligalacturonasa total (PG total)	3
Pectinliasas	No detectada
Pectatoliasas	No detectada

En el medio de cultivo de la levadura *Kluyveromices marxianus* aparece como actividad péctica mayoritaria la poligalacturonasa y no se detectan las actividades pectin y pectatoliasas. Estos resultados son muy convenientes, porque con su empleo en la degradación del ácido péctico se evita la actividad indeseable de las enzimas liasas.

En la literatura se plantea que una gran parte de las proteínas totales secretadas por las levaduras se corresponden con enzimas poligalacturonasas, aunque puede darse la situación de que también se detecten liasas. Así por ejemplo, en estudios realizados con una levadura de la misma especie, pero extraída de la fermentación de la pulpa de cacao, refieren la ausencia de enzimas liasas y como actividad mayoritaria la poligalacturonasa (13). Sin embargo, puede encontrarse la situación de que alguna levadura pueda también secretar enzimas liasas; tal es el caso de extractos de *Kluyveromices fragilis*, que sólo después de purificar las endopoligalacturonasas es que resulta posible tener un preparado enzimático desprovisto de las actividades pectin y pectatoliasas (20).

Los preparados enzimáticos comerciales en su mayoría, están constituidos por una mezcla de enzimas entre las que se encuentran las liasas (21). Estos preparados enzimáticos comerciales generalmente provienen de hongos que al igual que las bacterias producen enzimas liasas. Por ejemplo, en la bacteria *Erwinia caratovora* estas

enzimas son determinantes en la patología vegetal (22). También la especie *Neocallimastix* de hongos anaeróbicos es capaz de secretar enzimas liasas en una gran proporción (23).

Caracterización de las fracciones obtenidas por ultrafiltración. La ultrafiltración del ECE de la levadura en estudio se utilizó como método para concentrar las proteínas presentes, aunque al eliminar los componentes de baja masa molecular correspondientes al medio de cultivo se logra también una purificación parcial de estas.

Los parámetros de control del proceso de ultrafiltración del ECE, para cada una de las fracciones obtenidas se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Caracterización de las fracciones obtenidas por ultrafiltración

	Volumen inicial (%)	Proteínas totales (mg)	Actividad específica PGtotal (U.mg ⁻¹)
Extracto crudo enzimático (ECE)	100	38.5	34.2 ± 2 b
Retenido	65	29.6	39.8 ± 3 a
Permeado	35	10.5	No detectada

Diferencias significativas para $p < 0.001$

En la fracción correspondiente al retenido, la actividad específica fue significativamente mayor con respecto al ECE, a pesar de que en esta última la cantidad de proteínas totales es mayor.

Las diferencias detectadas en las fracciones indican la posibilidad de que a través del proceso de la ultrafiltración se hayan eliminado algunos componentes del medio de cultivo, que podían estar actuando como interferentes en la técnica empleada para la determinación de proteínas, ya que con masas molares inferiores a 5000 Da solo es posible encontrar oligopéptidos o aminoácidos residuales del proceso de fermentación del microorganismo. Esto nos sugiere que, simultáneamente a la concentración, se haya logrado una purificación parcial de las proteínas presentes.

El hecho de que en el permeado no se detecte ninguna actividad pectinolítica es de suma importancia, porque a través de este resultado se comprobó la carencia de las enzimas de interés en esta fracción. Esta ausencia era de esperar luego de emplear un *Sartocon Micro* de 5 000 Da, lo que resulta un indicativo de la efectividad del proceso empleado y además se corrobora que esta fracción contiene aquellos componentes que se encontraban en el medio de cultivo cuya masa molecular no excedía el valor citado.

Por estas razones podemos plantear que el proceso de ultrafiltración resulta ventajoso, porque a través de la eliminación de los componentes de baja masa molecular del medio de cultivo se permite concentrar las enzimas y paralelamente se logra una purificación parcial de las proteínas presentes.

Un análisis más exhaustivo en relación con la composición proteica de las fracciones obtenidas por este método se desarrolla a través de la electroforesis.

En la Figura 1 se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida del ECE y las fracciones obtenidas de la ultrafiltración (retenido y permeado).

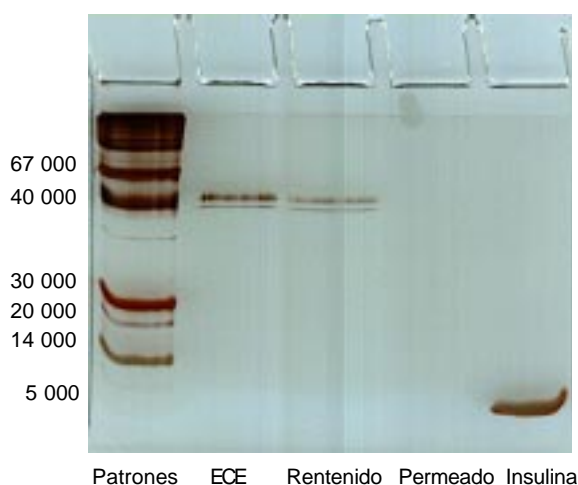


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida del ECE y las fracciones obtenidas por ultrafiltración. En todos los casos se aplicó una cantidad similar de proteínas

En la electroforesis se destacan dos bandas definidas en el valor de las masas moleculares alrededor de los 40 000 Da, para las fracciones correspondientes al ECE y al retenido respectivamente, no detectándose ninguna banda en el permeado.

Con respecto a las masas molares de estas enzimas, se plantea que es común la presencia de bandas alrededor de los 40 000 Da cuando en los preparados enzimáticos estén presentes enzimas poligalacturonasas, ya sea en preparados provenientes de hongos, bacterias o levaduras (24). Así, por ejemplo, al estudiar las enzimas secretadas por la levadura *Kluyveromyces marxianus* se obtienen bandas comprendidas entre los 39 000 y 45 000 Da que son asignadas a diferentes isoenzimas de endopoligalacturonasas, que constituyen entre un 85-90 % de las proteínas totales secretadas por esta levadura (13).

Por otra parte, las enzimas endoPG producidas por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tienen masas moleculares alrededor de los 36 000 Da (25) y en el medio de cultivo del hongo *Esclerotinia borialis* se destacan también endoPG de MM de 40 000 Da (26).

El hecho de que el patrón de electroforesis de las proteínas secretadas por la levadura *Kluyveromyces marxianus* aislada en nuestro país muestre solo algunas bandas alrededor de los 40 000 Da, además de sugerir la presencia de enzimas poligalacturonasas indica que prácticamente estas son las enzimas predominantes en el medio de cultivo.

Este aspecto resulta muy ventajoso para la hidrólisis enzimática de las pectinas por acción de las enzimas

secretadas por esta levadura, porque con su utilización la degradación estará determinada solamente por la acción de las enzimas poligalacturonasas al no detectarse otro tipo de enzimas pectinolíticas. Esta ventaja resulta aún mayor si comparamos estos resultados con el amplio espectro de proteínas presente en preparados pectinolíticos comerciales, en el que se destacan numerosas bandas de proteínas alrededor de los 25 000 y 94 000 Da correspondientes tanto a enzimas pectinolíticas como no pectinolíticas (15).

Por otra parte, la ausencia de señales en la fracción que contiene los componentes de $MM < 5\ 000$ Da ratifica que en ella no se encuentren enzimas poligalacturonasas, por lo que las proteínas detectadas pudieran ser consecuencia de algunos péptidos o aminoácidos libres que no están asociados con las enzimas de interés.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las diferentes fracciones estudiadas se decide definir el retenido como preparado enzimático de la levadura (PEL) para estudiar su actividad endoPG.

Condiciones de pH, temperatura y estabilidad térmica. El efecto del pH de la solución sobre la actividad endoPG del PEL se muestra en la Figura 2.

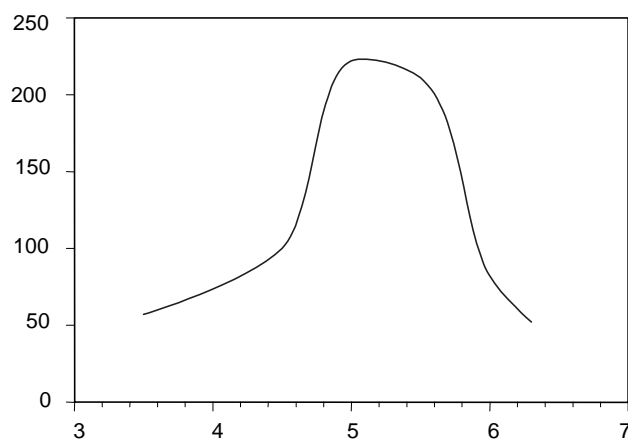


Figura 2. Variación de la actividad endoPG del PEL con el pH. Se determinó la actividad endoPG del PEL a diferentes valores de pH, utilizando la solución tampón adecuada (acetato de sodio $0.02\ \text{mol.L}^{-1}$ (pH 3.5-4.5) y fosfato de sodio $0.02\ \text{mol.L}^{-1}$ (pH 5.0-6.5) a 37°C

En el intervalo de pH estudiado la actividad endoPG comienza a aumentar hasta un máximo entre 4.9 y 5.5, a partir del cual disminuye drásticamente a medida que aumenta el pH de la solución.

Estos resultados son muy beneficiosos si tenemos en cuenta que trabajando con esos valores de pH evitamos el efecto indeseable de enzimas liasas, en caso de existir, porque ellas requieren de elevados valores (mayores de 8) y se garantiza también una adecuada solubilidad del sustrato (27).

Teniendo en cuenta estos resultados, se selecciona como intervalo de pH favorable para el trabajo con el PEL

entre 5 y 5.3, seleccionándose como pH adecuado para el trabajo con el PEL el valor de 5.2.

En relación con el pH óptimo para enzimas poligalacturonasas, se informa que el rango óptimo oscila entre 4.5-6.0 (10). Específicamente para estas enzimas secretadas por levaduras, el pH óptimo recomendado está entre 5-5.2 (13, 20).

Partiendo de esta primera condición de trabajo, se analiza la variación de la actividad endoPG del PEL a pH 5.2 con diferentes valores de temperatura y los resultados se muestran en la Figura 3, donde se observa un máximo en la actividad endoPG a temperaturas entre 55-60°C, mientras que a 65°C la enzima apenas manifiesta actividad enzimática.

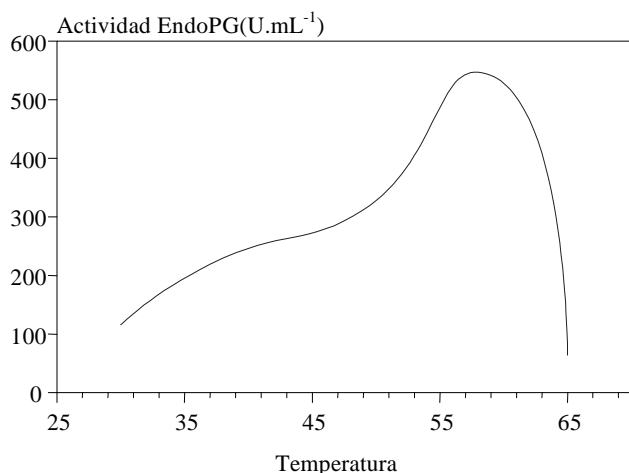


Figura 3. Variación de la actividad endoPG del PEL con la temperatura. Ensayo realizado utilizando una solución de fosfato de sodio 0.02 mol.L⁻¹, pH 5.2

Teniendo en cuenta que la máxima actividad endoPG presente en el PEL se manifiesta a valores relativamente altos de temperatura, resulta necesario comprobar la estabilidad térmica de estas enzimas en el transcurso de tiempo, con vistas a emplear este preparado enzimático en la hidrólisis del ácido péctico.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4, donde se destaca que a 60°C el proceso de inactivación de la enzima se verifica completamente a los 20 minutos; por lo tanto, aunque la actividad sea máxima a valores de temperatura que oscilan alrededor de este valor, el tiempo durante el cual la enzima es activa es bastante pequeño, lo que resulta un inconveniente.

Por otra parte, a la temperatura de incubación de 43°C el PEL muestra alrededor de un 70 % de actividad endoPG residual a los 60 minutos, disminuyendo hasta un 60 % a los 120 minutos. Sin embargo, a la temperatura de 37°C el porcentaje de actividad residual del PEL apenas manifiesta variación durante 120 minutos de incubación.

Estos resultados conllevan a un análisis del tiempo, en el cual se realiza la hidrólisis del ácido péctico para poder seleccionar una temperatura de trabajo favorable, estableciendo una relación entre estabilidad térmica y actividad enzimática en función de la temperatura.

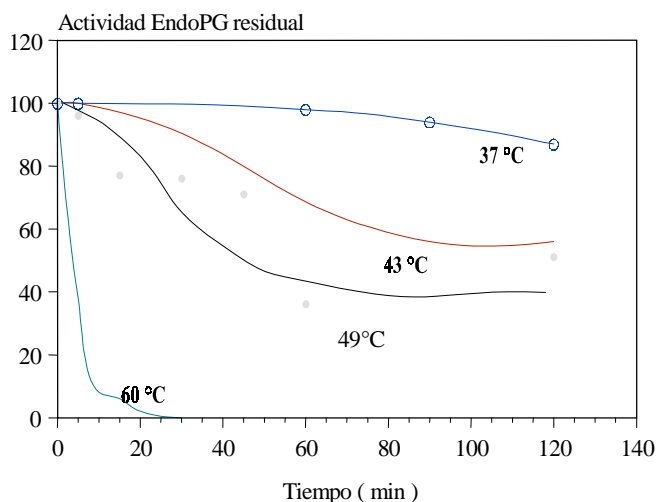


Figura 4. Variación de la actividad enzimática residual del PEL en función del tiempo de incubación, a diferentes temperaturas. Se emplea una solución del PEL diluido en buffer fosfato 0.02 mol.L⁻¹ y pH 5.2

Si tenemos en cuenta que en estudios anteriores sobre la hidrólisis del ácido péctico, para la obtención de oligogalacturónidos bioactivos, se plantea que el mayor porcentaje de estos oligogalacturónidos se obtiene alrededor de las dos horas de hidrólisis, la temperatura de 37°C resultaría la más adecuada para la hidrólisis del ácido péctico por el PEL (15). En este caso, aunque la actividad endoPG del preparado enzimático en estudio no manifieste su máximo valor, la elevada estabilidad es durante un intervalo de tiempo de dos horas. Es muy importante la consideración de que este tiempo se selecciona teniendo en cuenta una relación enzima/sustrato, de forma tal que la velocidad de hidrólisis no sea elevada y permita la reproducibilidad del método.

En función de todos los estudios relacionados con la actividad pectinolítica del PEL en cuanto a las condiciones de pH, temperatura y estabilidad térmica, se definen como condiciones favorables para la hidrólisis enzimática del ácido péctico por acción del PEL las siguientes:

- ↳ pH 5.2
- ↳ Temperatura 37°C.

REFERENCIAS

- Satoh, S. Functions of the cell wall in the interactions of plant cells: Analysis using carrot cultured cells. *Plant Cell Physiol.*, 1998, vol. 39, no. 4, p. 361-368.
- Gibeaut, D. M. y Carpita, N. C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB J.*, 1996, vol. 8, p. 904-915.
- Benen, J. A. E.; Kester, H. C. M. y Visser, J. Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *Journal of Bacteriology*, 1999, vol. 259, p. 577-585.
- Roy, C.; Kester, H. y Visser, J. Modes of action of different endopectate lyases from *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology*, 1999, vol. 181, p. 3705-3709.

5. Tenberge, K. B., Homann, V.; Oeser, B. y Tudzynski, P. Structure and expression of two polygalacturonase genes of *Cleviceps purpurea* oriented in tandem and cytological evidence for pectinolytic enzyme activity during infection of rye. *Mol. Plant Pathol.*, 1996, vol. 86, no. 10, p. 1084-1097.
6. Pretel, M. T.; Lozano, P.; Riquelme, F. y Romojaro, F. Pectic enzymes in fresh fruit processing: optimization of enzyme peeling of oranges. *Process Biochem.*, 1997, vol. 32, no. 1, p. 43-49.
7. Van der Brock, L. A. M.; Aantreker, E. O.; Voragen, A.G.J.; Beldman, G. y Vincken, J. P. Pectin lyase is a key enzyme in the maceration of potato tuber. *J. Sci. Food Agric.*, 1997, vol. 75, p. 167-172.
8. Voragen, A. G. J.; Pilnik, W.; Thibault, J.; Axelos, M. A. V. y Renard, C. M. C. Pectins. Food Polysaccharides and their Applications. (ed. A.M. Stephen). p. 287-339, 1995.
9. Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. J. y Serra, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochem.*, 1998, vol. 33, no. 1, p. 21-28.
10. Sakai, T.; Sakamoto, T.; Hallaert, J. y Vandamme, E. J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1993, vol. 39, p. 213-294.
11. Ros, J. M.; Saura, D.; Salmerón, M. C. y Laencina, J. On the responses under different thermal treatments of the thermostable endopolygalacturonase produced by *Rhizopus nigricans*. *Z. Lebensm Unters Forsch.*, 1993, vol. 196, p. 356-359.
12. Uchida, S.; Jokajama, J. P. y Watabe, S. Pectinase from *Saccharomyces bayanus*. Japan Tobacco Inc. USP 5807727, september 15, 1998.
13. Schwan, R. F.; Cooper, R. M. y Wheals, A. E. Endopolygalacturonase of the yeast *Kluyveromyces martianus* is constitutive, highly active on native pectin and is the main extracellular protein. En: Pectins and Pectinases. New York, *Elsevier Science*, 1996, 861-868.
14. Serrat, J. Informe Final de entrenamiento en el Laboratorio de oligosacarinas. Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2000.
15. Cabrera, J. C. Obtención de (1→4)- α -D-Oligogalacturónidos bioactivos a partir de subproductos de la industria citrícola. [Tesis de grado], INCA, 1999.
16. Messiaen, J. La trasducción du signal chez les végétaux supérieurs en réponse à une attaque pathogène: Identification de réponses membranaires : cytosoliques et nucléaires induites par des oligogalacturonides. [Tesis de grado]. Universidad de Namur. 1994.
17. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 1944, vol. 153, p. 375-380.
18. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, p. 680-685.
19. Garfin, D. One dimensional gel electrophoresis. Guide to protein purification. Londres: Academic Press, 1990.
20. Piet, J. H. Daas; Meyer-Hansen, K.; Schols, H. A.; De Ruiter, G. A. y Voragen, A. G.-J. Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research.*, 1999, vol. 318, p. 135-144.
21. EndreB, H. V.; Omran, H. y Giershner, K. Monitoring the course of enzymic degradation of pectic substances by automated fast ion chromatography (FIC). *Lebensm. Wiss. Technol.*, 1991, vol. 24, p. 80-85.
22. Bartling, S.; Wegener, C. y Olsen, O. Synergism between *Erwinia* pectate lyase isoenzymes that depolymerize looth pectate and pectin. *Microbiology*, 1995, vol. 141, p. 873-881.
23. Kopecný, J. y Hodrová, B. Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, vol. 20, p. 312- 316.
24. Pilnik, W. y Voragen, A. G. J. Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufacture., En: Enzymes in Food Processing. 3ed. New York. *Academic Press.*, 1993, p. 363-399.
25. Blanco, C.; Sieiro, M. y Villa, G. Production of pectic enzymes in yeast. *FEMS. Microbiology Letters*, 1999, vol. 175, p. 1-9.
26. Takasawa, S. Polygalacturonase isolated from the culture of the psychrophilic fungus *Sclerotinia borialis*. *Can J. Microbiol.*, 1997, vol. 43, no. 5, p. 417-424.
27. Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. J. y Serra, J. L. Immobilization of pectin lyase from *Penicillium italicum* by covalent binding to nylon. *Enzyme Microbial Technol.*, 1996, vol. 18, p. 141-146.

Recibido: 17 de septiembre del 2001

Aceptado: 29 de noviembre del 2001