

POLIGALACTURONASAS DE LEVADURAS: UN PRODUCTO BIOTECNOLÓGICO DE GRANDES POTENCIALIDADES

Odalys Rodríguez Gámez, Manuel Serrat Díaz
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente

*Las pectinasas microbianas son de gran interés comercial, y tienen múltiples aplicaciones en la industria de alimentos, fundamentalmente, en el procesamiento de frutas y vegetales. Actualmente, las enzimas pécticas para uso comercial se producen a partir del hongo *Aspergillus niger*. Estas preparaciones comerciales están compuestas por una mezcla compleja de diferentes enzimas con actividad pectinolítica, y otras enzimas no pécticas con efectos indeseables. En este sentido, los preparados enzimáticos de poligalacturonasas de levaduras pudieran ser una excelente alternativa. En este trabajo, se tratan algunas de las cuestiones más importantes relacionadas con las enzimas pécticas, y particularmente con las poligalacturonasas. Se aborda su producción microbiana, sus potencialidades y sus principales aplicaciones.*

Palabras clave: pectinasas, poligalacturonasas, levaduras, enzimas pectinolíticas.

*Microbial pectinases are of commercial interest and they are used in many industrial food applications, particularly in fruit and vegetable processing. Until now the main source of pectic enzymes for industrial use is the mold *Aspergillus niger*. These commercial preparations of fungal origin contain a complex mixture of different enzymes with pectinolytic activity and other non-pectic enzymes with no suitable effect. In this sense, yeast polygalacturonases could offer a good alternative to fungal enzymic preparations. This work is about some more important questions related with pectic enzymes, particularly polygalacturonases. Microbial production, potentialities and principal applications are dealt.*

Key words: pectinases, polygalacturonases, yeast, pectinolytic enzyme.

Introducción

Las enzimas producidas por los microorganismos pueden ser un producto deseado.

Cada organismo produce una gran variedad de enzimas, la mayoría de las cuales están involucradas en procesos celulares. Sin embargo, ciertas enzimas son producidas en cantidades mayores para luego ser excretadas al medio donde tienen, entre otras, la función de digerir nutrientes insolubles, tales como celulosa, almidón y pectina. /1/

Algunas de estas enzimas extracelulares se producen en grandes cantidades por síntesis microbiana para ser utilizadas en la industria de alimentos, farmacéutica y textil. Entre las enzimas de mayor aplicación industrial se encuentran las enzimas pécticas o pectinasas. /2/

Las pectinasas microbianas cuentan con el 25 % de la venta global de enzimas para alimentos /3/, y son particularmente importantes en el procesamiento de productos agrícolas.

Intervienen en los procesos de extracción, clarificación y macerado de frutas y vegetales, degradando la molécula de pectina. /4/

La pectina es un polisacárido de estructura compleja, cuya modificación o completa degradación requiere de la participación de diferentes enzimas. Entre ellas se encuentran las esterasas y las depolimerasas, estas últimas se clasifican según su mecanismo de acción en hidrolasas y liasas. /5/ Dentro de las hidrolasas se encuentran las poligalacturonasas, que son las encargadas de promover la ruptura de la molécula de pectina mediante un ataque a la cadena principal de poligalacturonano. /6,7/

Hasta el presente, la totalidad de las pectinasas que se comercializan se producen a partir de hongos, pero su producción por levaduras constituye una opción a la que se viene prestando especial atención en los últimos años, pues a pesar de que su productividad se considera baja /8/, presentan mayor velocidad de crecimiento y estructura unicelular, cualidades que le confieren importantes ventajas respecto a los hongos para

el cultivo sumergido a gran escala. Otra excelencia de las levaduras es que sólo producen endopoligalacturonasas, a diferencia de los hongos, los cuales originan una compleja mezcla de enzimas pécticas y otras carbohidrasas. /9/

Recientemente, se ha demostrado que los oligómeros de pectina con grado de polimerización entre 9 y 16, presentan actividad biológica (reguladora) en plantas, y prometen ser de gran utilidad en la agricultura /10/. También se les atribuye actividad benéfica sobre las bífidobacterias (valor prebiótico), y constituyen una importante fuente de fibras dietéticas /11/. Los prebióticos combinan los efectos estimulantes, tanto de la flora bacteriana endógena como de los probióticos (nuevos microorganismos) incorporados habitualmente en alimentos vegetales con mínimo grado de procesamiento, y representan las perspectivas de las tendencias futuras de la biotecnología alimentaria en el mercado de productos vegetales /4,12/. En la medida que se conozcan con más profundidad las propiedades de los oligogalacturónidos, el uso de preparaciones de poligalacturonasas purificadas será necesario para las producciones a gran escala en variados campos de aplicación. /7/

Por todo lo anterior, en este trabajo se describirán algunas de las principales características de las enzimas poligalacturonasas, su producción microbiana y sus aplicaciones.

Desarrollo

Sustancias pécticas. Localización y estructura de la pectina

Las sustancias pécticas constituyen un grupo de polisacáridos ricos en ácido galacturónico y, en menor medida, ramnosa, arabinosa y galactosa. Forman parte de los polisacáridos estructurales de los tejidos vegetales, los cuales constituyen hasta el 90 % de la pared celular de las plantas, y se pueden dividir en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina. /5/ La pectina se encuentra en todos los vegetales superiores en cantidades variables, y se localiza en la lámina media, la

capa intercelular aglutinante y en la pared primaria celular de las plantas. La principal función biológica de estas sustancias es de carácter estructural, y su grado de esterificación varía en función del vegetal del cual la sustancia péctica es extraída: la pectina de manzana presenta un grado de esterificación de un 80–90 % y la pectina cítrica se sitúa entre el 45–60 %. La síntesis de las sustancias pécticas ocurre durante los estadios iniciales de desarrollo de la fruta, y su concentración varía de acuerdo con el tipo y la variedad de ésta. La mayoría de las frutas, excepto los cítricos, presentan una concentración de pectina entre 0,5 y 1,0 %. /13/

Tabla 1
Contenido de pectina en algunas frutas

Frutas	Pectina (%)
Melocotón	0,1-0,9
Mango	0,6-0,7
Uva	0,2-1,0
Pera	0,5-0,8
Plátano	0,7-1,2
Manzana	0,5-1,6
Fresa	0,6-0,7
Cereza	0,2-0,5

Fuente: /3/

Estructura de la pectina

Las pectinas son heteropolisacáridos complejos, los cuales presentan dos regiones diferentes bien definidas. Las regiones “lisas” consisten en un esqueleto formado por residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces α -1,4 glicosídicos, que forman cadenas de homogalacturonano, los cuales pueden estar acetilados en el O-2 o en el O-3, o metilados en el O-6. Constituyen la fracción principal de la molécula de pectina.

Esta estructura alterna con regiones ramificadas “peludas”, en las cuales se identifican dos estructuras diferentes, un xylogalacturonano, que consiste en un esqueleto de galacturonano sustituido con D-xilosa y el ramnogalacturonano I. En el ramnogalacturonano I, los residuos de ácido D-galacturónico en el esqueleto están interrumpidos por residuos de L-ramnosa unidos por enlaces α -1,2 glicosídicos, a los cuales pueden estar atadas largas

cadenas de arabinano y galactano por el O-4. También contiene grupos acetilo esterificando los O-2 y

O-3, de los residuos de ácido galacturónico del esqueleto /5/.

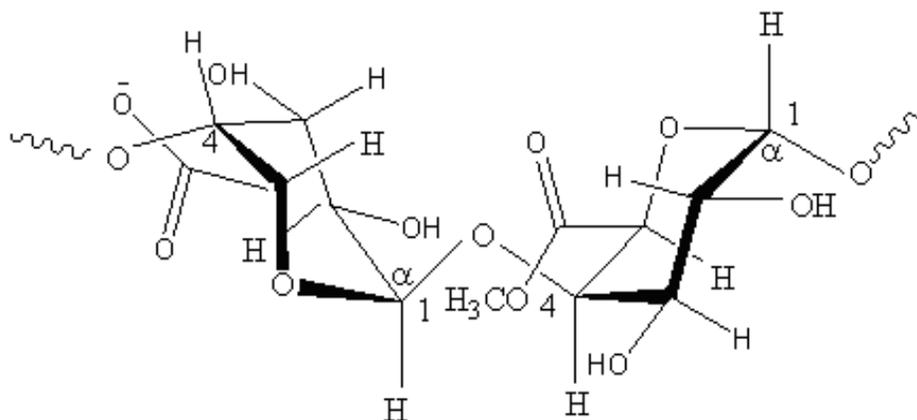


Fig. 1 Región "lisa" de la pectina.

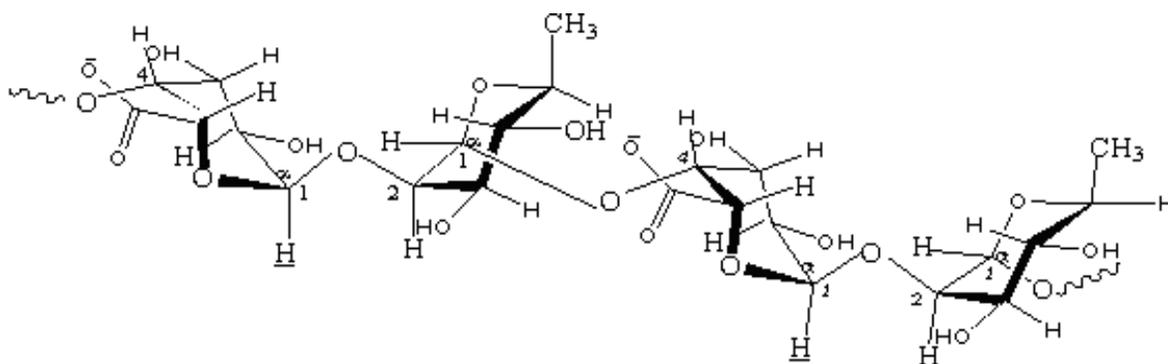


Fig. 2 Región "peluda" de la pectina.

Por su grado de polimerización y esterificación, las sustancias pécticas se clasifican en protopectinas, un precursor de las sustancias pécticas insoluble en agua y altamente esterificado y polimerizado; los ácidos pectínicos (pectinatos), se les llama así a los ácidos poligalacturónicos que tienen una pequeña porción de grupos metilo; y los ácidos

pécticos (pectatos) que son ácidos poligalacturónicos libres de grupos metilo. Atendiendo únicamente al contenido en metoxilo, se les considera pectina de alto metoxilo (HM) si el grado de esterificación es superior al 50 %; por el contrario, las pectinas de bajo metoxilo (LM) tienen un grado de esterificación igual o menor al 50 % . /14/

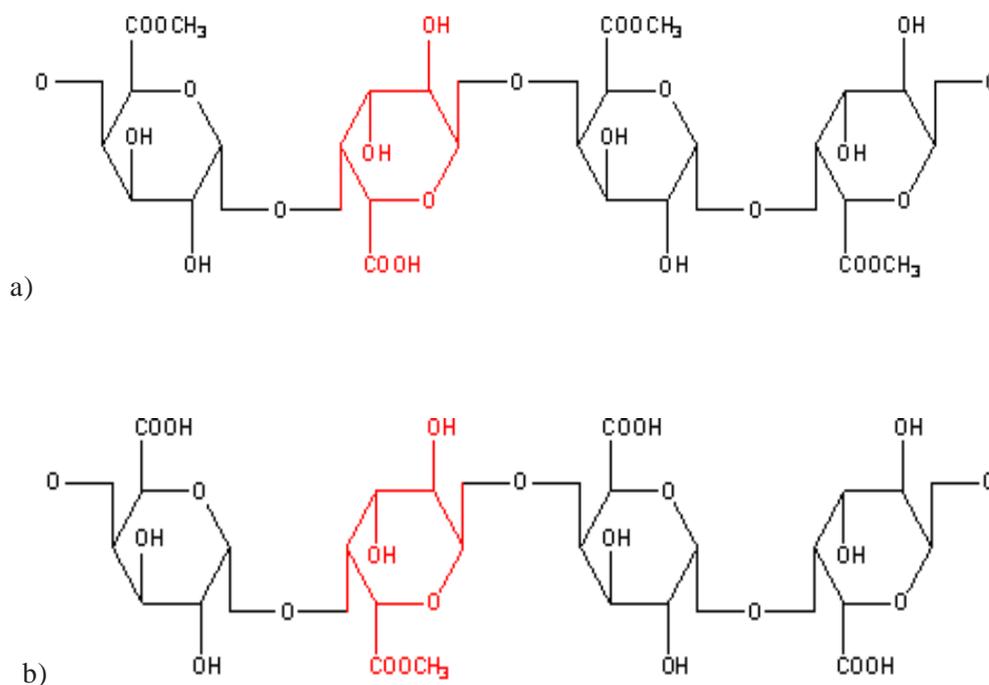


Fig. 3 Clasificación de la pectina de acuerdo con el contenido de metoxilo: a) pectina HM b) pectina LM.

Enzimas pécticas. Generalidades

Bajo esta denominación se agrupan aquellas enzimas que tienen a las sustancias pécticas como sustratos naturales. Estas enzimas desempeñan un importante rol en la maduración de los frutos, por este motivo se han desarrollado varias aplicaciones industriales de las mismas. /9/

Las diferencias estructurales entre la cadena principal de las regiones “lisas” y “peludas” de la pectina tienen implicaciones para las enzimas involucradas en la degradación de estas regiones. /5/

De acuerdo con su mecanismo de acción, pueden ser clasificadas en esterasas, depolimerasas eliminativas (liasas) y las depolimerasas hidrolíticas (poligalacturonasas). La pectina esterasa cataliza la hidrólisis de los grupos ester carboxílicos metilados de la pectina en ácido péctico y metanol. La pectina liasa corta los enlaces α -1,4 glicosídicos por un mecanismo de β -eliminación (transeliminación), formando en el galacturónido un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 en el extremo no reductor. Las endopoligalacturonasas realizan una hidrólisis randomizada del polímetro, mientras que las exopoligalacturonasas actúan secuencialmente por el extremo no reductor. /5, 15/

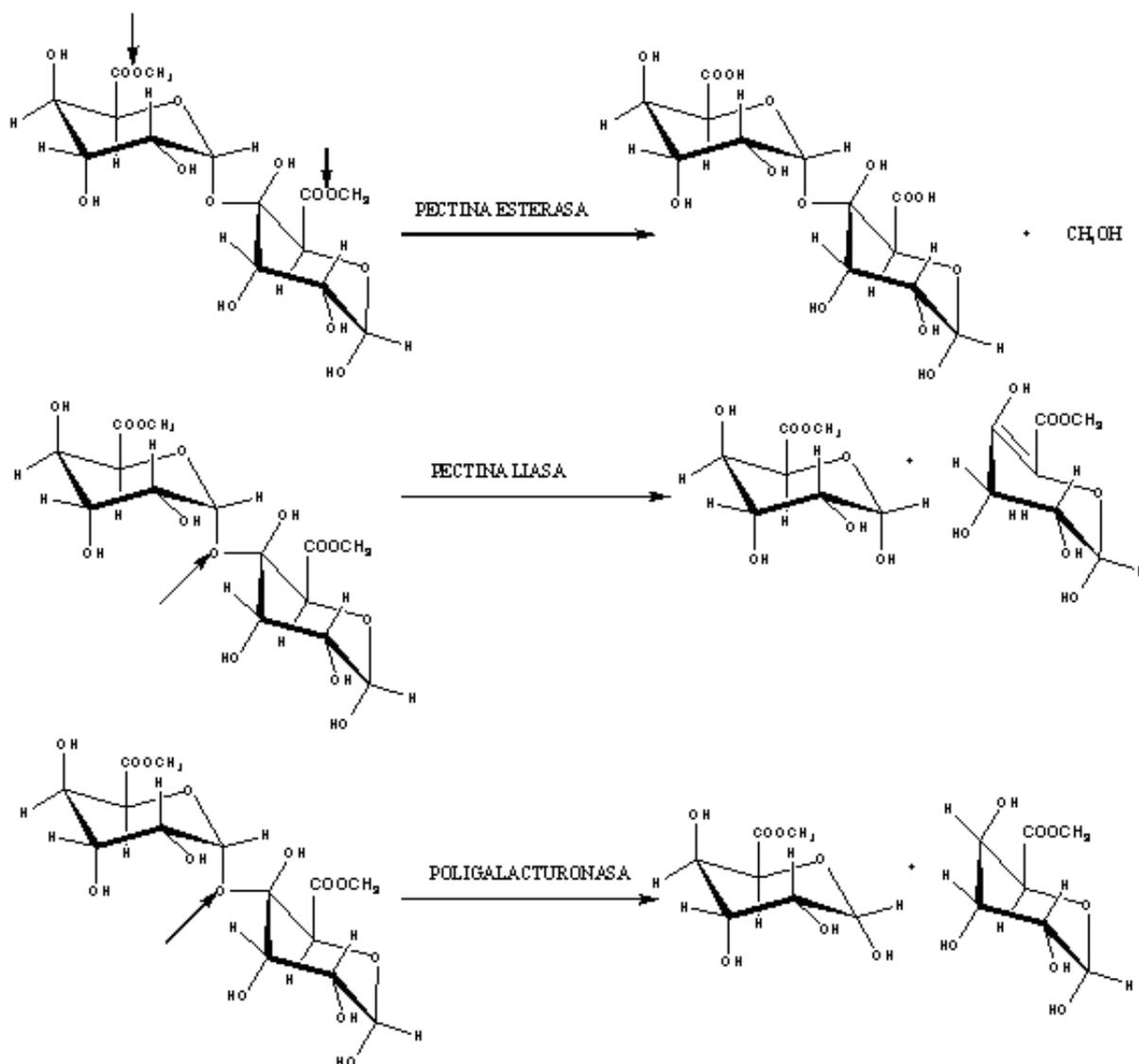


Fig. 4 Mecanismo de acción de las distintas pectinasas.

Poligalacturonasas

Los hongos saprofitos y fitopatógenos y bacterias fitopatógenas producen una gran cantidad de enzimas, capaces de degradar las complejas estructuras de carbohidratos presentes en la pared celular de las plantas. Son muchas las enzimas involucradas en el rompimiento de la pectina: pectina metil esterases, pectina y ramnogalacturonano acetil esterases, pectato, pectina y ramnogalacturonano liasas, ramnogalacturonano hidrolasas y poligalacturonasas. /16/

Las enzimas poligalacturonasas [poli(1,4- α -D-galacturonido)] glicanohidrolasa hidrolizan los enlaces α -1,4 glicosídicos entre residuos de ácido D-galacturónico adyacentes, y actúan específicamente en el homogalacturonano o en las “partes lisas” de la molécula de pectina /16/. Su ataque ocurre al azar, promoviendo una rápida disminución del peso molecular de la pectina (25-360 kDa) con una mínima liberación de extremos reductores. /2/

Son la clase más abundante y estudiada de enzimas pécticas, encontrándose ampliamente distribuidas en plantas y microorganismos.

Función biológica

Estudios realizados en hongos fitopatógenos han permitido describir los genes PG de un gran número de ellos. En la mayoría de los casos, los análisis genéticos revelan la existencia de verdaderas familias de estos genes, lo que ha permitido esclarecer algunas de sus funciones biológicas: en *Aspergillus flavus*; los genes PG se inducen en medios que contienen pectina, no ocurriendo así en presencia de glucosa. La endoPG en *Fusarium oxysporum* está también regulada a nivel transcripcional. Es inducida por tejido vascular de tomate y pectina cítrica, y se expresa también en tejidos vivos infectados. Los transcritos se han detectado también durante la patogénesis en *Colletotrichum lindemuthianum*; además, se ha observado que la activación transcripcional ocurre rápidamente cuando el hongo entra al estado parasítico. Estos hallazgos apoyan la tesis de que las endoPG participan en la penetración del hospedero por la degradación de la capa de pectina. La inducción es sólo detectada durante la infección de la planta hospedera en algunos hongos, mientras que la PG constitutiva ha sido descrita en *A. parasiticus*. /11/

En el caso de bacterias fitopatógenas como *Erwinia carotovora*, también se ha estudiado intensamente el papel de los genes PG en la patogénesis. /17,18/

A estas enzimas se les atribuyen numerosas funciones en plantas. Se considera que están

asociadas a los procesos de abscisión de órganos /19,20/, apertura de vainas y anteras /21/, maduración de los granos de polen, crecimiento del tubo polínico /22/, y a la maduración y deterioro de frutos. /23/

Se plantea que también están involucradas en los procesos de crecimiento /24/ y en los mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos. /25/

Producción de poligalacturonasas por microorganismos

Las enzimas poligalacturonasas son producidas por una amplia variedad de organismos como hongos, bacterias, algunas levaduras, plantas superiores y algunos nematodos 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. /26/ Generalmente, se encuentran presentes en consorcio con otras pectinasas, y proveen la maquinaria enzimática necesaria para degradar la compleja estructura de la pectina a carbohidratos fácilmente asimilables.

Las preparaciones comerciales de pectinasas son en su mayoría de origen fúngico, fundamentalmente, de *Aspergillus* /27/ y *Penicillium*, y se caracterizan por exhibir alta actividad de endopoligalacturonasa y de pectina liasa.

Tabla 2
Poligalacturonasas en hongos saprofitos

Organismo	PG	Características
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Endo	PGI (61kDa), PGII (42kDa), PGIII (42kDa)
<i>Aspergillus niger</i>	Endo/Exo	pgaI (35kDa), pgaII (38kDa), pgaA (370 aa), pgaB (362 aa), pgaC (383 aa), pgaD (495 aa), pgaE (378 aa)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Endo	PG (37.5 kDa)
<i>Aspergillus tubigensis</i>	Exo/Endo	PgaX (78 kDa), pgaII (362 aa)
<i>Aspergillus ustus</i>	Endo	36 kDa
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Endo	EPGI (34kDa)
<i>Neurospora crassa</i>	Endo	37 kDa
<i>Penicillium frequentans</i>	Exo (I,II,III)/ Endo (I,II,III)	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endo	PGLI (361aa, 37kDa)

aa, aminoácidos;- dato no asequible

Fuente: /11/

El hongo *Aspergillus niger* produce múltiples formas de poligalacturonasas con masas moleculares que varían entre 30 y 60 kDa. En este hongo, se ha reportado la presencia de genes que codifican para una familia de siete endopoligalacturonasas. /28/ Todos y cada uno de ellos han sido clonados, secuenciados y sobreexpresados. /16/ Las endopoligalacturonasas difieren en su actividad específica (varían desde 25-4000 U/mL), en la sensibilidad a la metilación del sustrato y en el modo de actuar. Estos hongos también producen exopoligalacturonasas, que rompen la cadena por los extremos no reductores, a

diferencia de las endopoligalacturonasas que escinden la cadena mediante un mecanismo de ataque aleatorio en la región lisa de la pectina. /5/

Entre las levaduras, la actividad pectinolítica es una cualidad relativamente rara, y está restringida a unas pocas especies de los géneros *Kluyveromyces* /29/, *Cándida*, *Deberomyces*, *Pichia*, *Sacharomyces*, entre otras /2, 30/. La mayoría de estas levaduras se han aislado de las fermentaciones del cacao, café, uvas e higos, y asociados al deterioro de algunos alimentos y frutas en conserva, /8/ y se caracterizan por producir exclusivamente endopoligalacturonasa extracelular. /31/

Tabla 3
Poligalacturonasas en levaduras

Organismo	Peso mol. (Da)	Tipo de enzima péctica	Referencia
<i>S. fragilis</i>		PG	/32/
<i>Rhodotorula sp</i>		PE, PG	/33/
<i>S. fragilis (K. fragilis)</i>	I-46000	Endo-PG	/34/
		(3 isoenzimas)	
	II-50000		
	III-30000		
<i>F. macedoniensis</i> U-480	28000	PG	/35/
<i>K. fragilis</i> IFO 0288	33000	Endo-PG	/36/
		(4 isoenzimas)	
<i>S. chevalieri</i>		Endo-PG	/37/
<i>T. candida</i>		Endo-PG	
<i>C. norvegensis</i>		Endo-PG	
<i>K. fragilis</i>		Endo-PG	
<i>C. macedoniensis</i>		Endo-PG	/38/
<i>C. albidus</i>	41000	Endo-PG	/39/
<i>K.marxianus</i> NCYC587	I-29600	Endo-PG	/40/
		(4 isoenzimas)	
	II-29800		
	III-36000		
	IV-21900		
<i>G lactis</i>	53000	Exo-PG	/41/
<i>S. cerevisiae</i> 1389	I-22000	Endo-PG	/42/
	II-31000	Endo-PG	
<i>S. cerevisiae</i> IMI-8b	36000	Endo-PG	/43/
<i>S. pastorianus</i>	43000	PG	/44/

Fuente: /8/

Potencialidades de las poligalacturonasas de levaduras

Los preparados pectinolíticos comerciales que existen en la actualidad son de origen fúngico, y

están constituidos por mezclas complejas de varias enzimas pécticas y no pécticas. La presencia en ellos de actividades indeseables se ha convertido en una limitante para muchas de sus aplicaciones. Muchas levaduras que sólo producen

poligalacturonasa como única enzima péctica, podrían erigirse en una interesante alternativa a las pectinasas de hongos. /2/ En la elaboración de preparados de pectina, que sólo requieren del concurso de actividad endopoligalacturonasa y donde la presencia de otras actividades repercute negativamente sobre el rendimiento y la pureza, es indiscutible la superioridad de preparados puros como los sintetizados por levaduras.

Por otro lado, el hecho de que algunas levaduras sean capaces de sintetizar constitutivamente enzimas poligalacturonasas /8/, constituye una ventaja desde el punto de vista productivo, ya que pueden ser obtenidas como un producto colateral de otra producción (p.e. biomasa, vino cerveza, etcétera), contribuyendo a aminorar los costes.

Otra excelencia de las levaduras es que, a pesar de que su productividad, se considera baja /8/, presentan mayor velocidad de crecimiento y estructura unicelular, cualidades que les confieren importantes ventajas respecto a los hongos para el cultivo sumergido a gran escala. /2/

Aplicaciones de las enzimas pectinolíticas

La aplicación de las enzimas pectinolíticas en los últimos años se ha extendido considerablemente. En la industria de los alimentos, para incrementar la eficiencia de procesos extractivos, estabilización de productos y perfeccionamiento del sabor; tienen además una considerable aplicación comercial en la desintegración de tejidos de plantas, particularmente, en el procesamiento de frutas y vegetales. /13/

Clarificación de jugos de frutas y vinos

La moderna tecnología de los zumos de frutas exige una degradación rápida e intensa de la pectina, responsable de las propiedades coloidales, alta viscosidad, turbidez, dificultad de filtración y miscelas voluminosas, es por ello, la gran importancia del uso de las pectinasas, debido a su capacidad de mejorar el prensado, la clarificación y la filtración de los jugos de frutas concentrados. La cantidad de energía requerida para este proceso puede disminuirse por el empleo de estas enzimas. /5/

En su mayoría, las preparaciones enzimáticas comerciales utilizadas, están derivadas del *Aspergillus ssp*, y son tradicionalmente mezclas de poligalacturonasas, pectato liasas y pectinesterasas. /7/ El tratamiento de los zumos de frutas con estos preparados resulta en la descaracterización del sabor de la fruta, puesto que al ocurrir la ruptura de la pectina y su desesterificación, ocurre la volatilización de los ésteres responsables del sabor. A esto se añade la inestabilidad del zumo por la precipitación de los derivados de la pectina desesterificada con los iones calcio presentes y la liberación de metanol. /45/

Por ello, actualmente existen procesos que utilizan un tipo específico de enzimas pectinasas, como la preparación de jugos de cítricos y naranjas, donde las endopoligalacturonasas son preferidas para mantener su turbidez y el aspecto opaco. /46/

Se ha demostrado que en las fermentaciones de vinos realizadas con poligalacturonasas de *S.cerevisiae*, los procesos de clarificación se facilitan, y el tiempo de filtración se reduce hasta un 50 % en algunos casos. /43/

Tratamiento de fibras

En la industria textil, las pectinasas han sido empleadas en la maceración y el tratamiento de fibras textiles brutas: lino (*Linum usitassimum*), cáñamo (*Cannabis sativa*) y yute (*Carchues sp*). También han sido utilizadas en la preservación de maderas, aumentando la permeabilidad de éstas a los preservantes tradicionales. /45,47/

Fermentación del té y el café

Las pectinasas son de gran utilidad para aumentar la productividad y la eficiencia en las fermentaciones naturales. Así, por ejemplo, aceleran la fermentación del te y eliminan la espuma que forman los granos debido a la destrucción de la pectina. Por otra parte, en la fermentación húmeda de las semillas de café, la adición ex profeso de preparados de pectinasa proveniente de levadura, permite reducir a aproximadamente la décima parte el tiempo de fermentación previa del café para lograr la separa-

ción final de las partículas de pericarpio aún adheridas a las semillas. /3/

Alimento animal

Pueden ser usadas conjuntamente con otras celulasas y carbohidrasas en la formulación de alimento animal para facilitar la asimilación de los nutrientes por los animales. /8/ Reducen la viscosidad del alimento, lo cual incrementa la absorción de los nutrientes, al liberarlos por la hidrólisis de las fibras no biodegradables. /48/

Otras aplicaciones

Las pectinasas son utilizadas en la elaboración de alimentos infantiles (purés y compotas) en los que se prefieren preparaciones homogéneas de poligalacturonasas, ya que permite la separación de células enteras intactas, con lo cual se preservan las vitaminas y los compuestos responsables del color y el aroma. /11/

Son utilizadas en la producción de oligogalacturónidos (oligourónidos). Los fragmentos de pectina con grado de polimerización entre 7-16 inducen la respuesta defensiva en plantas frente a patógenos, estimulan el crecimiento celular y la maduración de frutos, entre otras aplicaciones. /10, 49/

La liberación enzimática de los monosacáridos que constituyen la estructura de la pectina tienen diferentes aplicaciones dentro de la industria de los alimentos y otros campos, y estos compuestos constituyen importantes herramientas en los procesos industriales: la arabinosa es un precursor de L-fructosa y L-glucosa, los cuales pueden ser utilizados como edulcorantes, y también transformados a 5-deoxi-L-arabinosa, un compuesto que tiene propiedades antiparkinsonianas. El ácido galacturónico puede ser enzimáticamente convertido en ácido L-ascórbico, o puede ser usado para producir agentes surfactantes por esterificación con varios ácidos grasos, y la ramnosa puede ser transformada químicamente en aromas usados en sabores de caramelos y frutas. /5/

Conclusiones

La producción de enzimas derivadas de microorganismos es un sector importante de la Biotecnología Industrial. Los preparados pectinolíticos que se comercializan actualmente, están constituidos por mezclas complejas de varias enzimas pécticas con actividades indeseables, que limitan su aplicación en muchos casos. Por ello, la obtención de preparados puros de poligalacturonasas, los cuales no tienen esta limitante, va cobrando especial interés, por las ventajas que representaría su utilización en la obtención de alimentos de mayor calidad. En tal sentido, la producción a partir de levaduras que producen de forma exclusiva endopoligalacturonasa extracelular, constituye una promisoriosa alternativa. En el caso de Cuba, resulta particularmente atractiva debido a que el país cuenta con la infraestructura (planta de torula y alcohol) y experiencia técnica para el cultivo de levaduras a escala comercial.

Bibliografía

1. Brock, D. T.; Madigan, T. M., *Biology of Microorganisms*, 6ta edic., t. II, Prentice-Hall International, Inc, 1991, pág. 372.
2. Serrat, M., *Producción, purificación y caracterización de la poligalacturonasa de una cepa de levadura aislada de residuales del beneficio húmedo del café*, Tesis de doctorado, Bermúdez, R. C. y Villa, T. G. (Tutores), Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba, 2003.
3. Jayani, R. S.; Saxena, S.; Gupta, R., "Microbial Pectinolytic Enzymes: A Review", en *Process Biochem.*, núm. 40, 2005, págs. 2931-2944.
4. Lang, C.; Dörnenburg, H., *Production of Polygalacturonide and Their use as Food Additives*, United State Patent Application: 20030013678. 2003.
5. De Vries, R. P.; Visser, J., Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides, en *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. LXV, núm. 4, 2001 págs. 497-522.
6. Favela, E.; Volke, T.; Vniegra, G., "Production of Hydrolytic Depolymerising Pectinases", en *Food Technol. Biotechnol.*, vol. XLIV, núm. 2, 2006, págs. 221-227, ISSN 1330-9862.
7. Singh, S. A.; Rao, A. G., "A Simple Fractionation protocol, and a Comprehensive Study of the Molecular Properties of Two Major Endopolygalacturonases from Aspergillus

- niger”, en *Biotechnol. Appl. Biochem*, núm. 35, 2002, págs. 115-123.
8. Blanco, P.; Sieiro, C.; Villa, T. G., “Production of Pectic Enzymes in Yeast” en *FEMS Microbiol. Lett.* núm. 175, 1999, págs. 1-9.
 9. Serra, J. L.; Alkorta, I.; Llama, M. J.; Alaña, A., “Aplicación industrial de las enzimas pécticas, Producción, purificación inmovilización y algunas propiedades de la pectina lisa de *Penicillium italicum*” en *Alimentación, Equipos y Tecnologías*, Octubre, 1992, págs. 127-134.
 10. Cabrera, J. C., Obtención de una mezcla de (1-4)- α -D-oligogalacturónidos bioactivos a partir de subproductos de la industria cítrica, Tesis doctoral, Hormaza J. V., Igartuburu, J. M. (tutores), Universidad Agraria de La Habana / Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba, 1999.
 11. Lang, C.; Dörnenburg, H., “Perspectives in the Biological Function and the Technological Application of Polygalacturonases” en *Appl. Microbiol. Biotechnol.* núm. 53, 2000, págs. 366-375.
 12. Crittenden, R. G.; Playne, M. J., *Trends Food Sci. Technol.*, núm. 7, 1996, págs. 353-361.
 13. Fogarty, W. M.; Kelly, C. T. “Pectic Enzymes”, en: Fogarty WM (ed.), *Microbial enzymes and biotechnology*, Londres, Applied Science Publisher, 1983, págs. 131-182.
 14. Ross, J. M.; Saura, D.; Coll, L.; Laencina, J., “Métodos analíticos avanzados para la determinación de sustancias pécticas y actividades enzimáticas pectolíticas”, en *Alimentación, Equipos y Tecnologías*, 1992, págs. 149-154.
 15. Jacob, N.; Prema, P., “Influence of Mode of Fermentation on Production of Polygalacturonase by a Novel Strain of *Streptomyces lydicus* en Pectinases from Actinomycetes”, *Food Technol. Biotechnol.*, vol. XLIV, núm. 2, 2006, págs., 263-267.
 16. Benen, J. A.; Kester, H. C.; Visser, J., “Kinetic Characterization of *Aspergillus niger* N 400 Endopolygalacturonases I, II and C” en *Eur. J. Biochem.*, núm. 259, 1999, págs. 577-585.
 17. Chatterjee, A.; Cui, Y.; Liu, Y.; Dumenyo, C.K.; “Inactivation of rsmA Leads to Overproduction of Extracellular Pectinases, Cellulases and Proteases in *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* in the Absence of the Starvation/cell Density-sensing Signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-hoserine lactone” en *Appl Environ. Microbiol.*, núm. 61, 1995, págs. 1959-1967.
 18. Shevchik, V. E.; Condermine, G.; Hugouvieux-Cottepattat, N.; Robert-Baudouy, J., “Characterization of Pectin Methylesterase B, an Outer Membrane Lipoprotein of *Erwinia caryoseptica* 3937” en *Mol. Microbiol.*, núm.19, 1996, págs. 455- 466.
 19. Bonghi, C.; Rascio, N.; Ramina, A.; Casadoro, G., “Cellulase and Polygalacturonase Involvement in the Abscisión of Leaf and Fruit Explant of Peach” en *Plant Mol. Biol.*, núm. 20, 1992, págs. 839-848.
 20. Taylor, J. E.; Taylor, J. E. *et al.*, “Changes in Polygalacturonase Activity and Solubility of Polyuronides During Ethylene-stimulated Leaf Abscission in *Sambucus nigra*”, en *J. Exp. Bot.*, núm. 44, 1993, págs. 93-98.
 21. Meakin, P. J.; Roberts, J. A., “Anatomical and Biochemical Changes Associated With the Induction of Oilseed Rape (*Brassica napus*) Pod Dehiscence by *Dasineura brassicae* (Winn)”, en *Ann. Bot.*, núm. 67, 1991, págs. 193-197.
 22. Pressey, R., “Polygalacturonase in Tree Pollens”, en *Phytochemistry*, núm. 30, 1991, págs. 1753-1755.
 23. Rose, J. K. C.; Handfield, K. A.; Lavabitch, J. M.; Bennet, A. B., “Temporal Sequence of Cell Wall Disassembly in Rapidly Ripening Melon Fruit”, en *Plant Physiol.*, núm. 117, 1998, págs. 345-361.
 24. Sitrit, Y.; Downie, B.; Bennett, A. B.; Bradford, K. J., “A Novel Exo-polygalacturonase is Associated With Radicle Protrusion in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Seeds” (abstract no 752), en *Plant Physiol.*, núm. 111, 1996, pág. S-161.
 25. Bergey, D. R.; Orozco-Cárdenas, M.; De Moura, D. S.; Ryan, C. A., “A Wound- and Systemin-Inducible Polygalacturonase in Tomato Leaves”, en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 96, 1999, págs. 1756-1760.
 26. Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. J.; Serra, J. L., “Industrial Applications of Pectic Enzymes: a Review” en *Process Biochem.*, núm. 33, vol. 1, 1998, págs. 21-28.
 27. Torres, E. F.; Aguilar, C.; Esquivel, J. C.; Gonzalez, G. V., “Pectinases”, en *Enzyme Technology*, 2005, págs. 273-296.
 28. Bussin, H.I. D, *et al.*, “The Polygalacturonase of *Aspergillus niger* are Encoded by a Family of Diverged Genes”, en *Eur. J. Biochem.*, núm. 208, 1992, págs. 83-90.
 29. Pereira, M.; Schwan, R.; Teixeira, J., “Isolation, Screening and Characterization of Flocculating and Pectinase Producing *Kluyveromyces* strains”, en *Food Technol. Biotechnol.*, vol. XXXVII, núm. 4, 1999, págs. 257-261.
 30. Strauss, M. L.; Jolly, N. P.; Lambrechts, M. G.; Van Rensburg, P., “Screening for the Production of Extracellular Hydrolytic Enzymes by Non-Saccharomyces wine yeasts”, en *J. Appl. Microbiol.*, núm. 91, 2001, págs. 182-190.
 31. Serrat, M.; Bermúdez, R.C.; Villa, T. G., “Polygalacturonase and Ethanol Production in *Kluyveromyces marxianus*. Potential Use of Polygalacturonase in Foodstuffs”, en *Applied Biochemistry and Biotechnology*, núm. 117, 2004, págs. 49-64.

-
32. Luh, B. S.; Phaff, H. J., "Properties of Yeast Polygalacturonase", en *Arch. Biochem. Biophys.*, núm. 48, 1954, págs. 23-37.
33. Vaughn, I. L. H., *et al.*, "Some Pink Yeasts Associated With Softening of Olives", en *Appl. Microbiol.*, núm. 18, 1969, págs. 771-775.
34. Lim, J.; Yamasaki, Y.; Suzuki, Y.; Ozawa, J., "Multiple Forms of Endopolygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*" en *Agric. Biol. Chem.*, núm. 44, 1980, págs. 473-480.
35. Egorov, N. S., *et al.*, "Immobilization of Polygalacturonase from the Yeast *Fabospora macedoniensis* BKM-480", en *Biol. Nauki.*, 1983, págs. 95-99
36. Sakai, T.; Okushima, M.; Yoshitake, S., "Purification, Crystallization and some Properties of Endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*", en *Agric. Biol. Chem.*, núm. 48, 1984, págs. 1951-1961
37. Sánchez, J.; Guiraud, J. P.; Galzy, P., "A Study of the Polygalacturonase Activity of Several Yeast Strains Isolated From Cocoa", en *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, núm. 20, 1984, págs. 262-267.
38. Call, H. P.; Walter, J.; Emeis, C. C., "Maceration Activity of an Endopolygalacturonase from *Candida macedoniensis*", en *J. Food Biochem.*, núm. 9, 1985, págs. 325-348.
39. Fedenci, F., "Production, Purification and Partial Characterization of an Endopolygalacturonase From *Cryptococcus albidus* var. *albidus*", en *J. Gen. Mol. Microbiol.*, núm. 51, 1985, págs. 139-150.
40. Barnby, F. M.; Morpeth, F. F.; Pyle, D. L., "Endopolygalacturonase Production from *Kluyveromyces marxianus*. Resolution, Purification, and Partial Characterization of the enzyme", en *Enzyme Microb. Technol.*, núm. 12, 1990, págs. 891-897.
41. Pardo, C.; Lapeña, M. A.; Gacto, M., "Purification and Characterization of an Extracellular Exopolygalacturonase from *Geotrichum lactis*", en *Can. J. Microbiol.*, núm. 37, 1991, págs. 974-977.
42. Blanco, P.; Sieiro, C.; Díaz, A.; Villa, T. G., "Differences Between Pectic Enzymes Produced by Laboratory and Wild-type Strains of *Saccharomyces cerevisiae*", en *World J. Microbiol. Biotechnol.*, núm. 13, 1997, págs. 711-712.
43. Blanco, P.; Sieiro, C.; Reboredo, N. M.; Villa, T. G., "Genetic Determination of Polygalacturonase Production in Wild-type and Laboratory Strains of *Saccharomyces cerevisiae*", en *Arch. Microbiol.*, núm. 167, 1997, págs. 284-288.
44. Astapovich, N. I.; Ryabaya, N. E., "Isolation and Characterization of Polygalacturonase from *Saccharomyces pastorianus*", en *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, núm. 33, 1997, págs. 287-291.
45. Bravo, C. E., *et al.*, "Determination of Suitable Conditions for Polygalacturonase Production by *Kluyveromyces marxianus*", en *Cienc. Agrotec.*, núm. 24, 2000, págs. 137-152.
46. Almeida, C.; Brányik, T.; Moradas-Ferreira, P.; Teixeira, J. "Continuous Production of Pectinase by Immobilized Yeast Cells on Spent Grains", en *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. XCVI, núm. 6, 2003, págs. 513-518.
47. Cavaco-Paulo, A., "Processing Textile Fibers With Enzymes: an overview", en *Enzyme Applications In fiber Processing*, Cap 15, ACS Symposium Series 687. American Chemical Society, Washington, D C., 1998, págs. 180-189.
48. Hoondal, G. S.; Tiwari, R.; Dahiya, N.; Beg, Q. X., "Microbial Alkaline Pectinases and Their Applications: a review", en *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, núm. 59, 2000, págs. 409-418.
49. Droillard, M. J., *et al.*, "Identification of Calveticulin-Like Protein as One of the Phosphoproteins Modulated in Response to Oligogalacturónidos in Tobacco Cells", en *PLANTA*, núm. 202, 1997, págs. 341-348.