

PRODUCCIÓN NACIONAL DE PECTINASAS DE ORIGEN FÚNGICO Y SU APLICACIÓN AL PROCESAMIENTO FRUTIHORTÍCOLA

NATIONAL PRODUCTION OF PECTINASE FROM FUNGAL ORIGIN AND ITS APPLICATION TO FRUIT AND VEGETABLE PROCESSING

María Luisa Franchi (Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente Sede Alto Valle de la Universidad Nacional de Río Negro), **Dante Fratebianchi de la Parra** (Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales [CINDEFI, CONICET La Plata, UNLP]), **Graciela Noemí Pose** (Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente Sede Alto Valle de la Universidad Nacional de Río Negro) y **Sebastián Fernando Cavalitto** (Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales [CINDEFI, CONICET La Plata, UNLP])

Resumen

En la Argentina no existe prácticamente producción de enzimas a escala industrial, en su mayoría se importan, y esto influye directamente sobre los costos de producción.

Respecto de las enzimas, las pectinasas son responsables de la degradación de la pectina, un heteropolisacárido complejo, que se encuentra en la lámina media y primaria de las paredes de las células vegetales jóvenes.

En el país hay regiones frutihortícolas de excelencia. Estas producciones generan toda una rama de industrias relacionadas, como sidreras, jugueras, bodegas, fábricas de dulces, elaboradoras vegetales, etcétera, en las cuales las pectinasas son un factor fundamental en el proceso de producción, como también su aplicación en la reutilización de las grandes cantidades de subproductos que generan durante el procesamiento.

Así, el objetivo de nuestro trabajo fue producir pectinasas nacionales de origen fúngico y evaluar su aplicación en los diferentes procesamientos frutihortícolas. En el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) se ha logrado la producción de tres poligalacturonas expresadas por *Aspergillus kawachii* (PG1), *Geotrichum klebahnii* (Protopectinasa SE) y por *Aspergillus sojae* (PGzyme), y en la Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente Sede Alto Valle de la Universidad Nacional de Río Negro (UNRN) se estudia su potencial aplicación a los diferentes procesamientos frutihortícolas, como por ejemplo la extracción de pectina, la maceración de tejidos y la clarificación de jugos y vinos.

Palabras clave: pectinasas, extracción de pectina, maceración de tejidos, productos frutihortícolas.

Abstract

In Argentina there is practically no enzyme production on an industrial scale, mostly they are imported, directly influencing production costs.

Concerning enzymes, pectinases are responsible for the degradation of pectin, a complex heteropolysaccharide, which is in the middle lamella and primary wall of the young plant cells.

The country has frutihortícolas regions of excellence. These productions generate a whole branch of related industries, such as cider, juicers, wineries, sweets, vegetable processors; where pectinases are a fundamental factor in the production process and its implementation in the reuse of the large amounts of by-products produced during processing.

Thus, the objective of our work is to produce national pectinase of fungal origin and evaluate their application to different fruit and vegetable processing. At the Research and Development Center for Industrial Fermentations (CINDEFI) has achieved the production of three polygalacturonases expressed by *Aspergillus kawachii* (PG1), *Geotrichum klebahnii* (protopectinase SE) and *Aspergillus sojae* (PGzyme), and in the School of Production, technology and Environment – Rio Negro National University (UNRN) is studied its potential application to different fruit and vegetable processing such as pectin extraction, tissue maceration and clarification of juices and wines.

Keywords: pectinases, pectin extract, tissue maceration, fruit and vegetable products.

Introducción

Las enzimas son proteínas cuya función biológica es catalizar las reacciones que suceden en las células. Estas proteínas tienen aplicaciones desde tiempo remotos y actualmente son utilizadas por numerosas industrias. La tecnología enzimática se presenta como una alternativa biotecnológica basada en el desarrollo de productos de calidad homogénea, óptimo aprovechamiento de materias primas, celeridad en procesos de producción, disminución de desperdicios y del deterioro del medio ambiente. La principal ventaja que ofrece la aplicación de las enzimas en los procesos industriales se basa en su alto grado de especificidad y adaptabilidad, volviendo los procesos más eficientes, menos costosos y más amigables con el medio ambiente.

Pectina

Entre los principales constituyentes de la pared celular de los vegetales se encuentran las sustancias pécticas, una mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados, denominadas genéricamente pectinas. Los polímeros de dichas sustancias se caracterizan por contener una alta proporción de residuos de ácido galacturónico y son, probablemente, los polisacáridos de pared de mayor complejidad estructural.

Debido a la gran complejidad química de la pectina y a su abundancia en la naturaleza, los microorganismos poseen una gran variedad de enzimas capaces de degradarla de alguna forma a fin de metabolizarla.

Enzimas pécticas

Las enzimas que degradan pectina, llamadas comúnmente pectinasas, constituyen un heterogéneo y complejo sistema catalítico. Estas enzimas rompen los polisacáridos complejos de tejidos de la planta en moléculas más simples como son los ácidos galacturónicos (Kashyap *et al.*, 2001). Las poligalacturonasas (PGasas) hidrolizan ácido poligalacturónico sin esterificar (ácido péctico o pectato) o esterificado con diferentes grados de metoxilación (Duvetter *et al.*, 2009). Algunas de estas enzimas pécticas son capaces de atacar la protopectina, la estructura insoluble presente en la pared celular del tejido vegetal, liberando al medio fragmentos de pectina de alto peso molecular, a estas se las denomina protopectinasas (PPasas) (Sakai *et al.*, 1993).

La fuente principal de producción de las pectinasas son los hongos (principalmente del género *Aspergillus*).

Estos microorganismos producen diferentes enzimas en respuesta a las diferentes condiciones de crecimiento dadas. En la Argentina no existe una importante producción de enzimas a escala industrial, son principalmente importadas.

Aplicaciones de las enzimas pécticas

Las pectinasas poseen varias aplicaciones en diversas industrias. La industria que más se ha beneficiado con ellas es la alimentaria, particularmente la industria procesadora de frutas y vegetales.

El uso más antiguo y aún hoy más difundido es, junto con otro tipo de enzimas, en la optimización de los procesos de filtración y clarificación de jugos (manzana, uva) (Kashyap *et al.*, 2001).

La acción de estas enzimas sobre protopectina permite su aplicación para la extracción de pectina de los demás componentes del tejido vegetal, para la posterior purificación del producto, el cual es un aditivo alimenticio altamente utilizado como gelificante y estabilizante (Contreras Esquivel *et al.*, 1997; Zapata Zapata *et al.*, 2008). Además, esta acción permite la maceración de los tejidos vegetales (Nakamura *et al.*, 1995; Zapata Zapata *et al.*, 2007), cuyo objetivo es producir pulpas de frutas y vegetales para ser utilizadas como ingredientes en alimentos, fundamentalmente para bebés y ancianos.

En cuanto a la extracción de pectina cabe destacar que la utilización de los métodos convencionales consiste en una hidrólisis ácida y en caliente de la materia prima; aunque lleva consigo algunos inconvenientes, como manejo de altas temperaturas y reactivos altamente corrosivos, que deterioran los equipos y generan problemas de contaminación (Sakai *et al.*, 1993). Por ello, es importante el diseño de la utilización de tratamientos alternativos, por ejemplo los enzimáticos mencionados anteriormente.

Por otra parte, se han usado diferentes técnicas de maceración, entre las cuales la maceración enzimática tiene gran importancia, ya que permite la obtención de células independientes que conservan en gran medida su integridad (Biekman, 1992). De este modo, se espera que dichas células conserven muchos de sus compuestos intracelulares, entre los cuales se cuentan carotenoides, vitaminas (C, B6, B9 y E) y compuestos fenólicos (flavonoides, cinamatos y taninos) (Aranceta, 2003). Todos estos compuestos poseen beneficios directos sobre la salud y se ha comprobado que muchos de ellos tienen una importante actividad antioxidante. Los fenómenos oxidativos pueden ocasionar rancidez en los alimentos

y pérdidas en su almacenamiento, así como daños directos a la salud humana, promoviendo diferentes tipos de enfermedades crónicas (cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, etc.), además de aceleración en los procesos normales de envejecimiento (Choksi *et al.*, 2004). Los procesos de maceración química o mecánica provocan un alto rompimiento celular, lo que implica que las propiedades nutritivas de los tejidos se ven afectadas negativamente.

Objetivos

En este marco, y considerando que el mercado de las enzimas ha tenido gran crecimiento desde los años setenta y que este ha sido paralelo con el desarrollo de un gran número de aplicaciones en la industria alimentaria, se decidió trabajar en la optimización de la producción de tres pectinasas (PGI de *Aspergillus kawachii*, PPasa SE de *Geotrichum klebahnii* y la PGzyme de *Aspergillus sojae*) obtenidas a partir del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) y demostrar el amplio potencial de aplicación que tienen en el procesamiento frutihortícola (extracción de pectina y maceración de tejidos vegetales).

Optimización de los procesos productivos

Materiales y métodos

Los cultivos en *batch* alimentado resultan mejores que los realizados en sistema *batch* debido a que en los primeros se obtienen mayores densidades de microorganismos (biomasa) y además no se produce etanol, que provoca una disminución del rendimiento. *Saccharomyces cerevisiae* presenta efecto Crabtree, es decir, a partir de ciertas velocidades de crecimiento la levadura genera etanol aunque no se encuentre limitada en O₂. Esto se evita restringiendo la velocidad de crecimiento. Los cultivos en sistema *batch* alimentado son ideales para tal fin (Rojas, 2009).

Se trabajó en el desarrollo de cultivos alimentados con diferentes perfiles de inducción como estrategia para mejorar la producción de la poligalacturonasa PGI recombinante de *A. kawachii* clonada en *S. cerevisiae*.

En este caso, se empleó un medio sintético con glucosa como fuente de carbono y energía (FCE) y urea como fuente de nitrógeno (FN).

Los ensayos se realizaron sobre un clon de *S. cerevisiae* con el vector inducible pYES2.

Luego de un período de acumulación de biomasa en *batch* alimentado con glucosa como única FCE, los cultivos se indujeron mediante la alimentación del mismo medio con el agregado de galactosa (inductor del promotor Gal1 del pYES2).

Se estudió la expresión realizando dos perfiles de alimentación cambiando la concentración de glucosa y dos perfiles de inducción cambiando la velocidad de flujo. Se alimentó con 100 g/l y con 300 g/l de glucosa a un flujo de 26 ml/h y se indujo alternativamente con 100g/l de glucosa y 50 g/l de galactosa a una velocidad de 9 ml/h y 27 ml/h, respectivamente.

La expresión de la PPasa SE de *G. klebahnii* se estudió desarrollando sistemas de cultivos de tipo *batch* alimentado y utilizando medios sintéticos con glucosa y urea como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente.

Y por último, para la evaluación de la expresión de la PGzyme de *A. sojae*, se continúa con los ensayos en medios con cáscara de naranja y sulfato de amonio como única fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente.

Todos los cultivos se realizaron a nivel de reactor en un fermentador de 1,5 l de capacidad (New Brunswick Bioflo 350, con control de O₂ disuelto y pH).

Las fermentaciones fueron monitoreadas tomando muestras del biorreactor a intervalos regulares para medir la DO600 y el pH. Además se analizó la concentración de biomasa (peso seco), el contenido de glucosa (método enzimático de glucosa oxidasa – peroxidasa; Wiener Lab., Argentina) y de galactosa (para el caso de la PGI) (método enzimático de galactosa deshidrogenasa - β -galactosidasa; Enzytec, Scil Diagnostics GmbH, Alemania) y la producción de las enzimas (medida de act. enzimática – Somogyi-Nelson) (Cavalitto *et al.*, 1999; Contreras Esquivel J. C. y Voget C. E., 2004).



Figura 1: Fermentador New Brunswick Bioflo 350, 2009, María Luisa Franchi.

Extracción de pectina

Materiales y métodos

Para estudiar la capacidad de extracción de pectina de las pectinasas de *A. kawachii*, de *G. klebahnii* y de PGzyme de *A. sojae* provistas por el CINDEFI sobre productos frutihortícolas, se compararon los rendimientos obtenidos con dichas enzimas con los obtenidos por pectinasas comerciales y por extracción química.

Como primer paso, se obtuvieron las medidas de actividad de las pectinasas en estudio (polygalacturonasa PGI por *A. kawachii*, PPasa SE por *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae*) y de las enzimas comerciales (una polygalacturonasa pura (BA) y dos *pooles* enzimáticos con alto grado de actividad polygalacturonasa (J1 y J2), utilizando el método de Somogyi-Nelson (Cavalitto *et al.*, 1999; Contreras Esquivel J. C. y Voget C. E., 2004). Esto nos permitió nivelar las actividades poligalacturonas mediante la realización de una adecuada dilución para lograr que los ensayos fueran comparables.

Se realizó el estudio de la capacidad de extracción enzimática de pectina sobre residuos de peras (Winter Bartlett) y manzanas (Granny Smith) del Alto Valle del Río Negro, previamente seleccionados (Franchi *et al.*, 2013).

La metodología aplicada fue descrita previamente por Zapata-Zapata (Zapata-Zapata *et al.*, 2008). Se realizó la mezcla de orujo (1 g) con solución buffer (1,5 ml) a pH 4 y cada enzima diluida correctamente para lograr una actividad poligalacturonasa final en la solución de 35 U (2 ml). Las muestras se agitaron en un shaker de agitación recíproca (JEIO Tech BS-11) a 150 golpes/min durante 6 h a 37 °C.

La extracción química de pectina se efectuó por hidrólisis en medio ácido, con un pH final de 1,5. La solución se dejó hervir durante 40 minutos.

A continuación, en ambos métodos, se añadió etanol a las soluciones obtenidas previamente filtradas y se secaron en horno a 40 °C hasta peso constante.

A la pectina obtenida a partir de los diferentes métodos, se le realizaron análisis para su caracterización. Esto se efectuó determinando el grado de esterificación y el contenido de ácidos urónicos. Para el grado de esterificación se utilizó un método titulométrico con el fin de determinar la cantidad de grupos carboxilos presentes en los restos de ácido galacturónico. La determinación de los ácidos urónicos posibilita cuantificar el contenido de pectina mediante el

Resultados

Los resultados obtenidos señalaron que la condición más adecuada para la producción de la poligalacturonasa PGI recombinante de *A. kawachii* fue la alimentación con 100 g/l de glucosa y un flujo de 9 ml/h en la inducción. En condiciones óptimas de inducción se obtuvieron una actividad final de 80 U/ml, una concentración final de biomasa de 7.06 g/l y una actividad específica de 8500 U/g.

Para el caso de la expresión de la PPasa SE de *G. klebahnii* se encontró, en las condiciones óptimas de trabajo, una actividad final de 180 U/ml.

Cabe aclarar que en ninguno de los tres casos se produjo la enzima pectinesterasa (EC 3.1.1.11), que puede generar problemas en el tratamiento de vegetales debido a que libera metanol de la molécula de pectina.

El estudio del mejoramiento de las condiciones de cultivo de las enzimas analizadas permitió obtener un nivel de concentración mayor que el alcanzado con los cultivos utilizados previamente.

El aporte de este trabajo en cuanto a la optimización de la producción enzimática es un primer paso para su escalado y, por ende, la posibilidad de comercialización de enzimas de producción nacional para la industria alimenticia.

empleo del método colorimétrico de m-hidroxidifenil (mhdf) y la aplicación de una curva patrón de ácido galacturónico monohidrato (0-150 mg/L).

Resultados

Los resultados demostraron que las tres enzimas implicadas en el estudio presentaron adecuadas capacidades para la extracción de pectina. En el caso particular de la enzima PGI de *Aspergillus kawachii*, resultó ser excelente para la extracción de pectina a partir del orujo de manzanas y peras del Alto Valle de Río Negro.

En todos los casos PGI extrajo mayor contenido de pectina. En cuanto a las manzanas, extrajo aproximadamente un 20 % más que la extracción química, un 50 % más que la enzima BA, y un 80 % más que las enzimas J1 y J2. Y para las peras extrajo aproximadamente un 60 % más que la enzima BA y que la extracción química, y un 80 % más que las enzimas J1 y J2.

PPasa SE extrajo en el caso de las manzanas aproximadamente un 20 % más que la enzima BA, y un 70 % más que las enzimas J1 y J2. PGzyme extrajo un 50 % más que dos de las enzimas comerciales (J1 y J2) en las manzanas. Por último, en cuanto a las peras, las dos enzimas extrajeron lo mismo que las enzimas J1 y J2.

De las tres enzimas analizadas en el estudio, se observa que PGI posee mejor capacidad para la extracción de pectina, extrayendo de las manzanas un 40 % y un 60 % más que las enzimas PPasa SE y PGzyme, respectivamente. Y en cuanto a las peras extrajo un 80 % más que ambas enzimas.

Se puede mencionar que, como era de esperar, a partir del análisis del grado de esterificación, las pectinas obtenidas en todos los casos fueron de alto metoxilo. En la industria alimenticia esta es la pectina que se utiliza mayoritariamente.

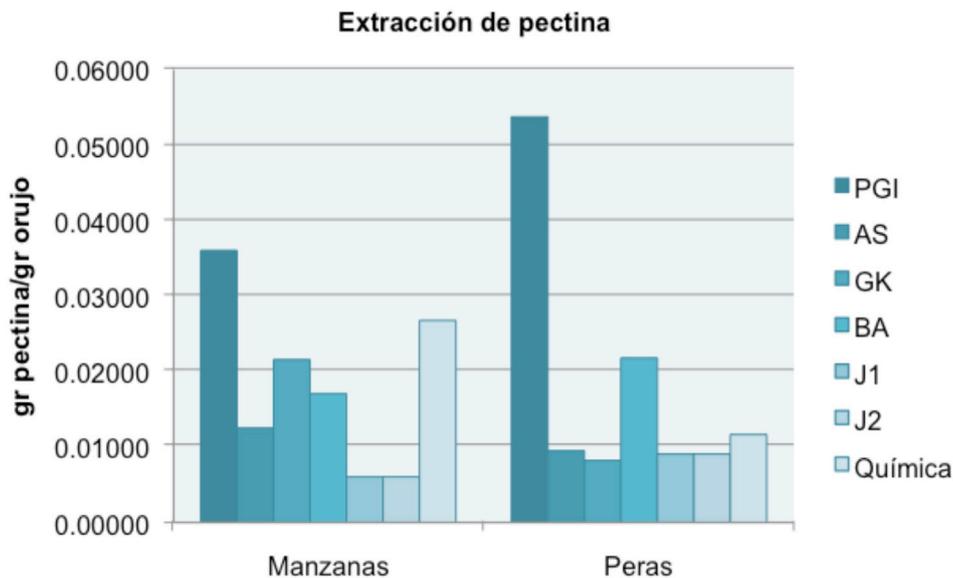


Figura 2: Extracción enzimática de pectina a partir de orujo de pera y manzana (gr pectina /gr orujo), 2013, María Luisa Franchi.

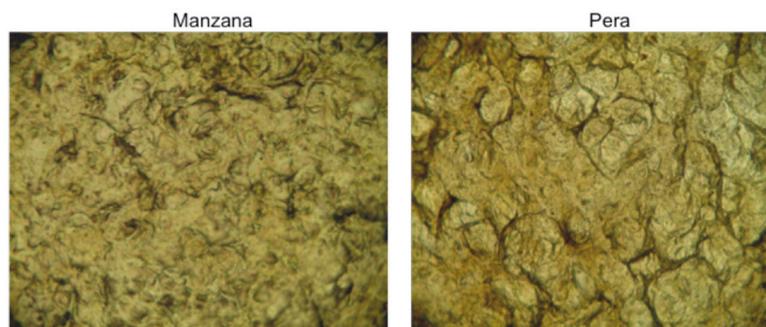


Figura 3: Fotografías de pectina seca - Observación al microscopio óptico (100x), 2013, María Luisa Franchi.

En cuanto al contenido de ácidos urónicos fue de aproximadamente del 60 % en ambas frutas para todas las enzimas en estudio.

Maceración de tejidos vegetales

Materiales y métodos

Para estudiar la capacidad macerante de las pectinasas de *A. kawachii*, de *G. klebahnii* y de PGzyme de *A. sojae* provistas por el CINDEFI sobre productos frutihortícolas, se compararon los rendimientos obtenidos con dichas enzimas con los obtenidos por pectinasas comerciales.

Como primer paso, se obtuvieron las medidas de actividad de las pectinasas en estudio (polygalacturonasa PGI por *A. kawachii*, PPasa SE por *G. klebahnii* y PGzyme de *A. sojae*) y de las enzimas comerciales (una polygalacturonasa pura (BA) y dos *pooles* enzimáticos con alto grado de actividad polygalacturonasa (J1 y J2), utilizando el método de Somogyi-Nelson (Cavalitto 1999; Contreras Esquivel 2004). Esto nos permitió nivelar las actividades poligalacturonasas mediante la realización de una adecuada dilución para lograr que los ensayos fueran comparables.

La maceración por enzimas de *A. kawachii*, de *G. klebahnii* y de PGzyme de *A. sojae* se realizó sobre tejidos de zapallos y manzanas provenientes de la producción frutihortícola regional. Estos tejidos fueron seleccionados por su potencial aplicación a la producción de alimentos funcionales para infantes y gerontes.

Los ensayos de maceración de tejidos se realizaron con la metodología de Nakamura y col. (Nakamura *et al.*, 1995). La técnica consistió en cortar 3 g de los tejidos en cilindros (Ø: 4 mm, longitud: 5 mm) con un sacabocados a los cuales se agregaron 5 mL de solución buffer y se agitaron en un shaker de agitación recíproca (JEIO Tech BS-11), a 185 golpes/minuto durante 1 h a 30° C. Posteriormente, se agregaron 5 mL de cada enzima diluida convenientemente para lograr una actividad poligalacturonasa en la solución final de 40 U y se continuó la agitación por 3 h. Luego se filtró la solución con un tamiz Tyler de malla N.º 20. El tejido no macerado (TNM) retenido en el tamiz, fue llevado a estufa a 60° C hasta peso constante. Se separaron el tejido macerado (TM) del sobrenadante (S) mediante centrifugación a 4000 rpm por 20 min. El TM y el S fueron secados en estufa a 60° C hasta peso constante (Zapata-Zapata *et al.*, 2008).

Resultados

El tejido macerado obtenido en todos los casos mostraba células intactas al microscopio. PPasa SE presentó muy buena capacidad macerante. Sin embargo, los resultados de PGI y PGzyme en cuanto al rendimiento y su comparación con las enzimas comerciales empleadas no fueron los esperados.

Para el caso de PPasa SE, se obtuvo una maceración de ambos tejidos vegetales aproximadamente 45 % mayor que con J1, 55 % mayor que con J2 y 30 % mayor que con BA.

La cantidad de tejido macerado obtenido a partir de zapallo y de manzana con las enzimas PGI y PGzyme fue inferior al obtenido con las enzimas comerciales en aproximadamente un 50 %.

De las tres enzimas analizadas en el estudio, se observa que PPasa SE posee mejor capacidad macerante, permitiendo obtener aproximadamente un 70 % más



Figura 4: Maceración enzimática de zapallo - Tejido Macerado y Sobrenadante, 2013, María Luisa Franchi.

de tejido macerado de ambos vegetales que las enzimas PGI y PGzyme.

Se prevé continuar con los ensayos de maceración empleando una mayor actividad PGasa, y se espera obtener mejores resultados.

Cabe destacar que como estos estudios forman parte de un proyecto integral, se evaluará también la actividad de las tres enzimas en la clarificación de jugos y vinos contemplando, además, en función de los resultados obtenidos, la posibilidad de escalado de la producción de las enzimas hasta nivel de reactor piloto.

Conclusión

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se concluye que es factible la producción nacional de enzimas, particularmente pectinasas, para su posterior aplicación a procesos industriales que involucren la producción frutihortícola.

Quedó demostrado que las enzimas implicadas en estos estudios se comportaron de igual o mejor forma que las comerciales que se encuentran en el mercado. Con el aporte de estas enzimas de producción nacional, se conseguiría disminuir los costos de los productores, ya que actualmente estas se consiguen a través de importaciones, lo cual se traduce en un mayor gasto productivo.

De esta manera, se lograría obtener productos de mayor valor agregado que aporten a la economía de las distintas regiones productivas del país.

Bibliografía

- Aranceta, J. (2003), "Las frutas, verduras y hortalizas en la alimentación de los españoles", *DETECOM*, Madrid [en línea]. Disponible en: <www.revista.nutricion.org/PDF/CONSUMO.pdf>.
- Biekman, E. S. A. (1992), "Enzymatic maceration of potatoes for the production of instant dried mashed potato: modelling of the disintegration process", *Food Biotechnology* 6, pp. 19-33.
- Cavalitto, S. F.; Hours, R. A. y C. F. Mignone (1999), "Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin releasing activity from *Geotrichum klebahnii*", *Biotechnol. Tech.* 13, pp. 385-390.
- Choksi, R. B.; Boylston, W. H.; Rabek, J. P.; Widger, W. R. y J. Papaconstantinou (2004), "Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes", *Biochimica et Biophysica Acta* 2, pp. 95-101.
- Contreras Esquivel, J. C.; Hours, R. A.; Aguilar, C.; Reyes Vega, M. L. y J. Romero (1997), "Revisión: Extracción microbiológica y enzimática de pectina", *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 47, pp. 208-216.
- Contreras Esquivel J. C. y C. E. Voget (2004), "Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*", *J. Biotechnol.* 110, pp. 21-28.
- Duvetter, T.; Sila, D.N.; Van Buggenhout, S.; Jolie, R.; Van Loey, A. y M. Hendrickx (2009), "Pectins in Processed Fruit and Vegetables: Part I - Stability and Catalytic Activity of Pectinases", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Volumen 8, pp. 75-85.
- Franchi, M. L.; Faría, C. M.; Marzioletti, B.; Segura, A.; Pose G. y S. Cavalitto (2013), "Evaluación del contenido de pectina en manzanas, peras y membrillos de la producción frutícola en el Alto Valle de Río Negro", *La Alimentación Latinoamericana* 305, pp. 60-63.
- Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S. y R. Tewari (2001), "Applications of pectinases in the commercial sector: a review", *Bioresource Technology* Volume 77 (3), pp. 215-227.
- Nakamura, T.; Hours, R. A. y T. Sakai (1995), "Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases", *Journal of Food Science* 60, pp. 468-472.
- Rojas, N.L. (2009), "Enzimas fúngicas extremófilas de aplicación. Biotecnológica: Producción y Caracterización de Ramnosidasas alcalofílicas de *Acremonium murorum* y *Acrostalagmus luteoalbus* y Poligalacturonasa acidofílica de *Aspergillus kawachii*", tesis doctoral para la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata [en línea]. Disponible en: <www.sedici.unlp.edu.ar>.
- Sakai, T.; Sakamoto, T.; Hallert, J. y E. J. Vandamme (1993), "Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications", *Adv. Appl. Microbiol* Volumen 39, pp. 213-294.
- Zapata Zapata, A. D.; Sainz, R. B.; Cavalitto, S. F. y R. A. Hours (2007), "Maceración de Albedo de Limón con Protopectinasa-SE de *Geotrichum klebahnii*", *Congreso Argentino de Microbiología* [en línea]. Disponible en: <www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php>.
- Zapata Zapata A. D.; Escobar, C. A.; Cavalitto, S. F. y R. A. Hours (2008), "Evaluation of pectin solubilization capability from lemon peel using protopectinase-SE", *Vitae* 16 (1), pp. 67-74.