

Degradación enzimática y características físicas y químicas de la pectina del bagazo de melocotón

Jordi Pagan i Gilabert

I S B N: 89-89727-64-3
Depósito Legal: S. 54-98

Servei de Publicacions
Universitat de Lleida

TESITEX, S.L.
c/. Melchor Cano, 15
Télf. 923 - 25 51 15
Fax 923 - 25 87 03
37007 SALAMANCA

BIBLIOTECA VIRTUAL



ÍNDICE GENERAL

NOMENCLATURA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA PECTINA

1.1.1. LA PECTINA. SUS ORÍGENES

1.1.2. LOCALIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA PECTINA

1.1.3. EL GRADO DE ESTERIFICACIÓN

1.1.4. ENLACES DE CALCIO

1.1.5. LA VISCOSIDAD Y EL PESO MOLECULAR DE LA PECTINA

1.1.6. LA GELIFICACIÓN DE LA PECTINA

1.1.7. REOLOGÍA

1.1.7.1. Clasificación reológica de los fluidos alimentarios

1.1.7.2. Reología de las dispersiones de pectinas

1.2. BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LA PECTINA

1.2.1. BIOSÍNTESIS DE LAS SUSTANCIAS PÉCTICAS

1.2.2. DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LA PECTINA

1.2.2.1. La pectina en la maduración de frutos

1.2.2.2. Aplicación industrial de las enzimas pécticas

1.3. EXTRACCIÓN DE PECTINA DE TEJIDOS VEGETALES

1.3.1. OBTENCIÓN INDUSTRIAL DE PECTINA

1.3.2. LA MATERIA PRIMA PARA LA EXTRACCIÓN DE PECTINA

1.3.3. EL PROCESO INDUSTRIAL DE EXTRACCIÓN DE PECTINA

1.3.4. ANTECEDENTES EN INVESTIGACIÓN SOBRE LA EXTRACCIÓN DE PECTINA

1.4. APLICACIONES DE LA PECTINA.

1.4.1. APLICACIONES DE LA PECTINA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

1.4.2. APLICACIONES DE LA PECTINA EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

1.4.3. OTRAS APLICACIONES DE LA PECTINA

2. OBJETIVOS

2.1. ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN DE LA PECTINA A PARTIR DEL BAGAZO EN MEDIO ÁCIDO (HNO₃)

2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINA EXTRAIDA

2.3. ESTUDIO CINÉTICO DE LA DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LA PECTINA

2.4. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS GELES DE PECTINA

3. PLAN DE INVESTIGACIÓN

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

4.2. TOMA DE MUESTRAS, PREPARACIÓN Y ANÁLISIS

4.3. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PECTINA

4.4. DETERMINACIÓN DE LA RIQUEZA DE LAS MUESTRAS DE PECTINA EN ÁCIDO GALACTURÓNICO (AGA)

4.5. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ESTERIFICACIÓN EN LAS MUESTRAS DE PECTINA

4.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ALMIDÓN EN LAS MUESTRAS DE PECTINA

4.7. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GRUPOS ACETILOS EN LAS MUESTRAS DE PECTINA DE MELOCOTÓN

4.8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEÍNA EN LAS MUESTRAS DE PECTINA

4.9. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE MUESTRAS DE PECTINA DE MELOCOTÓN

4.10. DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD INTRÍNSECA DE MUESTRAS DE PECTINA

4.11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD EXOPOLIGALACTURONÁSICA DE UNA MEZCLA INDUSTRIAL DE ENZIMAS PECTOLÍTICAS

4.12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENDOPOLIGALACTURONÁSICA DE UNA MEZCLA INDUSTRIAL DE ENZIMAS PECTOLÍTICAS

4.13. REOLOGÍA DE LAS MUESTRAS DE PECTINA

4.14. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS MUESTRAS DE PECTINA

4.15. PREPARACIÓN DE GELES AZUCARADOS DE PECTINA

4.16. CINÉTICA DE FORMACIÓN DE LOS GELES

4.17. CÁLCULOS Y GRÁFICAS

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. EXTRACCIÓN DE LA PECTINA DE MELOCOTÓN

5.1.1. INFLUENCIA DEL pH Y DE LA TEMPERATURA SOBRE EL RENDIMIENTO DE PECTINA EXTRAÍDA

5.1.2. CINÉTICA DE EXTRACCIÓN

5.1.2.1. Cálculo de las constantes cinéticas y energía de activación

5.1.3. EXTRACCIÓN A TIEMPOS ELEVADOS

5.1.4. FIBRA RESIDUAL INSOLUBLE

5.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN LA PECTINA DE MELOCOTÓN

5.2.1. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE METOXILACIÓN (D.E.)

5.2.1.1. Influencia del tiempo de extracción sobre el grado de metoxilación

5.2.1.2. Influencia del pH y la temperatura de extracción sobre el grado de metoxilación (D.E.)

5.2.2. RIQUEZA EN ÁCIDO GALACTURÓNICO

5.2.2.1. Influencia del tiempo de extracción sobre el % de AGA

5.2.2.2. Influencia del pH y de la temperatura de extracción sobre el porcentaje de AGA

5.2.3. DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS ACETILO

5.2.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ALMIDÓN DE LA PECTINA DE MELOCOTÓN

5.2.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEÍNA DE LAS MUESTRAS DE PECTINA DE MELOCOTÓN

5.2.5.1. Influencia del pH y del tiempo de extracción sobre el contenido en proteína de las muestras de pectina

5.2.6. DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD INTRÍNSECA DE MUESTRAS DE PECTINA DE MELOCOTÓN

5.2.6.1. Influencia de la temperatura y del pH de extracción sobre la viscosidad intrínseca

- 5.2.7. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA PECTINA EXTRAÍDA
- 5.2.8. DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE MUESTRAS DE PECTINA DE MELOCOTÓN
- 5.3. DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LA PECTINA DE MELOCOTÓN
 - 5.3.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD EXOPOLIGALACTURONÁSICA DE UNA MEZCLA INDUSTRIAL DE ENZIMAS PECTOLÍTICAS
 - 5.3.1.1. Fijación de las condiciones de actuación enzimática
 - 5.3.1.2. Determinación de parámetros cinéticos de la actividad exopoligalacturonásica
 - 5.3.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENDOPOLIGALACTURONÁSICA DE UNA MEZCLA INDUSTRIAL DE ENZIMAS PECTOLÍTICAS
 - 5.3.2.1. Fijación de las condiciones de actuación enzimática
 - 5.3.2.2. Determinación de parámetros cinéticos de la actividad endopoligalacturonásica
 - 5.3.3. RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ENDO Y EXOPOLIGALACTURONÁSICA DE UNA MEZCLA INDUSTRIAL DE ENZIMAS PECTOLÍTICAS
 - 5.3.3.1. Determinación de la actividad exopoligalacturonásica para relacionar las actividades endo y exo
 - 5.3.3.2. Determinación de la actividad endopoligalacturonásica para relacionar las actividades endo y exo
 - 5.3.3.3. Índice de capacidad macerante de una mezcla de enzimas pectolíticas industriales
 - 5.3.3.3.1. Capacidad macerante al 50 % de viscosidad
 - 5.3.4. ESTUDIO CINÉTICO DE LA DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LA PECTINA DE MELOCOTÓN Y SU MODELIZACIÓN
- 5.4. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE GELES AZUCARADOS DE PECTINA DE MELOCOTÓN
 - 5.4.1. REOGRAMAS DE LOS GELES
 - 5.4.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VISCOSIDAD DE LOS GELES
 - 5.4.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PECTINA SOBRE LA VISCOSIDAD DE LOS GELES
 - 5.4.4. EFECTO COMBINADO TEMPERATURA-CONCENTRACIÓN SOBRE LA VISCOSIDAD DE LOS GELES
 - 5.4.5. TIXOTROPÍA DE LOS GELES
 - 5.4.6. RELAJACIÓN
 - 5.4.7. SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE GELIFICACIÓN MEDIANTE CARACTERIZACIÓN VISCOELÁSTICA
- 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
 - 6.1. CONCLUSIONES
 - 6.1.1. EXTRACCIÓN
 - 6.1.2. CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINA EXTRAÍDA
 - 6.1.3. ALMACENAMIENTO DEL BAGAZO
 - 6.1.4. ESTUDIO CINÉTICO DE LA DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE

LA PECTINA

6.1.5. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS GELES DE PECTINA

6.2. RECOMENDACIONES

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. ANEXO



*A la memòria del meu pare,
en Josep Pagán i Vey,
home de passió per la cultura y
que va fer despertar en mí
l'amor per la Ciència.*

BIBLIOTECA VIRTUAL



AGRADECIMIENTOS

A la empresa Indulleida S.A., en particular al Sr. José Lorente por la donación de la materia prima y de las soluciones enzimáticas industriales utilizadas.

Al Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (Murcia), en especial al Dr. Luis Coll, Dr. Domingo Saura y Dr. José Laencina por su inestimable ayuda. Sin ésta no hubiera sido posible el apartado 5.2.8 de éste trabajo.

Al Dr. José M^a Gutierrez del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat de Barcelona por su inestimable ayuda. Sin ésta no hubiera sido posible el apartado 5.4.7 de éste trabajo.

Al Dr. Jorge E. Lozano del Instituto PLAPIQUI (Bahía Blanca, Argentina), por las ideas aportadas al inicio de éste trabajo durante su estancia en año sabático en el Departamento de Tecnología de Alimentos.

A Josep Ibars, Joànn Benedí, Carles Prior, Benjamí Buchaca y M^a Nieves Bravo por su inestimable ayuda durante su estancia en el Departamento de Tecnología de Alimentos.

Al Dr. Ricardo Blanco Ortiz, profesor de la E.T.S.E.A de la Universitat de Lleida, por sus consejos y orientaciones en la aplicación de la Estadística.

A Ferràn Perdrix Sapiña por su inestimable ayuda en la parte informática de éste trabajo, en la que también me ha ayudado mi hijo Axel.

Al Dr. Alberto Ibarz, animándome durante todos estos años para que terminara éste tercer ciclo universitario, y por el interés y su inestimable visión crítica dada durante la dirección de ésta Tesis Doctoral realizada en el Departamento de Tecnología de Alimentos, en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria de la Universitat de Lleida.

A mi esposa Ana e hijos Axel y Glenn, por haber tenido tanta paciencia y abnegación durante esta lenta y larguísima "travesía del desierto", que ha conducido a la culminación de éste trabajo. Sin su apoyo nada hubiera sido posible.

NOMENCLATURA

Símbolos y abreviaturas

A	Constante del modelo reológico potencial
A	Tensión tangencial del modelo de Weltman (Pa)
A ₁	Constante del modelo reológico exponencial (concentración ⁻¹)
A ₂	Constante de la ecuación reológica tipo Arrhenius, modelo potencial
A ₃	Constante de la ecuación reológica tipo Arrhenius, modelo exponencial (concentración ⁻¹)
ADP	Adenosil trifosfato
AGA	Ácido anhidrogalacturónico
Ara	D-arabinosa
ATP	Adenosil trifosfato
a	Exponente de la ecuación de Mark-Houwink (adimensional)
	a Constante de la ecuación de Hahn (s ⁻¹)
B	Constante de la ecuación de Weltman (Pa)
B ₀	Cantidad inicial de bagazo, (g)
B ₂	Coefficiente de la ecuación reológica tipo Arrhenius, exponencial (conc. ⁻¹)
C	Valor asintótico de la curva de degradación enzimática de la pectina, (mPa•s)
C	Concentración (mol / L ó kg / L)
C _B	Concentración de bagazo en el reactor (g / L)
C _P	Concentración de pectina (g / L)
c	Constante de la curva de formación del producto (min)
D	Coefficiente de rotura de estructura con el tiempo, en medidas tixotropicas
DE	Grado de esterificación
d	Densidad (kg / m ³ ó g / cm ³)
E _a	Energía de activación (kcal / mol, o kJ / mol)
G	Módulo de elasticidad (Pa)
G*	Módulo complejo (Pa)
G'	Módulo de almacenamiento (Pa)
G''	Módulo de pérdida (Pa)
Gal	D-galactosa
Glc	D-glucosa
HM	Alto metoxilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICM	Índice de capacidad macerante (mPa•s / μmol AGA)
i	Número imaginario
J	Capacitancia (Pa ⁻¹)
K	Índice de consistencia (mPa•s ⁿ)
K	Constante de la ecuación de Mark-Houwink (mol / g) ^a

K_c	Índice de consistencia del modelo de Casson ($\text{Pa}\cdot\text{s}^{0.5}$)
K_H	Índice de consistencia de la ecuación de Hershel-Bulkley ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$)
K_M	Índice de consistencia de la ecuación de Mizrahi y Berk ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$)
K_m	Constante de la ecuación de Michaelis y Menten (mols / L)
K_i	Constante cinética de degradación estructural del modelo de Figoni y Shoemaker (s^{-1})
K_0	Factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius
K_1	Constante cinética de extracción de pectina, en min (min^{-1}) ⁿ
K_1	Constante del modelo reológico potencial ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
K_2	Constante del modelo reológico exponencial ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
K_2	Constante cinética de degradación hidrolítica de la pectina (min^{-1})
K_3	Constante de la ecuación reológica tipo Arrhenius modelo potencial ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)
K_4	Constante de la ecuación reológica tipo Arrhenius modelo exponencial ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)
k	Constante del viscosímetro capilar ($\text{mPa}\cdot\text{s}\cdot\text{L} / \text{kg}\cdot\text{s}$)
k	Constante cinética de degradación enzimática de pseudoprimer orden (min^{-1})
k	Índice de consistencia ($\text{mPa}\cdot\text{s}^n$)
k_p	Constante cinética de degradación enzimática de pseudoprimer orden (s^{-1})
k_0	Constante de la ecuación reológica tipo Arrhenius
k_5	Constante cinética de degradación estructural (s^{-1})
LM	Bajo metoxilo
M	Concentración de sustrato (mol / L)
M	Velocidad de deformación (5,41 min / s)
MRS	Medium Rapid Set
M_n	Peso molecular (número promedio)
M_w	Peso molecular (peso promedio) (g / mol)
N	Velocidad de giro del rotor (min^{-1})
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
N_x	Número de moléculas de un peso molecular M_x
n	Índice de comportamiento al flujo
P	Fosfato
P	Cantidad de pectina obtenida en un tiempo t(g)
P	Tensión tangencial en la ecuación de Hahn
[P]	Concentración de pectina (g/L)
PG	Poligalacturonasa
PGA	Ácido poligalacturónico
PGAasa	Poligalacturonasa
PGL	Poligalacturonato liasa
PMG	Polimetilgalacturonasa
PMGL	Polimetilgalacturonato liasa

PP	Pirofosfato
p	Media de los valores puntuales, en Valor Técnico o en Unidades de Calidad
p _i	Valores puntuales, en Valor Técnico o en Unidades de Calidad
p _{max}	Máximo valor de los valores puntuales
ppm	Partes por millón
R	Constante de los gases (8,314• 10 ⁻³ kJ/mol K ó 1,987 10 ⁻³ kcal/mol)
R ²	Coefficiente de regresión alcuadrado (tanto por uno) RS Rapid Set
r	Coefficiente de regresión
S	Concentración de sustrato en la ecuación de Michaelis y Menten (mol / L)
°SAG	Grados SAG
SS	Slow Set
ss	Sólidos solubles (g / 100 g)
T	Temperatura (°C o K)
TPA	Análisis del perfil estructural
t	Tiempo (h, min, s)
t _E	Tiempo de retraso del sólido (s)
t _R	Tiempo de relajación del fluido (s)
U	Unidad de actividad enzimática (μmols AGA / min mL; mPa•s/ min•mL)
UC	Unidades de Calidad
UDP	Uridín difosfato
UHT	Ultra High Temperature
URS	Ultra Rapid Set
UTP	Uridín trifosfato
u.a.	Unidades de absorbancia
V	Velocidad inicial máxima, en la ecuación de Michaelis y Menten (μmol / min L)
VT	Valor Técnico
v	Velocidad inicial, en la ecuación de Michaelis y Menten (μ mol / min L)
Xil	D-Xilosa
Y	Viscosidad o índice de consistencia (mPa•s ó mPa•s ⁿ)
α ₁	Coefficiente de la ecuación reológica tipo Arrhenius, modelo potencial (mPa•s)
α ₂	Coefficiente de la ecuación reológica tipo Arrhenius, modelo potencial (mPa•s)
β ₁	Exponente de la ecuación reológica tipo Arrhenius, modelo potencial (adimensional)
δ	Ángulo de fase
γ	Deformación relativa (adimensional)
γ̇	Velocidad de deformación (min ⁻¹ ó s ⁻¹)
λ	Constante de la ecuación de Tiu y Boger (adimensional)

λ_e	Constante de equilibrio de la ecuación de Tiu y Boger (adimensional)
η	Viscosidad (mPa•s)
η'	Viscosidad dinámica; viscosidad plástica (Pa•s)
η_a	Viscosidad aparente (Pa•s)
η_0	Viscosidad inicial (mPa•s)
η_{sp}	Viscosidad específica (adimensional)
η_∞	Viscosidad a deformación infinita
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca (dL/g)
τ	Esfuerzo cortante (Pa)
σ	Esfuerzo cortante (Pa)
σ_0	Esfuerzo cortante inicial del modelo de Figoni y Shoemaker (Pa)
σ_e	Esfuerzo cortante inicial de equilibrio, en Pa del modelo de Figoni y Sch. (Pa)

BIBLIOTECA VIRTUAL



1. Introducción

1.1. Características físicas y químicas de la pectina

1.1.1. La pectina. sus orígenes

La pectina fué descubierta en 1790 cuando Vauquelin encontró primeramente una sustancia soluble de los zumos de fruta. El científico francés Braconnot continuó el trabajo de Vauquelin y encontró que "una sustancia ampliamente disponible de plantas vivas y ya observada en el pasado, tenía propiedades gelificantes cuando se le añadía ácido a su solución". La llamó "pectina ácida" del griego "pectos" que significa sólido, coagulado. (The Apple. The Pectin, Herbstreith).

La pectina fué definida por Kertesz (1951) como los ácidos pectínicos solubles en agua de grado de metilación variado que son capaces de formar geles con azúcar y ácido bajo condiciones determinadas. Esta definición abarca la gelificación con calcio de los ácidos pectínicos, definidos por Kertesz (1951) o como los ácidos poligalacturónicos coloidales aislados de plantas conteniendo una cierta proporción de grupos metiléster. De ahí que también el término pectina se usa colectivamente para incluir ácido péctico, la forma de pectina completamente desesterificada.

Las formas de pectina son generalmente reconocidas como seguras por la U.S. Food and Drug Administration (Food and Nutrition Encyclopedia, 1983). Las especificaciones legales para pectinas están enunciadas internacionalmente (Copenhagen Pectin)

1.1.2. Localización y estructura de la pectina

Las sustancias pécticas son mezclas complejas de polisacáridos que constituyen una tercera parte de la pared celular de las plantas dicotiledóneas y de algunas monocotiledóneas (Hoff y Castro 1969; Jarvis et al. 1988). Menor proporción de estas sustancias se encuentran en las paredes celulares de las plantas herbáceas (Wade y Ray, 1978).

El principal constituyente de los polisacáridos pécticos es el ácido o-galacturónico unido en cadenas por medio de enlaces glicosídicos α -(1-4). ([Figura 1-1](#)).

Hay monómeros de ramnosa insertados dentro de la cadena principal de residuos de ácido galacturónico, unidos al extremo reductor de los mismos por enlaces $(1\alpha-2\beta)$, y al extremo no reductor del siguiente residuo urónido por enlaces $(1\beta-4\alpha)$ ([Figura 1-2](#)).

La ramnosa introduce un plegamiento en la que sería una cadena estirada. Otros monómeros serían: galactosa, arabinosa, xilosa, ácido glucurónico y fucosa que conformarían la estructura mostrada en la [Figura 1-3](#).

Las sustancias pécticas se encuentran en la mayor parte de los tejidos vegetales, y muy especialmente en los tejidos parenquimáticos y meristemáticos. En ellos, las zonas más ricas corresponden a la pared primaria de las células y a la lámina media que las separa. ([Figura 1-4](#)).

La lámina media forma una capa amorfa intercelular entre las paredes primarias de células adyacentes, y se considera que es el primer material depositado por el citoplasma. Es una zona libre de celulosa y está compuesta por polímeros pécticos, tanto en su forma libre como de sales cálcicas. La pared primaria es la estructura que se expande y acomoda durante el crecimiento de la célula.

La localización de estas sustancias ha sido precisada por microscopía y micrografía electrónica (Northcote, 1958; Albersheim et al., 1960). En las microfotografías obtenidas, las zonas pécticas quedaban resaltadas por una mayor densidad electrónica. Para revelar la forma y el emplazamiento exacto de los tejidos observados, utilizaron la reacción específica de los grupos metilésteres con hidroxilamina, y la formación de complejos insolubles a partir de iones férricos y las hidroxamidas producidas (Mc Comb y Mc Ready, 1957).

Un esquema propuesto por Northcote (1958), acerca de la distribución de los componentes químicos principales de la pared celular y de la lámina media en la célula vegetal adulta, se expone en la [Figura 1-5](#).

En estas zonas de la célula, la protopectina, término utilizado para designar a las sustancias pécticas recién sintetizadas e insolubles de los tejidos vegetales, se halla asociada a los otros constituyentes de la membrana (celulosa, hemicelulosa, lignina, etc.) mediante uniones físicas y/o químicas, aún mal conocidas, actuando como cementante intercelular y dando así rigidez a los tejidos (Pilnik y Voragen, 1970).

Las posibilidades de unión de las moléculas pécticas y su conversión en protopectina insoluble fueron mencionadas por Pallman (1944) y propuestas inicialmente por Neukon et al., (1949) ([Figura 1-6](#)).

Según Doesburg (1965), estas posibilidades, ampliamente discutidas por Joslyn (1962), pueden resumirse en los siguientes puntos:

1° Enlaces covalentes entre las moléculas pécticas y otros constituyentes celulares (especialmente hemicelulosas), y una asociación de otros polímeros celulares mediante enlaces secundarios.

2^a Puentes de hidrógeno entre poligalacturónidos y otros componentes.

3° Uniones entre cationes divalentes especialmente Ca^{2+} y las funciones ácidas, produciendo la insolubilización de las sustancias pécticas poco esterificadas y una reducción en el aumento de las altamente esterificadas.

4° Un entramado físico-mecánico entre las macro moléculas pécticas, una con otra, o con otros polímeros de la célula.

La organización supermolecular de la pared primaria de la célula vegetal ha sido considerada ampliamente en los últimos años (Wardrob, 1965; Stone y Scallan 1968; Roland y Vian, 1970; Fengel 1970; Harris, 1983).

Albersheim (1976) ha estudiado con detenimiento los componentes polisacáridos de

la pared celular primaria de células de *Acer pseudoplatanus*, proponiendo un modelo molecular esquemático en el cual están representados los diferentes polisacáridos protopectínicos ([Figura 1-7](#)).

Según este modelo, las fibrillas de celulosa, formadas a su vez por cadenas de celulosa agregadas lateralmente mediante puentes de hidrógeno, están cubiertas completamente por una capa de xiloglucano de una molécula de espesor. Este compuesto, dispuesto paralelamente al eje de la fibrilla de celulosa, está enlazado a ésta mediante puentes de hidrógeno que se establecen entre las moléculas de glucosa de ambos polisacáridos. En el lado opuesto de la cadena de xiloglucano no es posible la formación de estos puentes ya que está impedido por las ramificaciones existentes formadas por unidades de xilosa, glucosa y galactosa. Gran parte de las moléculas de xiloglucosa están enlazadas glicosídicamente en su extremo reductor a moléculas de arabinogalactanos que presentan una disposición radial respecto al eje de las fibrillas de celulosa. Los extremos reductores de las arabinogalactanos están unidos a las cadenas ramnagalactorónicas por un enlace glicosídico creyéndose que tiene lugar exclusivamente con las moléculas de ramnosa. El último grupo de interconexiones implica las uniones proteína de la pared están glicosídicamente unidos a tetra arabinósidos. Por último las cadenas de arabinogalactano conectadas a los restos de serina de la proteína de la pared parecen estar unidos covalentemente al ramnoglacturonano (Navarro y Navarro, 1985).

También recientemente, y en orden a clarificar las probables uniones entre los diversos componentes de la pared primaria de la célula vegetal, Robinson (1977), basándose en los trabajos de Keegstra et al. (1973) y Albersheim (1976), ha sugerido un modelo estructural que parece aceptable para células de frutos ([Figura 1-8](#)).

En este esquema, las sustancias pécticas constituidas por un ramnoglacturano, se encuentran rodeadas por una capa protectora de arabanos y galactanos. Las hemicelulosas consisten en xiloglucano y glucuronarabinoxilanos asociadas a la celulosa por uniones no covalentes. La pared primaria puede contener entre el 5 y el 10% de proteína, la cual es particularmente rica en residuos arabinósidos y galactósidos. Las fibras de celulosa están enlazadas a la hemicelulosa por uniones hidrógeno, el complejo celulosa-hemicelulosa interconectado con un complejo de polisacáridos pécticos, posiblemente con proteínas adheridas.

En la elucidación de la estructura fina de las sustancias pécticas de manzana (de Vries et al., 1986) se comprobó que consisten en cadenas de residuos de ácido galacturónico parcialmente esterificado con cadenas laterales compuestas de Ara, Gal y Xil. La degradación con enzimas pectolíticos purificados muestra que las cadenas laterales están presentes en bloques (regiones en cabellera).

La degradación química y enzimática de las regiones en cabellera revela que consisten en cadenas laterales cortas de xilosas. Puede concluirse que las sustancias pécticas de manzana se componen de regiones de homogalactano, xilogalactano y ramnoglactano con cadenas laterales de arabinogalactano. Alrededor del 95% de los residuos presentes del ácido galacturónico están presentes en las regiones homogalacturónicas. Los arabinogalactanos están muy ramificados.

Los análisis HPLC de los productos de la degradación enzimática muestran que los grupos metoxilos de los residuos del ácido urónico están distribuidos al azar. Hay consenso acerca de la estructura fina básica de las moléculas de pectina. Todos están de acuerdo que la idea del ácido α -1,4-D galacturónico con pocos enlaces α -1,2 de residuos de L-ramnosa en la cadena principal.

Thibault et al., (1993) han deducido que las regiones de homogalacturónico en pectina de manzana y cítricos tienen un peso molecular parecido (21000 y 24000) correspondiente a unas longitudes de 72 a 100 residuos de ácido galacturónico.

La estructura y estado de la protopectina es aún bastante desconocida, a pesar de haber transcurrido más de un siglo desde su descubrimiento. Tentativas en este sentido han sido los modelos propuestos por Henglein (1958) y Mohr y Schoper (1978) ([Figura 1-9](#)).

La naturaleza de las sustancias pécticas que constituyen la protopectina evoluciona con la edad del tejido, y de una forma muy manifiesta cuando se trata de frutos. Hasta la maduración son insolubles, participando así en mantener la rigidez; pero alcanzada esta fase se va produciendo una degradación de la laminilla media (generalmente de tipo enzimático), con aparición de meatos intercelulares donde se acumulan los compuestos pécticos, que poco a poco absorben agua y se solubilizan parcialmente. Estas variaciones tienen gran importancia, sobre todo en el reblandecimiento de los frutos durante las últimas fases de su desarrollo y maduración (Doesburg, 1965; Pilnik y Voragen, 1970; Pilnik y Rombouts 1979).

El contenido en pectinas de los tejidos vegetales varía según el origen botánico y anatómico de la planta, tal como se muestra en la siguiente tabla. (Navarro y Navarro, 1985)

Origen	Contenido en pectina (%)
Patata	2,5
Zanahoria	10,0
Tomate	3,0
Manzana	5,5
Torta de manzana (residuos)	17,5
Girasol	25,0
Albedo de agrios	32,5
Fibra de algodón	0,7
Pepitas de limón	6,0
Corteza de limón	32,0
Pulpa de limón	25,0
Melocotón	7,5

Tabla 1-1
Contenido en sustancias pécticas en vegetales y tejidos vegetales.

La función biológica de la pectina en las plantas está aún abierta a la discusión (Mort et al., 1993), pero las pectinas fijan una gran proporción (alrededor del 30%) de los polisacáridos de muchas plantas. El ión calcio induce enlaces entrecruzados implicados en la adhesión celular y textura del tejido (Fisher and Bennet, 1991) así como la extensibilidad de la pared celular (Virk y Cleland, 1988). A pesar del alto grado de metilación de las pectinas en las partes crecientes de la planta, deben existir regiones dentro de las pectinas capaces de inducir a formar enlaces entrecruzados con ión calcio (Varner y Taylor, 1989).

1.1.3. El grado de esterificación

Un factor importante que caracteriza las cadenas de pectina es el grado de esterificación (DE) de los grupos carboxilos de los residuos de ácido urónico con alcohol metílico. Las pectinas probablemente se forman inicialmente en forma altamente esterificada, pero experimentan algo de desesterificación después de insertarse en la pared celular o lámina media. (Van Buren, 1991).

Hay una amplia gama de grados de esterificación dependiendo de especies, tejido y madurez. En general las pectinas del tejido tienen una gama de grados de esterificación que va del 60 al 90%.

Parece ser que la distribución de los grupos carboxílicos libres a lo largo de las cadenas de pectina es regular y los grupos carboxílicos libres están muy aislados unos de otros (de Vries et al., 1986).

En un trabajo de determinación de la distribución de residuos de ácido galacturónico no esterificados contiguos (Mort et al., 1993) atribuye una distribución muy ordenada y que existen dominios distintos que difieren en la distribución de ácido galacturónico esterificado.

El grado de metilación tiene un papel importante en la firmeza y cohesión de los tejidos vegetales. La reducción del grado de metilación tiene como consecuencia un aumento de la cohesión, que es particularmente evidente en tejidos calentados. (Van Buren, 1991).

El efecto de fortalecimiento de los tejidos implica dos fenómenos separados. En tejido fresco, la formación de carboxilos libres incrementa las posibilidades y la fortaleza de los enlaces calcio entre polímeros. En los tejidos calentados se da la combinación de un incremento de los enlaces de calcio y un decremento de la susceptibilidad de la pectina a despolimerizarse por β -eliminación (Sajjaanantakul et al., 1989).

Las pectinas están clasificadas como de alto metoxilo (HM) y bajo metoxilo (LM) pectinas, dependiendo del grado de esterificación. La separación entre HM y LM es arbitraria del 40 al 50% de DE (Ahmed, 1981; Hercules Inc, 1985).

1.1.4. Enlaces de calcio

La habilidad del calcio para formar complejos con pectina están asociados con los carboxilos libres de las cadenas de pectina. Hay un incremento de tendencia a la formación de gel mientras decrece el grado de esterificación (Anyas, Weisz an Deuel, 1950). Los enlaces de calcio implican otros grupos funcionales aparte de los grupos carboxilos (Deuel et al., 1950). La fuerte interacción entre el calcio con otros átomos de oxígeno han sido descritos por Rees et al. (1982) como también los complejos de calcio con carbohidratos, tanto neutros como ácidos (Angyal, 1989).

Estos complejos implican enlaces de coordinación utilizando los orbitales vacíos del ión calcio. El ión calcio es particularmente efectivo formando complejos con carbohidratos (Angyal, 1989) en gran parte debido a que su radio iónico de 0,1 nm es lo suficientemente largo como para coordinar con átomos de oxígeno espaciados que corresponden a muchos

azúcares.

Para la coagulación inducida por el calcio ha sido propuesta una llamada estructura de "cáscara de huevo" (Rees et al., 1982) en la que los iones calcio interaccionan iónicamente y están coordinados con funciones oxigenadas de dos cadenas adyacentes, originando un cruzamiento de cadenas. Los enlaces cruzados de calcio llegan a ser más estables por la presencia de enlaces cruzados vecinales cooperativos. La máxima estabilidad de los enlaces cruzados se alcanza cuando están presentes de 7 a 14 enlaces consecutivos (Kohn y Luknar, 1977). Los enlaces de calcio consecutivos en paredes de células vegetales se han detectado en estudios de resonancia electrónica de spin llevados a cabo por Irvin et al. (1984).

El cloruro cálcico no coagula las pectinas con DE mayor del 60% y las concentraciones necesarias para coagular pectinas con bajo DE se incrementa a medida que el peso molecular disminuye (Anvas; Weizs y Deuel, 1950).

En los tejidos comestibles de frutos la concentración de calcio es baja, en manzanas se ha determinado que tienen un contenido medio del 0,005% en tejido fresco (Perring, 1974).

1.1.5. La viscosidad y el peso molecular de la pectina

La viscosidad de las soluciones de pectina de HM es muy dependiente del número de variables, grado de esterificación, longitud de la molécula, concentración de electrolitos, pH y temperatura.

Concentraciones diferentes de un azúcar y diferentes azúcares afectan a la viscosidad de manera diferente. La viscosidad se incrementa marcadamente a medida que la temperatura se acerca a la temperatura de ebullición.

El peso molecular de la pectina, relacionado con la longitud de la cadena, es una característica muy importante de la que dependen la viscosidad de sus disoluciones y su comportamiento en la gelificación de las jaleas. La determinación cuidadosa del peso molecular es difícil, parcialmente debido a la extrema heterogeneidad de las muestras y parcialmente debido a la tendencia de las pectinas a agregarse, aún bajo condiciones no favorables a la gelación.

Los pesos moleculares de pectinas pueden ser expresados tanto como el valor del peso promedio (M_w) como el del número promedio (M_n), siendo:

$$M_w = \frac{\sum N_x M_x^2}{\sum N_x M_x} \quad \text{y} \quad M_n = \frac{\sum M_x N_x}{\sum N_x}$$

donde N_x es el número de moléculas de peso molecular M_x presente (Richards, 1980). Diferentes técnicas experimentales dan diferentes pesos moleculares promedio. La técnica de difusión de la luz de Rayleigh da el valor del peso promedio.

Una descripción completa de pesos moleculares necesita información sobre la distribución estadística de tamaños moleculares. La relación M_w/M_n es una medida

conveniente del grado de polidispersidad.

Hace cuarenta años los pesos moleculares de pectinas y su distribución fueron estudiados sistemáticamente por Owens et al., (1948) por viscosimetría y determinaron que los pesos moleculares variaban de 20000 a 300000.

En dispersiones de pectina, una propiedad muy útil de la viscosidad es la resistencia de la pectina soluto a fluir en relación al agua conteniendo un electrolito. El objeto del electrolito es la de disminuir la ionización de los grupos carboxilos de la pectina. La pectina, entonces pasa a ser un polímero neutro (Pals y Hermans, 1952), en vez de comportarse como un electrolito con gran efecto electroviscoso.

Los viscosímetros operan con muchos principios básicos. Los diseños capilar y rotacional han sido los más frecuentemente aplicados a la pectina. En la viscosimetría capilar, el flujo se inicia a través de una columna de vidrio vertical capilar a presión y temperatura constante. Los datos son tratados para obtener la viscosidad intrínseca $[\eta]$. La unidad de viscosidad intrínseca se expresa como volumen/peso (Carpenter and Westerman, 1975).

Huggins (1942) relacionó la viscosidad intrínseca con la concentración de soluto y por medio de una ecuación derivada, se abordó el estudio de la funcionalidad de la pectina. Smidsrod y Hang (1971) descubrieron un método implicando $[\eta]$ y fuerza iónica en un test comparativo de la rigidez de las cadenas del polielectrolito en respuesta a la concentración salina de la disolución.

La viscosidad intrínseca $[\eta]$, se relaciona con el peso molecular a través de la ecuación de Mark-Houwink: (Axelos y Thibault, 1991)

$$[\eta] = K M_w^a$$

donde M_w es el peso molecular promedio (Billmeyer, 1984). En forma logarítmica, al representar $\ln [\eta]$ frente a $\ln M_w$ se obtiene una recta, cuya ordenada en el origen es $\ln K$ y la pendiente es el parámetro a . La ecuación es válida a alrededor de 10^5 g/mol (Anger y Berth, 1986). El exponente es variable entre 0,5 para polímeros enrollados y 1,7 para moléculas extendidas y rígidas. Los diferentes disolventes, polímeros y temperaturas afectan al exponente a (Daniels et al., 1956, 1970).

DE (%)	Disolvente	K	a	Referencia
32-95	0,09 M NaCl	$9,55 \cdot 10^{-2}$	0,73	Anger y Berth (1985)
HM	Tampón acetato (pH 4,5)	$0,49 \cdot 10^{-3}$	0,79	Deckers et al., (1986)
70	0,1 M NaCl	$2,16 \cdot 10^{-2}$	0,79	0,79 Berth et al. (1977)
HM	1% hexametafosfato sódico (pH 4,5)	$4,7 \cdot 10^{-5}$	1,0	Smith (1976)

Tabla 1-2
Constantes de Mark-Houwink para pectina.

Aparte de los métodos citados de determinación del peso molecular de pectina por

difusión de luz (Jordan y Brant, 1978) y el viscosimétrico, se usan también ampliamente el método de cromatografía de filtración molecular en columna (Fishman et al., 1989) y el de cromatografía líquida de alta resolución (método de control de calidad de pectina de Copenhagen Pectin, 1991). El peso molecular medio de las pectinas comerciales de manzana es de 80000 (Pilnik y Rombouts 1985).

1.1.6. La gelificación de la pectina

Desde el punto de vista de la tecnología alimentaria la propiedad más importante de las pectinas es su aptitud para formar geles.

Los geles consisten en moléculas poliméricas con enlaces entrecruzados para formar una red interconectada y tupida inmersa en un líquido (Flory, 1953). En geles de pectina y otros sistemas de alimentos conteniendo pectina, este líquido es agua. Las propiedades del gel son el resultado neto de interacciones complejas entre el soluto y solvente. La influencia del agua como solvente, la naturaleza y magnitud de las fuerzas intermoleculares que mantienen la integridad del gel permiten tener una gran capacidad de retención de agua.

En la mayoría de geles alimentarios, los enlaces entrecruzados en la red no son puntos de interacción ya que incluyen segmentos extensos a partir de dos o más moléculas poliméricas, generalmente en estructuras bien definidas llamadas zonas de unión que son estabilizadas por una combinación de fuerzas intermoleculares débiles. Individualmente estas fuerzas son suficientes para mantener la integridad estructural de las zonas de unión, pero su efecto es acumulativo y le imparte estabilidad termodinámica. Las fuerzas intermoleculares estabilizantes de la red del gel son los enlaces de puentes de hidrógeno (Jenchs, 1969) y las interacciones hidrofóbicas (Chen y Joslyn's, 1967).

Set rápido y set lento son designaciones de la pectina referidas a la relación en que una estructura incipiente de jalea desarrolla una estructura a la temperatura de gelificación. Su ritmo de gelificación influencia la textura del producto. Las pectinas HM son también de set rápido o lento. El ritmo de gelificación disminuye cuando disminuye el grado de esterificación. Ritmos intermedios conducen a designaciones tales como rápido-set medio, set lento medio, etc.,. Los geles de pectina de HM son más rápidos en alcanzarse que los de LM. Los geles de pectinas HM con alto grado de esterificación se alcanzan más rápidamente que los de pectinas HM con menor grado de esterificación bajo el mismo gradiente de enfriamiento.

Las jaleas patrón están normalmente elaboradas con pectina HM y de set lento. El ritmo lento de gelificación permite tiempo suficiente (25-30 min.) para que las burbujas de aire atrapadas puedan escapar. Las pectinas de set rápido permiten jaleas de productos en la gama de pH entre 3,30 a 3,50. Las de set lento las permiten entre 2,80 y 3,20. Una mezcla de pectina de HM y LM impartirán cierto grado de tixotropía a una jalea.

Una jalea se considera normal en los patrones U.S. si tiene un grado ridgelimétrico de 23,5% o 150° SAG. Un ridgelímetro es un instrumento en el que todas las pectinas HM están estandarizadas en los Estados Unidos (IFT, 1959).

La cantidad de pectina LM a ser usada en geles de pectina se determina por la calidad

y las propiedades del producto final esperado. Estas jaleas son relativamente independientes del pH y son muy dependientes del calcio. Las pectinas LM convencionales y amidadas difieren en sus características físicas.

A un pH y concentración de azúcar constante, las pectinas amidadas tienden a dar un gel rápido similar al de las pectinas HM, mientras las pectinas convencionales LM tienden a darlo más blando y extensible.

Al mismo contenido de sólidos solubles, las pectinas amidadas requieren un menor nivel de uso que las pectinas convencionales LM para alcanzar una jalea de determinadas condiciones. El nivel de uso de las pectinas LM es del 10 al 20% más alto que el de las pectinas amidadas para alcanzar la misma firmeza (Hercules, Inc. 1985).

En resumen, las cualidades de la pectina que influyen en los caracteres del gel son: la longitud de la molécula péctica, su grado de esterificación y la proporción entre los grupos hidrofóbicos e hidrofílicos.

- **La longitud** de la molécula condiciona la rigidez o firmeza del gel. A valores de longitud muy bajos una pectina no da geles, cualquiera que sea la dosis empleada y las restantes condiciones del medio.

- **El grado de metilación** contribuye por un lado a regular la velocidad de gelificación y también es responsable de algunas propiedades organolépticas de los geles pectina-azúcar ácido que forman las pectinas de alto metoxilo.

- **La proporción entre grupos hidrofóbicos e hidrofílicos** en la molécula de pectina determina la solubilidad de ésta. El grupo éster es menos hidrofílico que el grupo ácido y en consecuencia una pectina de alto metoxilo con un alto grado de esterificación gelifica a temperaturas más altas que otra con menor grado de esterificación. Esta diferencia se refleja en la clasificación de las pectinas en pectinas de gelificación rápida, normal o lenta.

Los factores del medio más importantes que influyen en la formación del gel son:

- La temperatura
- El pH
- Azúcar y otros solutos
- Los iones calcio

-**Temperatura.** Cuando se enfría una solución caliente que contiene pectina las energías térmicas de las moléculas decrecen y su tendencia a gelificar aumenta. Cualquier sistema que contenga pectina, tiene un límite superior de temperatura por encima de la cual la gelificación nunca ocurrirá. Por debajo de esta temperatura crítica, las pectinas de bajo metoxilo gelifican casi instantáneamente mientras que la gelificación de las de alto metoxilo depende del tiempo. En contraste con las pectinas de bajo metoxilo, las de alto no son termorreversibles.

-**pH.** La pectina es un ácido con con pK de aproximadamente 3,5.

Un porcentaje alto de grupos ácido disociados respecto a no disociados hace la pectina más hidrofílica. Por lo tanto, la tendencia a gelificar aumenta considerablemente al bajar el pH.

Esto se hace especialmente evidente en pectinas de alto metoxilo las cuales requieren normalmente un pH por debajo de 3,5 para gelificar.

-El azúcar y otros solutos similares. Estos hidratos de carbono, tienden generalmente a deshidratar las moléculas de pectina en solución. Cuantos más sólidos en solución hay, menos agua disponible para actuar como disolvente de la pectina y por lo tanto la tendencia a gelificar se favorece.

En valores de sólidos solubles superiores al 85% el efecto deshidratante es tan fuerte que la gelificación de la pectina es muy difícil de controlar. Las pectinas de alto metoxilo gelifican a valores de sólidos solubles por encima del 55%. Para cada valor de sólidos solubles superior al 55% hay un valor de pH en el cual la gelificación es óptima y un rango de pH en el que en la práctica se puede gelificar.

Las pectinas de bajo metoxilo pueden gelificar a cualquier valor de sólidos solubles. la temperatura de gelificación disminuye al disminuir el contenido en sólidos solubles.

-Los iones calcio. Al contrario que las pectinas de alto metoxilo, las pectinas de bajo metoxilo desesterificadas requieren bastante calcio y un rango estrecho de dicho catión para una óptima gelificación. Las pectinas de bajo metoxilo amidadas muestran más flexibilidad a este respecto. Para ambos tipos de pectina, un incremento en la concentración de calcio implica un aumento de la fuerza del gel y también un aumento de la temperatura de gelificación.

1.1.7. Reología

La reología es la ciencia que estudia el flujo y las deformaciones de sólidos y fluidos bajo la influencia de fuerzas mecánicas.

En las industrias alimentarias se trabaja muy frecuentemente con productos que se encuentran en fase líquida, por tanto es muy importante conocer en todo momento las características reológicas de los líquidos que intervienen en los procesos industriales, de cara a optimizar estos procesos evitando así gastos innecesarios, debido principalmente al sobredimensionamiento de los equipos (bombas, conducciones, evaporadores, etc.)

Es por ello imprescindible el definir una serie de modelos reológicos que recojan lo más fielmente posible las características de flujo de los alimentos que trata la industria. Estos modelos reológicos se basan en el cálculo experimental de una serie de constantes que caracterizan el flujo para cada alimento en las variables de operación en que se encuentra.

A continuación se va a detallar una clasificación reológica de los fluidos, así como los modelos reológicos que se ajustan a cada tipo de fluido.

1.1.7.1. Clasificación reológica de los fluidos alimentarios

Se puede hacer una primera distinción entre alimentos con comportamiento newtoniano y no newtoniano, según obedezcan a la ley de Newton de la viscosidad o no. Para los fluidos newtonianos la función viscosidad es constante, siendo precisamente su valor el de

la viscosidad newtoniana. En los fluidos no newtonianos ya no se puede hablar de la viscosidad ya que la relación entre el esfuerzo y la velocidad de deformación no es constante en este caso se define la viscosidad aparente la cual es función de la velocidad de deformación.

Una segunda clasificación distingue los fluidos dependientes e independientes del tiempo. Los fluidos cuyo comportamiento solo depende del esfuerzo cortante se denominan independientes del tiempo y su viscosidad a una determinada temperatura sólo depende de la velocidad de deformación. Los fluidos dependientes del tiempo son aquellos cuya viscosidad depende además del gradiente velocidad del tiempo que actúa dicho gradiente.

Además, hay un tipo de alimentos que tienen un comportamiento intermedio entre fluido viscoso y sólido elástico, son los denominados fluidos viscoelásticos.

Se puede realizar una clasificación de los fluidos alimentarios según el siguiente esquema:

A) - Comportamiento independiente del tiempo

- 1) - Fluidos newtonianos
- 2) - Fluidos no newtonianos
 - a) - Plásticos
 - b) - Pseudoplásticos
 - c) - Dilatantes

B) - Comportamiento dependiente del tiempo

- 1) - Fluidos tixotrópicos
- 2) - Fluidos antitixotrópicos o reopécticos

C) - Comportamiento viscoelástico

[Figura 1-10](#)

A) - COMPORTAMIENTO INDEPENDIENTE DEL TIEMPO

A.1) COMPORTAMIENTO NEWTONIANO

Es el comportamiento de aquellos fluidos que cumplen la ley de Newton de la viscosidad la cual indica que cuando un fluido es sometido a un esfuerzo cortante dicho esfuerzo es directamente proporcional al gradiente de velocidad de deformación, siendo la viscosidad la constante de proporcionalidad. La viscosidad de fluidos newtonianos es únicamente función de la temperatura y composición siendo independiente del tiempo, la velocidad de formación y la historia de ésta. Ejemplos de fluidos newtonianos son: soluciones azucaradas, zumos de frutas clarificados y despectinizados, leche, etc. (Rao, 1977).

A.2) COMPORTAMIENTO NO NEWTONIANO

El comportamiento reológico de este tipo de fluidos queda completamente caracterizado por una simple relación entre el esfuerzo aplicado y la velocidad de deformación a una determinada temperatura. Esto es debido a que la viscosidad sólo

depende del gradiente velocidad.

Este grupo de fluidos engloba tres comportamientos diferenciados: Plástico, Pseudoplástico y Dilatante.

A.2.1) FLUIDOS CON COMPORTAMIENTO PLÁSTICO

Estos fluidos tienen un umbral mínimo de fluencia ("yield stress") que se debe superar para que empiecen a fluir.

Dichos fluidos en reposo presentan una estructura tridimensional con una rigidez suficiente para soportar cualquier esfuerzo aplicado que sea inferior al umbral de fluencia. Si el esfuerzo aplicado es mayor, esta estructura se rompe y el fluido comienza a fluir. Si dicha fuerza deja de actuar o toma un valor por debajo del umbral de fluencia, la estructura se reconstituye. Es muy importante el cálculo de este umbral de fluencia para conocer cual es el esfuerzo mínimo que se debe aplicar para que empiecen a fluir este tipo de fluidos.

A.2.2) FLUIDOS PSEUDOPLÁSTICOS ("Shear thinning")

En este tipo de fluidos la viscosidad aparente disminuye al aumentar la velocidad de deformación.

Los alimentos que presentan este tipo de comportamiento se caracterizan por tener partículas de forma irregular dispersas en la fase líquida. En reposo estas partículas se encuentran desordenadas, lo cual origina una gran resistencia interna al flujo. A medida que aumenta la velocidad de deformación, las partículas se orientan en la dirección del flujo disminuyendo así la resistencia al deslizamiento y por lo tanto también disminuye la viscosidad.

Este tipo de comportamiento es muy usual en los fluidos alimentarios, siendo quizás el comportamiento no newtoniano el más común. Ejemplos de fluidos pseudoplásticos son: zumos de frutas concentrados clarificados, purés de frutas y vegetales, concentrados de proteínas, yema de huevo con sal, etc. (Rao, 1977).

A.2.3) FLUIDOS DILATANTES ("Shear thickening")

En este tipo de fluidos su viscosidad aparente aumenta al hacerle la velocidad de deformación.

Estos fluidos cuando se someten a gradientes bajos de velocidad, las partículas están suficientemente empaquetadas para que el líquido llene los huecos entre partículas actuando como lubricante y haciendo por lo tanto, que la viscosidad sea baja. Al aumentar la velocidad aumentan también los huecos y no hay suficiente líquido para lubricar el roce de las partículas aumentando por lo tanto, la viscosidad aparente.

Este comportamiento se observa muy raramente, se ha observado en cierto tipo de miel y también en suspensiones de almidón cocinadas (Bagley y Christianson, 1982).

A.3) MODELOS REOLÓGICOS PARA FLUIDOS NO NEWTONIANOS

Ley de la potencia de Ostwald. Esta ecuación relaciona el esfuerzo cortante con la velocidad de deformación según la expresión: $\sigma = K (\dot{\gamma})^n$ siendo K el índice de consistencia y n el índice de comportamiento al flujo.

Valores de $n < 1$ describen el comportamiento de fluidos pseudoplásticos, este comportamiento se ha observado en diferentes suspensiones alimentarias (Rao et al., 1986; Rao 1987), Zumos de naranja (Crandall et al., 1982), derivados de tomate (Rao y Bourne, 1977); Ibarz et al., 1988), zumos de frambuesa (Ibarz y Pagán, 1987), soluciones de carboximetilcelulosa (Elfak et al., 1979), yema de huevo (Ibarz y Sintés, 1989) entre otros muchos productos. Cuando n es mayor que 1 la ley de Ostwald describe el comportamiento de fluidos dilatantes, este caso se ha observado en el estudio de la reología de mieles de eucaliptos (Pryce-Jones, 1953; Jimenez et al., 1987), suspensiones de almidón (Bagley y Chirstianson, 1982), crema de cacahuete (Rha, 1978)

Ecuación de Bingham (1922). Este es un modelo utilizado para describir el comportamiento plástico, en él aparece un umbral de fluencia que debe superarse para que el alimento empiece a fluir. La expresión de Bingham es la siguiente: $\sigma = \sigma_0 + \eta' \dot{\gamma}$

donde σ_0 es el umbral de fluencia y η' es la viscosidad plástica.

Este modelo se ha aplicado en el estudio del comportamiento de suero de puré de albaricoque (Costell et al., 1982; Costell et al., 1985), zumos naturales de manzana (Ibarz y Casero, 1987), geles de pectina (Fizman et al., 1984).

Ecuación de Herschel-Bulkley(1926). $\sigma = \sigma_0 + K_H (\dot{\gamma})^n$

Este modelo puede considerarse como una generalización de la ley de la potencia en la que se incluye un nuevo parámetro que es el umbral de fluencia (σ_0). K_H , es el índice de consistencia y n, es el índice de comportamiento al flujo. Esta ecuación se ha utilizado en el estudio reológico de zumos de naranja (Crandall et al., 1982), purés de albaricoque (Costell et al., 1982), clara de huevo (Tung et al., 1970), zumos de kiwi (Ibarz et al., 1995). Los parámetros reológicos de bastantes alimentos semilíquidos se ajustan a esta ecuación de Herschel-Bulkley (Barbosa y Peleg, 1983).

Modelo de Casson(1959). $(\sigma)^{0.5} = K_{OC} + K_C (\dot{\gamma})^{0.5}$

Este modelo se utiliza mucho para calcular los valores del umbral de fluencia. $(K_{OC})^2$ ha sido tomado como umbral de fluencia en numerosos trabajos (Charm, 1963; Tung et al., 1970; Rao et al., 1981). Este modelo se ha utilizado en el estudio del comportamiento de chocolate fundido (Chevalley, 1975), clara de huevo (Tung et al., 1970), derivados de tomate (Rao y Bourne, 1977).

Muchos alimentos semilíquidos que se ajustan a la ecuación de Herschel-Bulkley, se ajustan también a la ecuación de Casson modificada (Barbosa y Peleg, 1983)

Modelo de Mizrahi y Berk (1972) Este modelo se basa en el de Casson y fue concebido para explicar el comportamiento reológico del concentrado de naranja. En este modelo se considera la interacción de las partículas en suspensión dentro de un disolvente pseudoplástico. Su expresión es la siguiente:

$$(\sigma)^{0.5} = K_{OM} + K_M (\dot{\gamma})^n$$

en la cual K_{OM} es un término que incluye el umbral de fluencia, que depende de la concentración de partículas suspendidas y de la concentración de pectinas solubles; por otro lado K_M y n se determinan principalmente por las propiedades del disolvente.

Esta ecuación se ha utilizado en el estudio de zumos de naranja por varios autores (Mizrahi y Berk, 1972; Crandall et al., 1982; Costell y Durán, 1982).

EFECTO DE LA TEMPERATURA

Para los fluidos newtonianos se utiliza generalmente una ecuación del tipo Arrhenius que relaciona la viscosidad con la temperatura, en el caso de fluidos no newtonianos se relaciona normalmente la viscosidad aparente con la temperatura a una velocidad de giro determinada aunque también se puede utilizar el índice de consistencia en lugar de la viscosidad aparente. La ecuación que se utiliza es la siguiente: (Rao et al., 1984).

$$\eta_a = \eta_\infty \exp (Ea/RT)$$

donde Ea es la energía de activación al flujo, η_∞ es una constante denominada viscosidad de deformación infinita, R la constante de los gases perfectos y T la temperatura en grados Kelvin.

La temperatura afecta a los distintos parámetros reológicos de la siguiente forma:

- La viscosidad, viscosidad aparente o el índice de consistencia disminuyen al aumentar la temperatura.
- Generalmente se observa que el índice de comportamiento al flujo no varía con la temperatura (Sáenz y Costell, 1986; Mizrahi y Berk, 1972; Crandall et al., 1982); aunque en algunos casos se ha detectado un aumento del índice de comportamiento al flujo al aumentar la temperatura (Ibarz y Pagán, 1987), pudiéndose pasar de un comportamiento pseudoplástico a newtoniano.
- Por otro lado, el umbral de fluencia suele disminuir al aumentar la temperatura (Sáenz y Costell., 1986).

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN

Un aumento de la concentración implica un incremento de la viscosidad o del índice de consistencia. En la bibliografía se encuentran principalmente dos tipos de ecuaciones que relacionan la viscosidad o el índice de consistencia con la concentración; uno es el modelo potencial y el otro es el modelo exponencial. Sus expresiones son las siguientes: (Harper y el Sharigi, 1965; Rao et al., 1984)

$$Y = K_1(C)^{A_1} \quad (\text{potencial})$$

$$Y = K_2 \exp(A_2 C) \quad (\text{exponencial})$$

donde Y es la viscosidad o bien el índice de consistencia y C es la concentración.

La expresión potencial se utiliza satisfactoriamente en alimentos del tipo purés mientras que la exponencial da buenos resultados en zumos concentrados y pastas.

La concentración también afecta al umbral de fluencia y al índice de comportamiento al flujo. El umbral de fluencia aumenta al aumentar la concentración; por otro lado el índice de comportamiento al flujo puede no verse afectado por la concentración o bien disminuir cuando ésta aumente (Mizrahi y Berk, 1972).

EFFECTO COMBINADO TEMPERATURA - CONCENTRACIÓN

En la industria es muy importante el obtener una sola expresión que relacione el efecto de la temperatura y la concentración sobre la viscosidad. En la práctica se utilizan dos tipos de ecuaciones, una potencial y otra exponencial, que resultan de combinar la ecuación tipo Arrhenius del efecto de la temperatura con las ecuaciones potencial y exponencial del efecto de la concentración respectivamente. Sus expresiones respectivas son las siguientes: (Rao y Rizvi, 1986)

$$\eta_a = \alpha_1(C)^{\beta_1} \exp(Ea/RT)$$

$$\eta_a = \alpha_2 \exp(B_2C + Ea/RT)$$

B - COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DEPENDIENTE DEL TIEMPO

Los fluidos que presentan un comportamiento reológico dependiente del tiempo se caracterizan porque su viscosidad aparente depende, además de la velocidad de deformación, también del tiempo que está actuando el gradiente de velocidades. Este tipo de fluidos se clasifican en tixotrópicos y reopécticos, según si el esfuerzo que provoca la deformación, a un gradiente de velocidad determinado, disminuya o aumente con el tiempo, respectivamente.

B.1 - Fluidos tixotrópicos

En este tipo de fluidos el esfuerzo cortante asociado a un gradiente de velocidad disminuye con el tiempo, la viscosidad aparente también experimenta un descenso.

Para explicar éste comportamiento reológico se supone que al aplicar un esfuerzo cortante se producen roturas en la estructura interna del fluido y por lo tanto para mantener un mismo gradiente de velocidades se necesita cada vez un menor esfuerzo cortante.

La tixotropía se puede considerar como similar a la pseudoplasticidad si se supone que el tiempo necesario para que se alineen las partículas en el sentido del flujo es despreciable.

La caracterización tixotrópica puede realizarse de dos maneras:

a) Se puede representar la variación de σ frente a $\dot{\gamma}$, aumentando la velocidad de deformación hasta un máximo y después ir disminuyendo. De esta forma se obtiene un ciclo de histéresis según el sentido horario, en el cual el área encerrada es una medida de la

tixotropía de la muestra.

b) El método más utilizado consiste en ver la variación del esfuerzo cortante con el tiempo a una velocidad de deformación fijada.

En la práctica se definen una serie de parámetros para la caracterización tixotrópica de los alimentos. Los parámetros más usuales son: el coeficiente de rotura con el tiempo (D) que da una idea de la velocidad de rotura de la estructura con el tiempo a un $\dot{\gamma}$ fija y, por otro lado, se define el coeficiente de ruptura tixotrópica debido al aumento de la velocidad de deformación (M) el cual indica las pérdidas de esfuerzo cortante por unidad de aumento de la velocidad de deformación (Wilkinson, 1960; Rao y Rizvi, 1986). Las ecuaciones para hallar estos parámetros son las siguientes:

$$D = (\eta_1 - \eta_2) / [\ln (t_1 - t_2)]$$

$$M = (\eta_1 - \eta_2) / [\ln (N_2 / N_1)]$$

donde η_1 y η_2 son las viscosidades del fluido a los tiempos t_1 y t_2 respectivamente, mientras que N_1 y N_2 son las velocidades de giro del rotor a esos tiempos.

Aparte de las formas ya descritas para la caracterización tixotrópica, existen unos modelos que se basan en la aplicación de unas ecuaciones que definen la tixotropía del fluido:

Modelo de Weltman (1943)

$$\sigma = A - B \ln t$$

El parámetro A representa la tensión tangencial necesaria para que comience a degradarse la estructura que da lugar a la tixotropía. B por su parte da una idea de la cantidad de estructura que se degrada durante el cizallamiento.

Modelo de Hahn (1959)

$$\ln (\sigma - \sigma_e) = p - at$$

El parámetro p tiene el mismo significado que el A ya mencionado. El valor de a informa sobre la velocidad del proceso de degradación estructural y depende de la resistencia del fluido a la tensión cortante que se le aplica.

Modelo de Tiu y Boger (1974)

$$\sigma = [\sigma_0 + K_H(\dot{\gamma})^n] \lambda$$

Este es un modelo cinético-reológico basado en el modelo de Herschell - Bulkley, multiplicado por el parámetro λ que varía desde el valor unidad para un tiempo cero de deformación hasta un valor λ_e de equilibrio.

El parámetro λ varía con el tiempo según la expresión: (Petrellis y Flumfert, 1973)

$$d\lambda/dt = -K_t(\lambda - \lambda_e)^2 \text{ para } \lambda > \lambda_e$$

Modelo de Figoni y Shoemaker (1983)

En este modelo cinético se supone que el descenso del esfuerzo cortante es una suma de funciones cinéticas de primer orden:

$$\sigma - \sigma_e = \sum_1 (\sigma_{0,i} - \sigma_{e,i}) \exp(-K_i t)$$

El parámetro K_i representa las constantes cinéticas de degradación estructural.

Ejemplos de fluidos con comportamiento tixotrópico son la leche condensada, la mayonesa, la clara de huevo, zumos de frutas muy concentrados, miel, etc., (Rao y Kizvi, 1986)

B.2 - Fluidos reopécticos

Este tipo de fluidos presentan la propiedad de aumentar su viscosidad aparente con el tiempo cuando son sometidos a un determinado gradiente de velocidad. Esto se explica por el fenómeno de formación de una estructura al aplicar un esfuerzo sobre estos fluidos. El comportamiento reopéctico, no obstante, no ha sido hallado todavía en ningún producto alimentario (Rao y Kizvi, 1986).

C) COMPORTAMIENTO VISCOELÁSTICO

Los fluidos viscoelásticos son aquellos que presentan conjuntamente propiedades de flujo viscoso y sólido elástico.

Hay ecuaciones que describen este tipo de comportamiento, las más importantes son las de Voigt y Maxwell. En ambas el esfuerzo cortante es función del flujo viscoso y de la deformación elástica.

La caracterización viscoelástica se suele hacer de las siguientes formas (Ibarz, 1993):

- Caracterización similar a la tixotrópica: a velocidad de deformación fija se estudia la evolución del esfuerzo cortante con el tiempo.
- Experimentos de relajación del esfuerzo: se somete al alimento a una deformación fija y se observa la variación del esfuerzo con el tiempo.
- Ensayos de "creep" y recuperación: se aplica un esfuerzo constante durante un tiempo determinado y se estudia la variación de la deformación con el tiempo.
- Por último es necesario comentar la existencia de modelos mecánicos, los resultados obtenidos por estos modelos se pueden expresar mediante diagramas esfuerzo-deformación y tiempo, que permiten obtener ecuaciones de aplicación reológica.

1.1.7.2. Reología de las dispersiones de pectinas

Las dispersiones de pectina se comportan de una manera similar que la de otros biopolímeros en términos de comportamiento de velocidad de deformación - viscosidad aparente.

Los geles de pectina poseen las propiedades de los líquidos viscosos y las propiedades de los sólidos elásticos (viscoelasticidad). De ahí que sus propiedades reológicas son expresadas en términos de módulos elásticos y viscosidades newtonianas.

El comportamiento viscoelástico de los geles de pectina ha sido estudiado mediante esfuerzo dinámico, relajación del esfuerzo y creep y recuperación.

Las medidas del esfuerzo dinámico consisten en aplicar una oscilación armónica (tensión o esfuerzo) a la muestra; si el material se comporta linealmente, la respuesta resultante (esfuerzo o tensión respectivamente) es armónica consigo misma con la misma frecuencia. Los componentes elásticos o viscosos del comportamiento viscoelástico se obtienen fácilmente a partir de la relación entre la fase retardada de las dos señales. Los resultados de los experimentos dinámicos se expresan a menudo por los valores del módulo complejo G^* :

$$G^* = G' + iG''$$

en la que G' es el módulo de almacenamiento o módulo de elasticidad, G'' es el módulo de pérdida e i es el número imaginario de valor $\sqrt{-1}$

El módulo de almacenamiento G' correspondiente al esfuerzo en fase con la tensión, es una medida de la energía almacenada del material; para un gel está directamente relacionada con la densidad de los enlaces cruzados de la red.

El módulo de pérdida G'' corresponde al esfuerzo de amplitud de 90° fuera de fase, es una medida de energía disipada como calor (Ferry, 1980). El recíproco de la frecuencia angular ω define la escala de tiempo de las medidas dinámicas. Mediante un rastreo de la frecuencia se puede explorar la escala de tiempo de la respuesta mecánica del material. La forma de las variaciones de G' y G'' con ω (espectro mecánico) permite una determinación cualitativa de la naturaleza del material (Ferry, 1980).

La tangente del ángulo de fase, ángulo δ , es también llamada pérdida tangencial y su valor es:

$$\tan \delta = G''/G'$$

Otras ecuaciones para describir el comportamiento viscoelástico son las de Voigt y Maxwell (Ibarz, 1993)

La expresión matemática del modelo de Voigt es: $\sigma = \sigma\gamma + \dot{\gamma}$, siendo $\dot{\gamma}$ la velocidad de deformación, σ es el esfuerzo cortante y γ es la deformación.

Cuando el gradiente de velocidad tiende a 0 el cuerpo se comporta como elástico. El cociente entre la viscosidad y el módulo σ recibe el nombre de tiempo de retraso del sólido

$$t_E = \eta/\sigma$$

y representa el tiempo que se necesita para que la velocidad de deformación resultante al realizar un esfuerzo cortante, se reduzca a la mitad de su valor inicial.

La ecuación de Maxwell es:

$$\sigma = [(\eta/\sigma)(d\sigma/dt) + \eta \dot{\gamma}]$$

La relación entre la viscosidad y el módulo σ recibe el nombre de tiempo de relajación del fluido

$$t_R = \eta/\sigma$$

y representa el tiempo necesario para que el esfuerzo que se produce como resultado de una deformación constante se reduzca a la mitad de su valor.

El comportamiento viscoelástico de los geles de pectina se puede estudiar y caracterizar diferentes maneras. Una de ellas es análoga a la de la caracterización tixotrópica, en la que a una velocidad de deformación fija se estudia la evolución del esfuerzo cortante con el tiempo ([Figura 1-11 a](#))

De las curvas obtenidas es posible realizar un análisis comparativo de las diferentes muestras (Gross et al., 1982). También se utilizan experimentos de relajación del esfuerzo ([Figura 1-11b](#)) en los que el gel es sometido a una deformación fija por un espacio de tiempo y se mide la variación del esfuerzo con el tiempo. En cuanto a trabajos relacionados en este apartado puede referirse a Caombi et al.,(1986) sobre geles de azúcar-pectina comercial en función de la concentración, pH y contenido en azúcar.

También se ha investigado sobre los ensayos de creep y recuperación. En este caso, se aplica un esfuerzo constante durante un tiempo determinado ([Figura 1-11c](#)) y se estudia la variación de la deformación con el tiempo. Los resultados se expresan en términos de $J(t)$ en función del tiempo. La función $J(t)$ es la capacitancia o "compliance" que es una relación entre la deformación que se produce y el esfuerzo aplicado.

$$J(t) = \gamma/\sigma$$

Kawabata (1977) estudió el comportamiento "creep" de jaleas de sacarosa con diferentes contenidos de pectina comercial de alto metoxilo y purificada. Otros trabajos en este apartado se deben a Watson (1966), Dahme (1985) y Plaschina et al., (1979, 1982).

El análisis del perfil textural (TPA) es una técnica empírica que ha encontrado un uso extensivo en la caracterización de la textura de muchos alimentos. El test de doble penetración es una prueba objetiva que imita la acción de mordedura de los dientes y

proporciona datos de fuerza-deformación requeridos para la evaluación de los siete parámetros de textura: fracturabilidad, dureza, cohesividad, adhesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad. Bourne, (1982) y (Rao et al., 1989) estudiaron la posibilidad de determinar los parámetros TPA mostrados en la [Figura 1-12](#) (Guerrero, 1993) con un analizador de textura Volland-Stevens (VSTA) (Volland Corp, Hawthorne, N. Y.).

1.2. Biosíntesis y degradación enzimática de la pectina

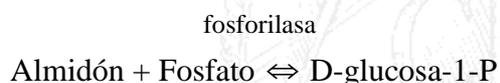
1.2.1. Biosíntesis de las sustancias pécticas

Los azúcares nucleotídicos son los donadores de carbohidratos en la formación de polisacáridos de la pared celular. Este descubrimiento, ampliamente revisado por Leloir et al. (1960) y Neufeld y Hassid (1963), constituye el más importante avance en este campo

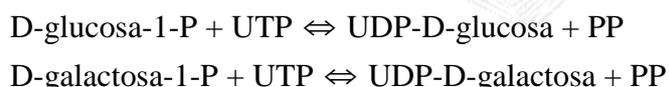
El primer paso en la formación de un azúcar nucleotídico a partir de un monosacárido es la fosforilación del mismo, mediante la participación de ATP, una quinasa y una mutasa



El resultado es la obtención, en este caso, de glucosa-1-P, que puede obtenerse también a partir de almidón, por una reacción catalizada por una fosforilasa:



El segundo paso en la formación de los azúcares- nucleotidos (azúcares activados) está catalizado por las enzimas pirofosforilasas. Ejemplos son:



El conjunto de kinasas, pirofosforilasas y las reacciones que forman glucosa-1-P, pueden ser responsables de la síntesis de la mayoría de los azúcares activados, que actúan como donadores de carbohidratos para los polímeros de la pared.

Son también posibles las interconversiones de unos azúcares activados en otros, lo que puede ser de gran importancia para la biosíntesis de los polímeros no celulósicos de la pared celular. Las enzimas que catalizan estas interconversiones son deshidrogenasas, descarboxilasas y epimerasas (Karr, 1976).

Después de haberse sintetizado los azúcares nucleotídicos (azúcares activados) se inicia la biosíntesis de pectina que con su regulación metabólica se resume en el siguiente esquema:

[Figura 1-13](#)

A continuación se describen los procesos que tienen lugar en cada vía:

Vía 1. Producción y movimiento de los azúcares activados donadores

Los azúcares activados se forman en el exterior del sistema endomembranoso en el citosol. Algunos de ellos para las pectinas incrementan las reacciones de la epimerasa a partir de los correspondientes azúcares activados que componen las series de glucosa.

Las epimerasas son activas durante el crecimiento de la planta. Así el potencial para la producción de UDPgal, UDPgalAc y UDPara, que son los donadores para el material péctico, está presente aún cuando hay aumento del grosor secundario y la pectina aún no se ha depositado sobre la pared (Dalessandro et al., 1977). Las reacciones de la epimerasa no están controladas en la síntesis del polisacárido.

Los componentes de los azúcares activados son hidrofílicos y es necesario transferirlos a los locus de las sintetasas dentro del sistema endomembranoso. Su transporte a través de la membrana es, obviamente, un punto de control. No solamente la proporción de biosíntesis del polisacárido está controlada por este mecanismo, sino que además puede ser determinada la naturaleza del polímero encontrado en el compartimento de la membrana. Así, aún cuando las sintetasas pueden estar presentes en una parte particular del sistema membranoso p. ej. el retículo endoplasmático, la unión del polisacárido no ocurre a este nivel si el azúcar activado no puede entrar en el lumen del compartimento (Bolwell, 1983). La unión principal de los polisacáridos ocurre en el aparato de Golgi.

Las uniones de los polisacáridos pécticos, como la mayoría de los polisacáridos de la pared celular, con la posible excepción de la celulosa, parece situarse por transferencia del grupo glicosilo a partir del componente azúcar activado al polímero creciente sin la necesidad de un intermediario aceptor dolicol fosfato. Esto tiene como consecuencia para el mecanismo del método de transporte de los azúcares a través de la membrana. Se ha sugerido (Kornfeld et al. 1985) que para la unión de la porción de azúcar de N-glicoproteínas unidas que ocurre en el retículo endoplasmático, los fosfatos isoprenoides actúan como intermediarios aceptores y algunos mecanismos de transportes implican estos componentes. Está también aclarado que cuando las glicosilaciones ocurren dentro del aparato de Golgi no están implicados estos métodos de transporte y puede tener lugar la entrada directa de los azúcares nucleotídicos componentes por transportadores específicos (Dixon et al. 1985).

Vía 2. Síntesis y compartimentación de los polímeros pécticos dentro del sistema endomembranoso

Las sintetasas o transglicosilasas que transferirán la galactosa, ácido galacturónico y arabinosa a los polímeros pécticos son los principales puntos enzimáticos en los que el control se mantiene en la síntesis de la pectina (Bolwell, 1983); (Dalessandro et al., 1981). La actividad de estas enzimas decrece durante el aumento secundario del espesor de la pared cuando la deposición de pectina cesa. Pero el cuidadoso uso de inhibidores de transcripción y traducción y por el uso de un anticuerpo monoclonal se vieron cambios en la cantidad de proteína enzimática presente en la membrana (Bolwell, 1983, 1985). Así, este control se opera a nivel del genoma y los cambios en la pared celular son parte de un proceso de

desarrollo.

Uno de los principales puntos de control en la síntesis del polisacárido es la cantidad y consecuentemente, la actividad de las transglicosilasas o sintetetas que operan para un azúcar nucleotídico particular en el lumen de la membrana. Sin embargo, hay complicaciones posteriores que se incrementan con polímeros complejos tales como las pectinas en las que hay heteropolímeros, p. ej. el ramnogalacturonano, el arabinogalactano y el ramnogalacturonano-arabinogalactano. Hay algunos como el arabinogalactano que son polisacáridos muy ramificados y, por añadidura, azúcares menores como la fucosa y xilosa están insertados en estos polisacáridos complejos. Si los azúcares son añadidos directamente al polímero creciente al mismo tiempo, entonces la síntesis de las principales cadenas pueden depender de alguna manera de la incorporación en varias etapas de un azúcar diferente o punto de ramificación tal, que la actividad de la transglicosilasa formando la cadena se mantenga. Alternativamente subunidades más pequeñas del principal polímero pueden ser preformadas por transportadores intermediarios, tales como un lípido o una proteína, entonces quedan incorporados como bloques en el polímero (Northcote. 1982). Este método de síntesis podría parecerse al de formación de algunas glicoproteínas en animales y bacterias. Tendría como resultado una cierta regularidad en la composición química del polisacárido que se forma, e introduciría etapas secundarias en las que se ejercería un control sobre las uniones.

Además del control de la cantidad de sintetasa que defina la actividad total de la enzima, tal actividad de algunas sintetetas están moduladas por la carga energética de la célula puesto que están inhibidas por niveles de mono nucleósidos y difosfatos (Dalessandro, 1981).

Cuando los polisacáridos han sido formados pueden ser transferidos a partes particulares del sistema membranoso y finalmente empaquetados para ser exportados a regiones definidas en la periferia de la célula.

Se conoce muy poco acerca del control de esta parte importante del sistema de ensamblaje. Algunas ideas para los mecanismos de los tipos y procesos de transportes pueden ser obtenidos a partir de limitadas evidencias conocidas para la síntesis y exportación de algunas glicoproteínas a partir del aparato de Golgi. Se ha comprobado, por ejemplo, que la cavidad del aparato de Golgi puede ser dividida en cis, medial y trans regiones y que diferentes transglicosilasas están localizadas en diferentes regiones (Roth et al., 1982; Dunphy et al. 1985). Se ha observado también para unos pocos polímeros que durante su empaquetamiento y exportación desde un compartimento de la membrana a otro, están separados de otros debido su confinamiento a regiones particulares o cavidades. Esto se ha comprobado mediante la actuación de marcadores específicos de reconocimiento sobre el polímero, tal como la eliminación de unidades terminales de glucosa quedando al descubierto radicales de manosa (Lodish et al., 1984) (para el transporte desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi) o formación de manosa-6-P al extremo no reductor del polisacárido (para el transporte del aparato de Golgi al lisosoma) (Sly et al., 1982). Las reacciones enzimáticas que capacitan al marcador a desarrollar bajo el oligosacárido de la glicoproteína hace, sin embargo reconocer la fracción proteica del polímero además del oligosacárido. De esta manera, por ejemplo, pueden ser hechas distinciones entre glicoproteínas que conducen manosa, aún cuando solamente alguna de ellas será transportada al lisosoma.

Vía 3. Movimiento de vesículas y fusión con la membrana plasmática para ensamblaje y deposición dentro de la pared

Las vesículas conteniendo el polisacárido péctico se incrementan desde el aparato de Golgi. Las membranas de la cavidad del aparato de Golgi donde ocurre la dispersión, llegan a modificarse de tal manera que las membranas de las vesículas secretoras se parecen tanto en su composición química como en su ultraestructura a la membrana plasmática. Las vesículas son transportadas a áreas específicas de la superficie celular cuando la célula se expande en área superficial. En algunas células puede ser visto que la fusión vesicular depende de una distribución característica de partículas proteicas dentro de la membrana (Satir et al., 1973). Hay así en la elaboración de las membranas unos cambios tanto químicos como estructurales que la fusión es posible en el locus requerido. Las vesículas producidas desde el sistema membranoso pueden ser dirigidas en parte a superficies celulares particulares por microtúbulos. A pesar de que esto no es tan claro en las etapas tempranas del crecimiento, cuando la pectina está siendo depositada en la pared en la formación secundaria de la pared. Durante el desarrollo de los elementos del xilema, por ejemplo, cuando se forma una espiral o un reticulado secundario, los microtúbulos están distribuidos justo debajo de la membrana plasmática, sin embargo no pueden localizarse. Ello ocurre en grupos de tres o cuatro, distribuidos al azar en un arreglo circular o helicoidal alrededor de la célula. Puede ser que la pectina se deposite suavemente de modo uniforme sobre la pared durante este periodo.

Un material similar a la pectina es segregado a partir de una suspensión de tejido de células cultivadas de sicomoro y el ritmo de secreción de estos polisacáridos puede ser medido usando arabinasa radiactiva que se incorpora a los arabinogalactanos. La adición de Ca^{2+} incrementa el ritmo de secreción (en segundos). La estimulación fué conducida por una acción sobre el mecanismo normal del polisacárido de pared celular exportado desde el citoplasma. Parece, sin embargo, que la fusión de las vesículas con la membrana plasmática es una etapa limitante y es probablemente un punto de control. La acción del Ca^{2+} incrementa el ritmo de fusión de la membrana celular de tal manera que hay un incremento inmediato en la cantidad de polisacárido segregado (Morris et al., 1977).

El control puede ser establecido si en algún tiempo hay en la membrana más vesículas que aquellas que se funden. Sin embargo, con el objeto de sostener el incremento en la secreción, sería necesario transmitir la señal atrás hacia el sistema sintético y el proceso de empaquetamiento en el aparato de Golgi de tal manera que se obtiene un nuevo estado estacionario (un nuevo ritmo de síntesis). Esto produciría el número de vesículas requeridas conteniendo los polisacáridos necesarios para mantener el nuevo ritmo de fusión y secreción. El número de recambio del aparato de Golgi podría ser muy rápido en células de plantas y han sido calculados tiempos de 5 a 40 minutos (Robinson et al., 1982). Experimentos in vitro que implican aislamiento de fracciones de membrana a partir de células de raíces de maíz también mostraron que el calcio es necesario para la fusión de la membrana (Baydoun et al., 1981). Los análisis de las membranas indican que la dependencia del ion calcio implica proteínas de membrana y una de estas es una ATPasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} . (Baydoun et al. 1981)

Después de depositarse en la pared, la pectina puede experimentar modificaciones químicas por transglicosilasas que unen polímeros particulares como los arabinogalactanos a

poligalacturonanos (Stoddart et al., 1967). Pueden darse enlaces uniformes éster con ácido diferúlico para dar puentes entre diferentes polisacáridos (Fry, 1983). Se sabe que el ión calcio forma enlaces iónicos entre los grupos acídicos de los polímeros de pectina. Sin embargo, es insensible a la presencia de estos enlaces covalentes y iónicos intermoleculares en la pared primaria cuando ésta no está lignificada. La principal cohesión entre los constituyentes pueden ser los puentes de hidrógeno que permiten una flexibilidad a la estructura de la pared que depende en su principal característica al contenido de agua especialmente en su relación con la pectina (Northcote, 1972). Cuando ocurre la lignificación durante el engrosamiento secundario los polisacáridos llegan a estar encerrados en una caja polimérica en forma de cruz y se forman puentes entre los polisacáridos y radicales fenilpropanoides. La pared así desarrolla gran fuerza tensora debido a las microfibrillas y se llega a una estructura rígida debido a la matriz lignificada en que la lignina hidrofóbica ha desplazado al agua. La pectina en este caso representa solamente un constituyente menor en la pared y contribuye muy poco a su textura o propiedades.

1.2.2. Degradación enzimática de la pectina

1.2.2.1. La pectina en la maduración de frutos

En general durante la maduración de los frutos, los tejidos se reblandecen y pierden cohesión, hay un incremento de pectina soluble en agua acompañada de una pérdida de protopectina (Bartley y Knee, 1982). Este incremento de pectina soluble en agua se adscribe a la acción de las poligalacturonasas (Pressley et al. 1971) actuando en concierto con otras enzimas tales como las pectinmetilesterasas y varias glicosidasas. En frutos climatéricos las glicosidasas normalmente incrementan su cantidad o actividad al mismo tiempo que hay incremento de producción de etileno.

Hay en general dos tipos de poligalacturonasas. Las exopoligalacturonasas eliminan residuos de ácido galacturónico (Pressley et al., 1971). Las endopoligalacturonasas rompen los enlaces α -1-4 glicosídicos al azar a lo largo de la cadena de urónido. Los dos tipos de enzimas requieren residuos desesterificados. La acción de las exopoligalacturonasas puede estar limitada en que su acción termina cuando hay otros residuos en la cadena como ramnosa, etc., Ambos, exo y endo enzimas se han encontrado en muchos frutos tales como, pera, melocotón, pepino y tomate (Dey y Brinson, 1984). Hay referencias de poligalacturonasas inespecíficas en aguacate piña, uva y dátiles.

Las enzimas poligalacturonasas se incrementan en todos los frutos durante la maduración. La pectina metilesterasa está usualmente presente en abundancia en el tejido del fruto mucho antes de que el reblandecimiento se produzca. Es inactiva in situ a menos que el tejido esté traumatizado por procesos como choque de calor, congelación o maceración. Posiblemente hay una separación de la esterasa de la pectina metoxilada, evitando el acceso de la enzima al sustrato. Hay alguna acción de esta enzima con objeto de tener suficiente cantidad de residuos urónidos desmetilados para obtener cadenas de pectina susceptibles a atacar por poligalacturonasas (John y Dey, 1986).

La pérdida de residuos de galactosa a partir de polisacáridos de la pared celular durante la maduración fue primeramente descrito por Tavakoli and Wiley (1968). Una exploración de 15 especies (Gross y Sams, 1984) mostró que 7 tenían una pérdida

preferencial de galactosa y 7 pérdida preferencial de arabinosa. Una buena parte de estos residuos de azúcares neutros pueden provenir de las cadenas laterales de la pectina. Hay una variedad de glicosidasas en los frutos que están implicados en la eliminación de estos azúcares neutros (Wallner y Walker, 1975) que fueron detectadas usando como sustratos nitrofenil glicósidos.

En la extensión de la eliminación de los azúcares neutros del material péctico, hay una influencia de las glucosidasas de azúcares neutros en la rotura de la pectina y su solubilización. La eliminación de los azúcares neutros de las cadenas laterales podría incrementar la susceptibilidad de la pectina al ataque por poligalacturonasas y pectina metilesterasas. La pérdida de las cadenas laterales podría hacer decrecer la extensión del "enredo" e incrementar el factor de deslizamiento para las cadenas pécticas.

Se ha hecho un gran trabajo de investigación sobre el reblandecimiento del tomate. Estos frutos tienen inusualmente altos niveles de enzimas que atacan las pectinas, tanto endo como exogalacturonasas y pectin estererasas (Tucker et al., 1980). Estas enzimas van hacia las paredes celulares y pueden acarrear la autólisis de las pectinas de las paredes celulares (Wallner y Bloom, 1977). A medida que la maduración progresa hay un gran incremento en la proporción de pectina soluble en agua con un peso molecular en la gama de 200000 (Gross y Wallner, 1979). Su contenido bajo de azúcares neutros está relacionada con la pérdida de residuos de galactosa de los polisacáridos de la pared celular.

En contraste con los tomates, las manzanas contienen muy bajos niveles de poligalacturonasa y mucho mas bajos de exopoligalacturonasa que también han sido identificados (Bartley y Knee, 1982). Mientras muchas variedades de manzanas son más ácidas mientras maduran, nunca llegan a alcanzar el grado de jugosidad encontrado en los tomates y melocotones y en la etapa de máxima maduración muchas variedades presentan un aspecto harinoso.

Simultáneamente durante el reblandecimiento hay un decrecimiento en el DE de la lamela-media pectínica debido a la acción de la pectina metilesterasa (Hobson, 1963). Esto rinde una pectina más susceptible a las endopoligalacturonasas. Hay varios tipos de metilesterasas presentes en el tejido del fruto (John y Dey, 1986)

El incremento de la pectina soluble en agua está balanceada en parte por un decremento de la protopectina. En los genotipos nor (no maduración) y rin (maduración inhibida) hay un pequeño incremento de pectina soluble en agua y la poligalacturonasa está totalmente ausente.

Estos genotipos de maduración inhibida han hecho posible estudios extensivos sobre la genética de la maduración y la relación del DNA al fenómeno de maduración (Schuch et al., 1989). La incorporación de genes antisentido de poligalacturonasa conduce a decrecer los niveles del poligalacturonasa y menor disminución del peso molecular medio de la pectina. La incorporación del gen de la poligalacturonasa en las líneas resultantes de la maduración inhibida en la formación de galacturonasa en las líneas transformadas (Giovanoni et al., 1989).

La presencia de una variedad de glicosidasas en tomate ha sido mostrada por Wallner

y Walker (1975). Las galactosidasas están presentes en varias formas de isozimas (Pressley, 1983) una de las cuales hidroliza galactosa a partir de las fracciones de polisacáridos de la pared celular. En el *rin* mutante, la galactosa se pierde durante la maduración (Gross y Walkner, 1979), en cambio el reblandecimiento no tiene lugar.

En el tomate maduro se dan dos tipos de reblandecimiento. Las paredes celulares están más flojas y el gel placentar, está licuefactado teniendo un carácter jugoso. Al mismo tiempo, la adhesión intercelular decrece en el pericarpo, conduciendo a una harinosidad más tierna en esta región.

Durante la maduración, hay una pérdida de galactosa de la pared celular. Dentro de la variedad Cox de naranja, la pérdida de galactosa ocurre antes de la significativa solubilización de la pectina; se ha sugerido que la eliminación de la galactosa de las cadenas laterales es una condición previa para la degradación de las principales cadenas de urónido. Las manzanas contienen galactosidasa activa; sin embargo no ha sido aún demostrado que esta enzima actúe sobre los componentes de la pared celular de la manzana. (Bartley, 1977).

Hay una gran gama de variación en el comportamiento de las diferentes variedades de manzana en cuanto al reblandecimiento. Algunas como las Transparentes Amarillas, a menudo reblandecen más rápidamente que los tomates. Otras como la McIntosh y Gravenstein, a menudo a un ritmo moderado que pueden ser almacenadas durante varios meses a bajas temperaturas. Aún otras como las York y Red Delicious pueden ser almacenadas durante 6 meses o más y retener la textura inicial. No han sido encontradas relaciones consistentes entre el reblandecimiento y medidas de cantidades de pectina soluble en agua, poligalacturonasas y galactosidasas. (De Vries et al., 1984).

A pesar de que la dificultad en relacionar los cambios composicionales que difieren los ritmos de reblandecimiento, hay evidencia de puntos histológicos de la implicación de la rotura de pectina. Ben Aries et al., (1979) mostraron una progresiva separación y disolución de pectina rica de lamela media de manzana durante las condiciones de reblandecimiento. Pooviah et al. (1988) mostraron fracturas en las regiones de lamela media cuando los tejidos eran sometidos a fuerzas de tensión. El reblandecimiento de manzana puede ser afectado mayormente por cambios en regiones muy restringidas o planas de la lamela media, por tanto, esta detección de cambios químicos en estas regiones críticas está oscurecida por los principales componentes del complejo de la pared celular de la lamela media.

Pueden hacerse algunas afirmaciones. Durante el reblandecimiento hay un aflojamiento de las paredes celulares y un decrecimiento de la adhesión entre las células. El proceso que domina varía entre las especies de frutos o variedades, pero las dos maneras de reblandecimiento aparecen implicadas en la degradación y solubilización de la pectina. El mecanismo más probable es a través de la acción de la poligalacturonasa sobre los sustratos pécticos ya convenientemente desesterificados por la pectina metilesterasa. La pérdida de azúcares neutros de la pared celular tales como la galactosa y arabinosa se han visto consistentemente durante y antes del reblandecimiento, pero no se ha establecido aún una relación causal con el reblandecimiento.

[Figura 1-14](#)

1.2.2.2. Aplicación industrial de las enzimas pécticas

Las enzimas pécticas se pueden clasificar dependiendo del tipo de actividad que catalizan, en dos grupos: las desesterificantes (pectina esterasas) y las despolimerizantes. Las primeras catalizan la hidrólisis de los ésteres metílicos del ácido poligalacturónico, liberando metanol al medio y convirtiendo las pectinas en ácidos pécticos. Las segundas son un grupo más numeroso de enzimas capaces de desdoblar las cadenas de ácido poligalacturónico de diverso grado de esterificación en unidades de menor tamaño. Dentro de éste, las enzimas pécticas se clasifican dependiendo de que la ruptura de la cadena transcurra por una auténtica hidrólisis del enlace α -1,4 glicosídico catalizadas por las endo y exo poligalacturonasas (pectato liasas) y las endo y exo polimetilgalacturonasas (pectina hidrolasas), o por una β -eliminación sin intervención del agua (una trans-eliminación) catalizada por las endo y exo poligalaturonato liasas (pectato liasas) o por las endo y exo polimetilgalacturonato liasas (pectina liasas). Las reacciones se muestran en la [Figura 1-14](#).

La maceración con ayuda de enzimas pécticas permite desgregar los tejidos vegetales (frutas y verduras), proporcionando suspensiones de células sueltas y agrupados celulares (Rombouts et al.,1980). Este método presenta ventajas sobre la disgregación termo-mecánica, ya que conserva intactos el flavor, los pigmentos y los compuestos activos celulares. Estos tratamientos son de interés en la producción de néctares de frutas, así como en la elaboración de purés vegetales (de patata y zanahoria, entre otros) y de alimentos infantiles, en general. Si se emplean preparaciones de pectinasas suplementadas con celulastas, se puede conseguir la total licuación de los frutos o verduras. (Serra et al.,1992)

Las pectinasas comerciales proceden todas ellas de fuentes fúngicas y presentan un intervalo de pH óptimo de actividad comprendido entre 4 y 5. Estas preparaciones no son adecuadas para la elaboración de purés vegetales, que presentan un pH cercano al neutro. Además, debido a la escasa estabilidad térmica de las preparaciones comerciales, es necesario que las maceraciones enzimáticas transcurran a temperaturas inferiores a 45°C, temperaturas a las que pueden crecer los microorganismos mesófilos contaminantes, siendo, por tanto, imprescindible una etapa de pasteurización para reducir el crecimiento de estos microorganismos (Chesson y Codner, 1978). En consecuencia, una preparación de enzimas pécticas idónea para ser empleada en el procesado de verduras debería presentar un pH óptimo de actividad cercano a 7,0 y una estabilidad térmica mayor a la que habitualmente presentan las pectinasas comerciales. (Silley, 1986). En la [Figura 1-14](#) se esquematizan las diferentes reacciones catalizadas por las hidrolasas y liasas pécticas más frecuentes.

En la Tabla 1-3, a continuación se expone la clasificación de las enzimas pécticas que actúan sobre pectinas o ácidos pécticos (Serra et al.,1992).

Nombre recomendado por la EC	Nombre habitual	Nº EC	Sustrato	Enlace
<i>Enzimas desesterificantes</i>				
Polimetilgalacturonato esterasa (PMGE)	Pectina esterasa	3.1.1.11	Pectina	afectado al azar
<i>Enzimas despolimerizantes</i>				
Hidrolasas				
Endopoligalacturonasa (Endo-PG)	Poligalacturonasa	3.2.1.15	Pectato	al azar
Exopoligalacturonasa 1 (Exo-PG1)	Poligalacturonasa	3.2.1.67	Pectato	último cadena
Exopoligalacturonasa 2 (Exo-PG2)	Pofigalacturonasa	3.2.1.82	Pectato	penúltimo cadena
Endopolimetilgalacturonasa (Endo-PMG)	Pectina hidrolasa		Pectina	al azar
Exopolimetilgalacturonasa (Exo-PMG)	Pectina hidrolasa		Pectina	último cadena
Liasas				
Endopoligalacturonato liasa (Endo-pGL)	Pectato liasa	4.2.2.2	Pectato	al azar
Exopoligalacturonato liasa (Exo-PGL)	Pectato liasa	4.2.2.9	Pectato	penúltimo cadena
Endopolimetilgalacturonato liasa (Endo-PMGL)	Pectina liasa	4.2.2.10	Pectato	al azar
Exopolimetilgalacturonato liasa (Exo-PMGL)	Pectina liasa	Pectina		último cadena

Tabla 1-3

Clasificación de las enzimas pécticas que actúan sobre pectinas o ácidos pécticos.

1.3. Extracción de pectina de tejidos vegetales

1.3.1. Obtención industrial de pectina

Las pectinas industriales parten de diferentes tejidos botánicos que quizá contienen diferentes estructuras de pectina. (May, 1990). Otra posible variación en la estructura de las pectinas está en la distribución de grupos metil - éster alrededor de la cadena. Las pectinas de cítricos pueden ser extraídas con un DE de hasta el 75% mientras que las de manzana contienen al menos un 80%. La diferencia puede ser debida a la presencia de pectina esterasa en la piel de los cítricos. El mercado de la pectina ha estado muy ligado a la industria de conservación desde sus comienzos y la característica más importante en el uso de la pectina ha sido su poder gelificante. El origen de la materia prima empezó en los años 20 y 30 a partir de gran cantidad de residuos producidos por la industria sidrera y de zumo de -manzana. Los residuos de manzana proporcionan extractos de concentrados de pectina que podría ser conservada químicamente para vender en bidones. Esta práctica continúa hoy en día, sin embargo los costes de transporte limitan el radio económico de distribución. En contraste, las empresas que empezaron con corteza de cítrico como materia prima, encontraron que los extractos eran inaceptables en aroma para la mayoría de aplicaciones y pronto produjeron pectina sólida mediante sal metálica o precipitación con alcohol.

Esta iniciativa fue eventualmente seguida por los productores de pectina de manzana y la estructura presente de la industria ha evolucionado gradualmente. En los últimos años, otros factores económicos han llegado a aumentar de una manera importante, y los costes de medio ambiente y restricciones han llevado al abandono de la fabricación de pectina por muchos productores especialmente en Estados Unidos.

De ser la mayor potencia en tecnología y producción de pectina, los Estados Unidos ahora importa la mayoría de sus necesidades de pectina, la mayor parte de ésta de Europa.

En el futuro es probable que la América Central y del Sur con sus extensas industrias de zumos de fruta, jugarán un papel más importante, con el apoyo técnico y comercial de las empresas productoras de pectina existentes. (May, 1990).

1.3.2. La materia prima para la extracción de pectina

La materia prima más común a partir de la cual se extrae pectina es el orujo de manzana o de cítricos. Estos dos tipos de materia prima tienen, sin embargo ligeras diferencias que hace que una u otra sean adecuadas para aplicaciones específicas. La pectina de manzana produce un gel más pesado y viscoso adecuado para ciertos tipos de rellenos de pastelería y similares. El color más ligero de la pectina de cítricos es más aceptable en la confección de jaleas, pero en ciertas mermeladas tradicionales de naranja, el color proporcionado por la pectina de manzana es un atributo positivo. (May, 1990)

Han sido consideradas también otras fuentes para la extracción de pectina comercial. Durante la segunda guerra mundial se utilizaron los residuos de remolacha azucarera como complemento al orujo de manzana en Inglaterra y Alemania. Los productos no fueron de mucha calidad en términos de gelificación. La remolacha tiene muchas desventajas como competidor de la manzana y cítricos. Más problemático es aún obtener un alto peso molecular. Aún cuando tiene otras desventajas, como la de tener un grado de metilación bajo y la presencia de grupos acetilos que bloquean la gelificación, éstas pueden ser modificadas químicamente (May, 1990). Se han publicado trabajos con respecto a la pectina de remolacha azucarera (Renard y Thibault, 1993; Michel et al., 1985; Rombouts y Thibault, 1986; Guillon y Thibault, 1989).

Otra materia prima conteniendo pectina potencialmente adecuada en cantidad es la de la semilla de girasol. El tejido blanco que contiene la semilla es rico en pectina de alto peso molecular que es muy rica en ácido galacturónico. Está también acetilada y tiene un DE bajo y parece tener un bajo nivel de almidón (Lim et al., 1976). Sin embargo, en las plantaciones es usual esperar hasta que la semilla se reblandece, etapa en la que el rendimiento de extracción de aceite es máximo. Por desgracia las semillas, entonces están a menudo infectadas por hongos con resultados desastrosos para la pectina (May, 1992). Se ha estudiado y caracterizado la gelificación de la pectina de semilla de girasol (Chang y Miyamoto, 1992).

Otro trabajo, (Fatah, 1987) concluye que la pectina producida a partir de cebolla puede ser comercialmente atractiva.

La pectina de melocotón se extrae a partir de materia prima generada en industrias concentradoras de zumo. En las áreas productoras de fruta dulce, la cantidad de orujo producido se estima que es el de mayor cantidad después del de manzana.

Para una operación industrialmente viable de extracción de pectina no es suficiente tener una materia prima de buena calidad; es necesario también, tener suficiente cantidad y precio bajo para que sea económicamente rentable.

La pectina de manzana se produce generalmente en una estación climatológica y en insuficiente cantidad dentro de un área para abastecer una factoría de pectina. El orujo es también difícil de procesar a menos que primeramente se seque y se guarde un tiempo.

El orujo, generalmente se compra a un determinado número de plantas de secado existentes en una área extensa. Lo mismo se puede decir para la pectina de melocotón.

La calidad de la materia prima es un tema concerniente al productor de pectina y tiene un considerable efecto sobre los costos de producción y las características del producto. Hay orujos de variedades que dan grandes cantidades de pectina de peso molecular probablemente elevado, pero otros pueden aportar quizá un mayor grado de esterificación. (May, 1990)

1.3.3. El proceso industrial de extracción de pectina

El proceso industrial de extracción de pectina se esquematiza en la [Figura 1-15](#)

Comercialmente la pectina se extrae tratando la materia prima con ácido mineral, caliente y diluido a pH bajo. **El intervalo preciso de tiempo varía con la materia prima, el tipo de pectina deseada y de una factoría a la otra** (May, 1990).

La pectina caliente extraída se separa del residuo sólido de la manera más eficiente posible. Esto no es fácil ya que los sólidos son blandos y la fase líquida es viscosa, incrementándose con la concentración de pectina y el aumento de su peso molecular. Hay una vinculación entre la extracción eficiente y la separación de los sólidos (ambos procesos favorecidos por una gran cantidad de líquido) con el coste operacional (favorecido por producir un extracto más concentrado). El extracto de pectina puede ser posteriormente clarificado mediante filtración a través de un filtro de kieselguhr. La pectina de manzana aún en fase líquida es tratada con α -amilasa (E.C. 3.2.1.1.) para degradar el almidón que podría precipitar a partir del líquido. También se añade carbón activo con el fin de eliminar el color. El extracto clarificado se concentra al vacío y preserva a la pectina de su degradación. La pectina en polvo se produce mezclando el líquido concentrado con alcohol (isopropanol, metanol o etanol).

La pectina se separa como una masa gelatinosa que se prensa, lava y elimina de las aguas madres. Más tarde se seca y se muele. Una alternativa al proceso de precipitación (Joseph y Havighorst, 1952), a menudo utilizada en el pasado y actualmente aún en uso en algunas plantas, es la coprecipitación con hidróxido de aluminio coloidal. Una de las ventajas es que el extracto de pectina no tiene que ser concentrado y ciertas impurezas son más rápidamente eliminadas. Por desgracia, las pectinas altamente esterificadas, de contenido mayor del 70% no precipitan bien con aluminio (Joslyn y de Luca, 1957) y la recuperación es más pobre que la del proceso con alcohol.

Estos procesos producen una pectina de alrededor del 70% DE llamada rapid set. Para producir otros tipos, deben hidrolizarse algunos ésteres metílicos. Esto se lleva a cabo comúnmente por la acción del ácido en una extracción prolongada en el líquido concentrado (May, 1990) o bien en condiciones alcalinas. El amoníaco se usa para desesterificar la pectina y algunos grupos amida se introducen en la molécula y se obtiene la pectina amidada.

El efluente ha llegado a tener mayor consideración en la industria de pectina; realmente los problemas de vertidos han llevado a algunas plantas al cierre. En la producción de pectina en polvo, al menos una cantidad idéntica de material no péctico orgánico, se

solubiliza de los azúcares y hemicelulosa en la materia prima. El material orgánico finaliza en la corriente acuosa a partir de la recuperación del alcohol, o, en una forma más diluida en las aguas madres a partir de la precipitación de aluminio. Se están incrementando los costes cada vez más y a veces es un problema serio para la empresa fabricante, si tratar estos efluentes o si pagar a la autoridad local para éste tratamiento.

1.3.4. Antecedentes en investigación sobre la extracción de pectina

En gran mayoría de trabajos, la pectina se extrae en forma suave del tejido vegetal a temperatura ambiente a fin de dañar mínimamente su estructura y poder estudiar sus características y estructura química.

En este tipo de procedimientos, se fracciona la extracción de manera que se recupera pectina soluble de distintas disoluciones (Rouse y Atkins, 1955) fraccionadas:

- a) Sólidos insolubles en alcohol (AIS)
- b) Pectina soluble en agua (WSP)
- c) Pectina soluble en oxalato (OXP)
- d) Pectina soluble en ácido (HP)
- e) Pectina soluble en álcali (OHP)

También se han utilizado las columnas de cromatografía de DEAE-celulosa para separar pectinas del bagazo de remolacha (Rombouts y Thibault, 1983).

Para recuperar la protopectina se recurre a la degradación del tejido con enzimas degradativas (Renard et al., 1991)

La extracción industrial se caracteriza por elaborarse a pH bajo y a temperaturas altas. Renard y Thibault (1993) comparan la extracción fraccionada suave con la industrial (condiciones drásticas) y concluyen que las pectinas resultantes de estas últimas condiciones contienen indudablemente artefactos y estructura degradada si se las compara con el primer tipo de extracción. Las pectinas obtenidas en la industria tienen valores inferiores tanto de sus viscosidades intrínsecas como de su grado de metilación y arrastran mayor cantidad de impurezas.

En cuanto a la metodología de extracción industrial, se han encontrado relativamente pocos trabajos. Como ya se ha referido anteriormente (May, 1990) cada empresa tiene su propia metodología.

Ihl et al., (1992) hacen un estudio comparativo de la precipitación de pectinas de bagazo de manzana con etanol y tricloruro de aluminio y concluyen que en general, el método de precipitación con etanol es el más adecuado en cuanto a rendimiento y calidad de pectina y, aunque el valor de DE es un poco más bajo que el que usa $AlCl_3$, no presenta inconvenientes metodológicos y el producto final no contiene residuos minerales nocivos para la salud del consumidor como podría suceder con la precipitación del $AlCl_3$

Los ácidos minerales más usados en la extracción industrial son: el clorhídrico, el nítrico y el sulfúrico. Huang (1973) compara el procedimiento general de extracción de pectina de corteza de cítrico usando ácido clorhídrico con uno propuesto usando una resina de

intercambio iónico (Amberlita IR-120) como extractante.

Generalmente se proponen valores de temperatura para la extracción de pectina con HCl que varían de 85 a 90°C, pH de 1,6 a 2,0 y tiempos de extracción de 30 a 60 minutos. Braddock et al.,(1976) extrajeron pectina a partir de corteza de limón con ácido nítrico a pH 1,8 y 80°C durante 60 minutos. Di Giacomo et al., (1986) también encontraron que las óptimas condiciones de extracción fueron de pH 1,5; 100°C y 45 minutos.

Aravantinos et al., (1992) reportan la influencia de la temperatura, tiempo de extracción y pH sobre las "unidades de gelificación" en pectina de naranja a pH 1,20; 1,60; y 2,00 y temperaturas de 75, 85, y 95°C a 20, 40 y 60 minutos.

Panchev et al., (1989) reporta sobre la correlación no lineal entre el rendimiento de extracción de pectina y el tiempo de extracción. Los mismos autores, (1988) utilizan una nueva tecnología de extracción de pectina de manzana con ultrasonidos, con aumento del rendimiento sobre la extracción sólido-líquido tradicional.

1.4. Aplicaciones de la pectina.

1.4.1. Aplicaciones de la pectina en la industria alimentaria

El uso de pectina en mermeladas de alto contenido de azúcar es una de las más conocidas aplicaciones a uno de los mercados más grandes para la pectina.

Las pectinas de alto metoxilo, en orden decreciente de su porcentaje de esterificación y de su rapidez en la formación del gel, se clasifican comercialmente en los siguientes tipos (Navarro y Navarro,1985)

La medida de la capacidad de gelificación de los geles azucarados de pectina está estandarizada y se mide en grados SAG, que se definen en 4.15

- a) Ultra rapid set 150° SAG (URS 150°)
- b) Rapid set 15° SAG (RS 150°)
- c) Medium rapid set 150° SAG (MRS 150°)
- d) Slow set 150° SAG (SS 150°)

Sus principales características se exponen en la Tabla 1-4 (Navarro y Navarro, 1985)

Característica	URS 150°	RS 150°	MRS 150°	SS 150°
% de esterificación	74-77	71-74	66-70	58-65
formación de gel (minutos)	1-3	4-8	15-25	30-120
pH de gelificación óptimo	3,1-3,4	3,0-3,3	2,8-3,1	2,6-2,9
pH de disolución al 1%	2,9-3,5	2,9-3,5	2,8-3,5	2,8-3,5
Cenizas totales (%)		5		
Pérdida por secado (%)		aprox. 12		
Arsénico (ppm)		menos de 3		
Plomo (ppm)		menos de 10		
Cobre (ppm)		menos de 60		
Gérmenes patógenos		ausencia		
Gérmenes totales por gramo		menos de 1000		
Aspecto		polvo fino de color crema		
Granulometría		rechazo inferior al 1% en tamiz de abertura		

Tabla 1-4

Características de las pectinas alimenticias de alto metoxilo (HM). Valores límites.

Dentro de la UE hay dos estándares, mermelada y extramermelada conteniendo con algunas excepciones un mínimo del 30% o 45% de pulpa de fruta respectivamente.

La alta calidad de la mermelada tiende también a ser hecha con fruto de mayor calidad, lo que implica menor cantidad de pectina. La Tabla 1-5 (May, 1990) indica que los frutos requieren alta, moderada o pequeña adición de pectina

ALTA $\geq 0,3\%$	MEDIA (aprox. 0,3%)	BAJA $\leq 0,3\%$
Cereza	Albaricoque	Manzana
Pera	Mora	Grosella negra
Melocotón	Frambuesa norteamericana	Grosella roja
Piña		Guava
Frambuesa		Ciruela
Fresa		

Tabla 1-5

Adiciones relativas de pectina de HM a mermeladas y confituras.

Las mermeladas a menudo están hechas a partir de concentrados de frutos despectinizados y entonces requerirán gran cantidad de pectina añadida del tipo de fruto en cuestión.

Las pectinas de alto metoxilo son usadas solamente en jaleas estándar por encima del 60% de sólidos solubles. Algunos países, ahora, permiten reducir el azúcar hasta el 30-55% de sólidos solubles o un porcentaje aún inferior.

La selección de la pectina correcta es importante (la que es efectiva al contenido de menor cantidad de sólidos solubles y la de más sensibilidad al calcio, será la pectina que debería usarse) pero el contenido en fruto es también importante. A veces, especialmente en bajo contenido de sólidos solubles, es necesario añadir sal de calcio para obtener el mejor resultado. Ocasionalmente se añaden gomas neutras para reducir la sinéresis. Es muy importante el control de pH.

Pueden prepararse gamas de glaseados para pastelería y flanes, mediante una formulación con pectina de bajo metoxilo amidada y secuestrante calcio como difosfatos.

Una área creciente de la producción de frutos en los últimos años ha sido la producción de bases de frutos para la adición a yogourts y productos similares. Estas bases de frutos que contienen entre el 20 y 60% de azúcar han sido elaboradas con almidones modificados como espesantes. A pesar de lo económico de su precio, presentan problemas como el enmascaramiento del aroma y textura irregular y han sido sustituidos ventajosamente por pectina de bajo metoxilo amidada.

La pectina tiene también otros usos en las industrias lácteas. La pectina de alto metoxilo preserva a los productos lácteos de la agregación de caseína cuando se calienta a

valores de pH inferiores a 4.3. Este efecto se usa para estabilizar los yogourts bebidos y tratados con UHT y también para mezclas de leche y zumos de fruta. También estabiliza bebidas lácteas acidificadas con soja y productos basados en el trigo, donde evita la precipitación de proteínas. El yogurt puede espesarse mediante la adición de niveles muy bajos de pectina de bajo metoxilo amidada.

Las bebidas de bajas calorías son muy claras (de textura) y tienen la falta característica de sensibilidad a la boca que proporciona el azúcar en los refrescos convencionales. Puede usarse pectina para mejorar la textura de tales productos y, así, reemplazar a la pulpa del fruto en tales productos.

En los sorbetes, helados y polos, la pectina puede usarse para controlar el tamaño del cristal. En los polos retiene los aromas y colores, que normalmente tienden a salir de la estructura del hielo.

La gelatina ha sido la base tradicional para los postres de jaleas. Se formulan con pectinas amidadas de bajo metoxilo que proporciona la textura y el punto de congelación adecuados.

1.4.2. Aplicaciones de la pectina en la industria farmacéutica

A nivel familiar se conoce desde hace mucho tiempo la acción favorable de la manzana rayada en el tratamiento de las diarreas, sobre todo en el caso de los niños. Esta característica, y otras que se han ido poniendo de manifiesto, justifican la utilización de las pectinas como materia prima en la elaboración de un buen número de preparados farmacéuticos (Kertesz, 1951).

La base de las aplicaciones farmacéuticas de la pectina son sus propiedades hidrocoloidales y terapéuticas. Además, frecuentemente produce un efecto de sinergia y aumenta la acción de otros principios activos componentes de la especialidad. (Navarro y Navarro, 1985).

La acción antidiarréica es la propiedad más universalmente conocida, incluso antes de descubrirse la molécula de pectina. Este efecto se acompaña frecuentemente de una acción antivomitiva, permitiendo a los niños de corta edad asimilar y tolerar mejor los alimentos, en particular leches y productos lácteos, y es, sin duda, consecuencia del papel de protector y regulador del sistema gastrointestinal (Pilnik y Zwiker, 1970). En este sentido, las pectinas de alto metoxilo asociadas a otros principios activos, tienen una gran utilización en los tratamientos de gastritis y úlceras, ya que al ser ingerida cubre las paredes estomacales de una especie de película más o menos gelificada, y la protege de hipersecreciones gástricas y biliares. Su acción en la pared intestinal es análoga; además, se añade una acción desintoxicante, debido al poder adsorbente y secuestrante de la macromolécula péctica, que permite la inhibición de toxinas. Esta propiedad se utiliza a veces en casos de envenenamiento por metales. (Navarro y Navarro, 1985).

Durante estos últimos años ha habido un gran incremento del interés sobre el tipo y la cantidad de fibra en los alimentos y el papel de varias fibras que se consumen con la salud humana. Parte del incremento del interés es debido a la asociación que se ha comprobado que

existe entre las dietas de bajo contenido en fibra y la enfermedad diverticular del colon, cáncer de colon y otras enfermedades del tracto intestinal (Spiller y Freeman, 1981), isquemia cardíaca (Huang et al., 1978) y diabetes (Anderson, 1982).

La fibra vegetal conteniendo pectina no es absorbida en el intestino delgado y llega al intestino grueso sufriendo en mayor o menor grado, fermentación en el colon.

Las dietas que contienen pectina incorporada a un alimento parecen ser mejor toleradas y pueden consumirse mayores cantidades que cuando se consume la pectina en polvo o en cápsulas. El consumo de pectina por individuos normales o hipercolesterolémicos se ha comprobado que ha tenido como efecto la disminución de los niveles de colesterol en la sangre sin cambiar los niveles de triglicérido o HDL. La mayor disminución comprobada del colesterol sanguíneo fué en los sujetos hipercolesterolémicos. Las dietas de bajo contenido en grasa y dietas suplementadas con más de 6 g de pectina/día generalmente producen el mayor cambio en los niveles de colesterol (Jenkins et al., 1975). En la excreción intestinal se comprobó que los lípidos tales como esteroides, ácidos biliares y otros quedaban atrapados en el gel de pectina y no podían ser absorbidos en el intestino delgado (Judd y Truswell, 1982).

El consumo de pectina por individuos normal y diabéticos produce disminución de la curva de respuesta de glucosa después de las comidas con dosis de pectina adicionada. La curva de respuesta de insulina también decreció de manera similar en respuesta a la pectina en, aproximadamente, dos tercios de los estudios en que se midió la insulina (Kanter et al., 1980).

La hipoglicemia y el síndrome de reflujo gástrico disminuyeron y mejoraron respectivamente cuando era consumida pectina con la comida (Luds et al., 1977).

Se han llevado a cabo estudios a largo plazo sobre la alimentación con pectina en relación con la glucosa, insulina u otros parámetros glucogénicos. Se necesita más investigación antes de recomendar de una manera segura a los diabéticos como dieta reductora de su glucosa sanguínea (Behall y Sheldon, 1986).

El efecto del consumo de pectina sobre el balance mineral, no ha sido estudiado extensivamente, a pesar de que la excreción y el balance de la mayoría de minerales parece que no es afectado por la pectina en la dieta (Cummings et al., 1979). La utilización del hierro o su absorción puede ser afectada por el consumo de pectina, pero estudios más largos en nutrición no reportan cambios significativos en el balance aparente con respecto a los niveles de control (Lei et al., 1980). Se necesitan, sin embargo, estudios a más largo plazo.

La interacción de pectina en vitaminas ha sido estudiada muy poco en personas y animales. El consumo de vitamina C con pectina, puede ser beneficioso a las personas hipercolesterolémicas (Ginter et al., 1979). La absorción de vitamina B₁₂ parece reducirse con pectina (Cullen y Oace, 1978) mientras otras vitaminas estudiadas no muestran reducción en su biodisponibilidad (Ristow et al., 1982).

1.4.3. Otras aplicaciones de la pectina

Además de las aplicaciones expuestas anteriormente, puede citarse otras (Endress,

1991) que también son importantes en otros campos. Así, se utiliza pectina en:

- Uso en odontología
- Productos cosméticos
- Manufactura de cigarrillos
- Medios de cultivo en microbiología
- Conservación del suelo
- Alimentación animal.

La pectina es, en consecuencia, algo más que el "material que produce mermelada". Es una materia versátil y sin peligro para la salud que se deriva de fuentes naturales y puede ciertamente pretender ser un aditivo alimentario con una imagen muy saludable que contrasta con las implicaciones en los riesgos sobre la salud de muchos aditivos (May, 1990).



2. Objetivos

2.1. Estudio de la extracción de la pectina a partir del bagazo en medio ácido (HNO 3)

Se trata de efectuar diferentes extracciones de pectina de melocotón a diferentes condiciones de trabajo, con el objetivo de ver cuales son las óptimas, es decir, en las que la extracción de pectina es máxima. En el proceso de las extracciones se trata de seguir el modelo industrial de extracción.

- Se estudiará la extracción a diferentes pH y a distintas temperaturas.

Interesa observar qué influencia tiene la temperatura y el pH de la dispersión acuosa del bagazo en el reactor químico en el que se efectuará la extracción, así como su tiempo de permanencia, sobre la cantidad de pectina extraída. Se intentará ajustar los valores de estos parámetros a algún modelo cinético, que permita obtener una expresión que facilite cálculos posteriores.

-Se intentará determinar la cantidad de fibra que resta después de las extracciones. En la industria extractora de pectina, esta fibra es un residuo a eliminar e interesa conocer sus niveles ya que para la industria su eliminación supone un problema cuando se trata de grandes cantidades.

2.2. Caracterización de la pectina extraída

Una vez se ha extraído la pectina, se ha de caracterizar químicamente con el objeto de determinar la calidad de la misma. Se determinará también la viscosidad intrínseca como característica física, parámetro importante al tratarse de un biopolímero. En todos los casos se estudiará la influencia de los parámetros de extracción (temperatura, pH y tiempo) sobre las características determinadas. Se determinarán por tanto las siguientes características que se describen a continuación:

-El grado de metoxilación (D.E.), es una característica química de la pectina y que está relacionada con la capacidad de gelificación. El poder gelificante es una de las características más importantes de las pectinas. Sería positivo que tuviese un grado de metoxilación elevado ya que indicaría que gelifica con facilidad.

Uno de los objetivos importantes sería establecer las consecuencias sobre el grado de metoxilación al variar las condiciones de extracción.

-La riqueza en ácido galacturónico (AGA) dará una idea de la pureza de la pectina extraída. El porcentaje de AGA es una constante de la pectina de cada variedad de fruto y hay que tener en cuenta de que el AGA en la pectina viene acompañado de azúcares neutros como pueden ser la D-galactosa, L-arabinosa y L-ramnosa. Pero en las extracciones de pectina, el AGA se verá acompañado también de impurezas que no son componentes de la pectina.

- **El porcentaje de grupos acetilo**. La pectina de buena calidad tiene un bajo porcentaje de grupos acetilo (generalmente menor del 3%). Las pectinas de alto contenido de estos grupos tienen una baja capacidad de gelificación.

- **El contenido en almidón (impureza).** El almidón es un componente muy importante de las manzanas aunque no tanto en el melocotón, pero hay que sospechar el "arrastre" de este componente juntamente con la pectina en el proceso de extracción.

-**El contenido en proteína (impureza).** Al igual que el almidón. Los tejidos vegetales de melocotón, contienen del 2 al 7 % de proteína y hay que tener en cuenta que en los tejidos hay proteínas imbricadas dentro de las largas moléculas de pectina y hay que sospechar lo mismo que en el apartado anterior.

-**La viscosidad intrínseca.** Es una característica física muy importante de las pectinas que se relaciona con la longitud y forma de la molécula.

-**El peso molecular.** Es la característica química más importante en cualquier biopolímero y, en el caso de la pectina se relaciona tanto con la viscosidad de sus dispersiones coloidales como de su poder gelificante.

- **La calidad.** Se hará un intento de relacionar variables que nos puedan definir la calidad, aunque de una manera muy acotada.

2.3. Estudio cinético de la degradación enzimática de la pectina

En este apartado se pretende modelizar la degradación de la pectina extraída mediante las enzimas poligalacturonasas de una mezcla industrial de enzimas pectolíticas. El objetivo de este estudio es el de determinar el mejor modelo cinético, así como los valores de las constantes, para conocer la degradación enzimática y tener, en consecuencia, una mayor comprensión del proceso de clarificación enzimática de zumos de fruta. Debe por lo tanto procederse a:

- **La determinación de la actividad exo y endopoligalacturonásica de una mezcla de enzimas industriales pectolíticas y establecer una relación entre ambos tipos de actividad.**

Antes de la degradación enzimática de la pectina extraída hay que determinar la actividad hidrolítica de las enzimas que van degradando la pectina separando unidades de ácido galacturónico por cada extremo de la cadena (exopoligalacturonasas), como las que hidrolizan los enlaces internos (endopoligalacturonasas).

- **Al ajuste de la degradación enzimática de la pectina a un modelo cinético.**

Se efectuará un estudio de la degradación enzimática de la pectina extraída por las enzimas poligalacturonasas de la mezcla industrial de enzimas pectolíticas ya caracterizada. Se investigará el mejor modelo al que se ajusten los datos obtenidos y se determinarán la constantes cinéticas globales del proceso.

2.4. Caracterización reológica de los geles de pectina

La finalidad de este trabajo es hacer un estudio lo más amplio posible sobre el comportamiento reológico de geles de pectina de melocotón extraída a diferentes condiciones. Para este estudio deberá procederse:

- A la obtención de reogramas y discusión de los mismos.

Este estudio servirá para determinar el tipo de comportamiento reológico independiente del tiempo de los geles.

- A la modelización del efecto de la temperatura, del efecto de la concentración y de ambos parámetros sobre la viscosidad.

Se desea obtener las ecuaciones que den en todo momento el mejor ajuste de la viscosidad del gel en función de las condiciones de temperatura y concentración.

- A la caracterización tixotrópica de los geles

ya que dará en cada caso una idea de la cantidad de estructura interna que tiene el gel así como de la velocidad de destrucción de la estructura interna, también se verá como se ajusta la variación del esfuerzo cortante con el tiempo al modelo de Figoni y Shoemaker (1983).

- A la caracterización viscoelástica del proceso de gelificación,

determinándose los valores de los parámetros G' y η y se estudiará su evolución con el tiempo en que se vaya formando cada gel. Se intentará también observar la influencia que la temperatura y concentración de la pectina ejercen sobre los valores obtenidos de los citados parámetros.

BIBLIOTECA VIRTUAL



3. Plan de investigación

Para alcanzar los objetivos planteados, se ha elaborado el siguiente plan de trabajo:

* **Actualización y análisis de la información bibliográfica disponible.**

Recurriendo para ello a bases de datos bibliográficas por ordenador y revistas de resúmenes, en primer lugar. Todo ello va conduciendo las consultas a las revistas especializadas en el tema de este trabajo como son por ejemplo:

Carbohydrate Polymers
Carbohydrate Research
Journal of Food Science
Journal of Food Science and Agriculture
Etc., etc.,

y muchas otras revistas básicamente de ciencia y tecnología de alimentos.

* **Planteamiento de las experiencias a realizar de las distintas etapas que deberían constituir el proceso.** Esquematizando el objetivo o los objetivos del trabajo con el fin de planificar todo un conjunto de experiencias que a priori se consideran factibles de realizar con los medios disponibles

* **Selección y puesta a punto de los métodos analíticos y de medidas físicas a utilizar.** Recopilando los métodos adecuados (de acuerdo con la bibliografía) a las determinaciones de la pectina, seleccionando en primer lugar aquellos en los que se tiene experiencia por haberse utilizado anteriormente. Para los métodos en los que no se ha experimentado antes, una vez se ha recopilado el material y reactivos, deben probarse repetidas veces hasta que los resultados muestren una completa repetibilidad y fiabilidad con patrones de referencia.

* **Preparación y ensayo de los equipos y montajes a utilizar.** En el equipo y montaje de extracción de pectina hay que asegurar que las condiciones de extracción sean las que se fijan experimentalmente sin variar. Para ello hay que comprobar una perfecta unión de las piezas de montaje. Un control sin variación de la temperatura por parte de los termostatos, un flujo constante de agua de atemperación, una velocidad de agitación adecuada e igual para todas las muestras y un equipo de filtración al vacío eficiente.

* **Toma de muestras y realización de las experiencias de las distintas etapas.** La toma de muestras debe realizarse de una manera sistemática e idéntica para todas las muestras.

* **Realización de las determinaciones analíticas y medidas físicas**

* **Análisis de los datos e interpretación de los resultados**

* **Elaboración de conclusiones.** Basándose en el análisis estadístico.

4. Material y métodos

4.1. Obtención de muestras

Las muestras de bagazo han sido suministradas por la empresa Indulleida S. A. de Alguaire (Lleida) cuya actividad es la producción de concentrados de zumos de fruta a partir de la fruta fresca.

La obtención del bagazo desecado se ha conseguido después de las operaciones indicadas en la [Figura 4-1](#).

La fruta utilizada ha sido fruta de calidad no comercial (patologías, bajo calibre, afectada por pedrisco, etc.) suministrada a la empresa por agricultores de la comarca del Segriá (Lleida) y limítrofes. Se emplean todo tipo de variedades de fruta mezclada.

Las variedades de procedencia son las mayoritarias de la comarca (melocotón Sudanell, Baby Gold, etc.) y el grado de maduración de la fruta del proceso, en general corresponde a la de la fruta de recolección por transportarse a la empresa en ésta época.

Se ha obtenido de la empresa un lote de 50 kg. en saco de bagazo de melocotón. Este saco se ha almacenado en frigorífico a 2°C durante todo el tiempo que ha durado el siguiente estudio.

El bagazo suministrado ha sido analizado por la propia empresa con el siguiente resultado.

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO

Contenido total en fibra	54%
Soluble	19%
Insoluble	Resto
Humedad	8%
Grasa	<3%
Proteína (Kjeldhal)	7,5%
Cenizas (a 550°C)	3,0%

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Recuento total	< 1000 ufc/g
Levaduras	< 100 ufc/g
Mohos	< 100 ufc/g
Salmonella	Ausencia
Otros patógenos	Ausencia

DATOS FISIOLÓGICOS

Aporte calórico	150-170 Cal/100g
Capacidad de retención de agua (diálisis)	3,5-4,3 g agua/g

DATOS ORGANOLÉPTICOS

Color	Marrón claro
Sabor	Muy suave a melocotón

VARIEDADES

Melocotón de procedencia española

PRESENTACIÓN

En polvo

Tabla 4-1

Características físico-químicas del bagazo de melocotón.

4.2. Toma de muestras, preparación y análisis

El muestreo se ha efectuado de la manera siguiente: habiéndose suministrado el bagazo en un saco, se procede en primer lugar a mezclar su contenido y mediante un vaso de vidrio de 100 ml se recogen las siguientes muestras:

Muestra del lado derecho del fondo del saco

"	"	"	izquierdo	"	"	"	"
"	"	"	derecho del centro	"	"	"	"
"	"	"	izquierdo	"	"	"	"
"	"	"	derecho de la superficie del saco	"	"	"	"
"	"	"	izquierdo	"	"	"	"

Estas muestras se van colocando previamente en una bolsa de plástico, se mezcla el contenido de la bolsa, quedando el bagazo listo para efectuar la extracción de pectina.

Antes de efectuar la extracción de pectina a partir del bagazo, éste debe estar completamente desecado. Para ello se hace una previsión de la cantidad de bagazo que va a utilizarse durante una jornada y se coloca durante toda la noche a 40°C en estufa una cantidad ligeramente superior a la que se ha previsto para las pruebas.

Debido al largo tiempo que requiere la extracción (de 4 a 6 muestras de pectina en 8 h de trabajo diarios) se ha efectuado una extracción para cada uno de los parámetros experimentales de extracción fijados (temperatura, pH y tiempo) repitiéndose a posteriori las extracciones que se ha comprobado que presentaban valores anómalos.

Una vez extraída la pectina y antes de proceder a su análisis, se deseca a 40° C en estufa de vacío. Se efectúan dos análisis por muestra.

Las disoluciones acuosas de pectina se han preparado adicionando pequeñas cantidades de pectina secada en estufa de vacío a un tubo de ensayo con agua a unos 80° C y rápidamente agitando en un agitador de tubos. Con esta técnica se pueden preparar disoluciones con un máximo de hasta aproximadamente un 10 % de pectina totalmente solubilizada (Copenhagen Pectin,1985)

4.3. Extracción de las muestras de pectina

Se efectúan en el montaje de la [Figura 4-2](#)

AGITADOR "HEIDOLPH" RZR-1

Características técnicas:

Accionamiento

Motor de polos separados

Tensión	220/50 Hz
Potencia	77 W
Mecanismo	De fricción de regulación mecánica continua
Gama de revoluciones	35-250 r.p.m.

Se ha dispuesto además de un rotavapor con baño termostático y un equipo de filtración en vacío. El rotavapor tiene las siguientes características:

ROTAVAPOR "LABO ROTA" C-311

Tensión	230 V/ 50 Hz
Potencia	1385 W
Gama de revoluciones	0-300 r.p.m.

Para proceder a la extracción de pectina, se vierten dentro del reactor termostatzado a la temperatura deseada, 500 ml de agua desionizada y se ajusta al pH fijado en el experimento con ácido nítrico (70 %) y se pone en marcha el agitador del reactor.

Se agregan 20,0 g de bagazo al reactor y se comienza a medir el tiempo de extracción fijado cuando todo el bagazo se haya mojado en la disolución ácida.

Mientras discurre la extracción en el reactor, puede prepararse el lecho filtrante para la filtración posterior. Para ello se diluyen 3 ó 4 cucharadas de tierra de diatomeas blanca y se pasa esta solución por un Buchner mediano (10 cm aproximadamente) con papel de filtro apropiado, utilizando la bomba de vacío. Se lava hasta que el filtrado salga limpio.

En extracciones muy largas (más de una hora) o a temperatura de 80° C será necesario verificar que el volumen del reactor no disminuya por evaporación. En caso contrario agregar agua desionizada hasta el nivel inicial.

Al cumplirse el tiempo deseado, se abre la llave inferior del reactor y se deja que la solución ácida con el bagazo escurra a través de un cernidor de alambre. Se detiene el cronómetro cuando haya escurrido casi todo el líquido y anotar este tiempo (t). Se exprime un poco más el bagazo húmedo (por ejemplo con el fondo de un matraz redondo)

Se filtra en caliente la solución ácida (una o dos veces hasta que esté medianamente transparente). Será necesario raspar suavemente la superficie de diatomeas para que filtre.

Se evapora hasta aproximadamente 1/4 ó 1/5 del peso inicial del filtrado (generalmente alcanza con evaporar algo más de 300 ml de agua).

Se recoge el concentrado, se enfria y se agrega igual volumen de alcohol etílico del 96 % en una probeta de 500 ml. Se agita suavemente (conviene tapar e invertir la probeta un par de veces).

Después de 3 ó 4 horas se filtra el coágulo en un cernidor de alambre. Al filtrado se le agrega un poco más de alcohol etílico del 96 % y se refiltra (esta etapa es importante porque

la primera vez pasa por el cernidor mucha pectina). Se escurre este coágulo lo más posible, se pasa a un vaso de precipitados y se lava en alcohol etílico del 70 %. Cernir. Se repite el lavado con etanol del 96 % (en cantidad abundante) y se recoge todo el alcohol etílico que se puede recuperar con el rotavapor.

La pectina coagulada se coloca en un vidrio de reloj (previamente pesado) y se pone a secar toda la noche en estufa a 55-60° C. Posteriormente se enfría en desecador. Se registra el peso total, vidrio más pectina y se calcula el % de pectina del bagazo.

Se muele la pectina desecada en molinillo y se hace pasar por un tamiz de 20 mallas. Finalmente se introduce en un tubo de ensayo de plástico y se cierra herméticamente guardándose en frigorífico a 2-4 °C para posteriores determinaciones fisicoquímicas.

$$\% \text{ de pectina} = (\text{g pectina} / \text{g bagazo}) \cdot 100$$

4.4. Determinación de la riqueza de las muestras de pectina en ácido galacturónico (AGA)

INSTRUMENTAL

Estufa de vacío

Agitador de tubos

Espectrofotómetro Phillips PV 8720 UV/VIS

REACTIVOS

Ácido galacturónico (Sigma)

m-Hidroxidifenil (Aldrich)

Se sigue un método espectrofotométrico de determinación cuantitativa de ácidos urónicos, que se basa en la reacción del producto procedente de la acción en caliente del ácido sulfúrico sobre el ácido galacturónico con el reactivo cromóforo m-hidroxidifenil para dar un compuesto coloreado que tiene un máximo de absorbancia en la longitud de onda correspondiente a 520 nm (Ahmed y Labavitch, 1977)

El uso del m-hidroxidifenil como reactivo cromóforo tiene las ventajas de la sensibilidad y especificidad respecto de los ácidos urónicos en relación con los azúcares solubles, y de estabilidad del color formado en el tiempo (Carbonell et al., 1990)

Estas ventajas de especificidad y reproductibilidad han estado comprobadas por distintos investigadores (De Giorgi et al., 1985; List et al., 1985)

Las muestras de pectina obtenidas tal como se ha descrito en el apartado 4.3 se secan al vacío durante toda una noche a 60 °C, se pesan y se prepara una disolución acuosa de pectina. Juntamente con las muestras deben prepararse disoluciones con concentraciones conocidas de ácido galacturónico con el fin de construir la recta de calibrado.

4.5. Determinación del grado de esterificación en las muestras de pectina

El grado de esterificación se determinó usando el método de valoración de Schultz y Schweiger (1965), cuyo protocolo es el siguiente:

Se valoran 10 mL de disolución de pectina al 1 % con NaOH 0,1 N, usando fenolftaleína como indicador (valoración A) Se añaden 20 mL de NaOH 0,5 N y se esperan 30 minutos con el fin de desterificar la pectina.

A continuación se añade 20 mL de HCl 0,5 N para neutralizar el NaOH. Finalmente la disolución se valora con NaOH 0,1 N (valoración B). El grado de esterificación se calcula con la siguiente ecuación:

$$DE = \frac{B}{A + B} \cdot 100$$

4.6. Determinación del contenido en almidón en las muestras de pectina

INSTRUMENTAL Y REACTIVOS

Espectrofotometro (4.4)

Dimetilsulfoxido (Sigma)

Kit enzimático n° 207748 de Boehringer Mannheim.

Se prepara una disolución acuosa de pectina y se trata con dimetilsulfóxido con el objeto de convertir el almidón en una forma soluble (Boehringer Ingelheim; Boehringer Mannheim, 1989) a continuación se procede al análisis enzimático que consiste en la hidrólisis del almidón a D-glucosa por la acción de la enzima amiloglucosidasa. La enzima hexoquinasa fosforila la D-glucosa a glucosa-6 P; ésta es oxidada por la enzima glucosa-6-P deshidrogenasa en presencia de la nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato (NADP) a gluconato-6-P, formandose NADPH. La cantidad de NADPH formada equivale a la concentración de D-glucosa aparecida por la hidrólisis del almidón, y se puede medir por su absorbancia a 340 nm (Boehringer, M., 1991)

4.7. Determinación del porcentaje de grupos acetilos en las muestras de pectina de melocotón

APARATOS Y REACTIVOS

Espectrofotómetro, ya descrito en el apartado 4.4

Kit enzimático n° 148 261 de Boehringer Mannheim

Consiste en la saponificación de las muestras con NaOH 1 N con el fin de liberar los grupos acetilos y transformarlos en ácido acético (Miyamoto y Chang, 1992). El ácido acético se transforma en acetyl-CoA por reacción con ATP y CoA y el acetyl CoA en citrato por reacción con oxalacetato en dos reacciones sucesivas. Ambas reacciones son catalizadas por las enzimas acetyl CoA sintetasa y citrato sintetasa respectivamente.

El oxalato necesario para la segunda reacción se obtiene del malato y de la NAD en

presencia de la enzima malato deshidrogenasa (MDH). En ésta última reacción, el NAD se reduce a NADH y la cantidad de ésta última sustancia formada es medible y se determina por su absorción a 340 nm. En este caso la concentración medida de NADH es idéntica a la de ácido acético. (Boehringer Mannheim, 1991)

$$\% \text{ de grupos acetilo} = \frac{\text{g de ácido acético}}{\text{g de pectina}} \cdot 100$$

4.8. Determinación del contenido en proteína en las muestras de pectina

MATERIAL

Digestor para tubos Kjeldahl BUCHI

Destilador para tubos Kjeldahl BUCHI

Se ha utilizado el método de Kjeldahl (Osborne y Voogt, 1978) en el que la pectina se digiere con ácido sulfúrico concentrado utilizando sulfato de cobre como catalizador para convertir el nitrógeno orgánico en iones amonio. Se añade álcali y el nitrógeno liberado se destila hacia un exceso de solución de ácido bórico. El destilado se titula con ácido clorhídrico para determinar el amoniaco absorbido por el ácido bórico. El contenido en proteína bruta resulta del siguiente cálculo:

$$\text{Proteína bruta (\%)} = \frac{(V_2 - V_1)N}{W} \cdot 1,4 \cdot 6,25$$

En la que:

W es el peso de la muestra

V₂ es el volumen de HCl requerido para la prueba en blanco

V₁ es el volumen requerido para la muestra problema

6,25 es el coeficiente de transformación de N en proteína

La digestión se realizó en tubos especiales de vidrio (Kjeldahl) introducidos en un bloque digestor calentado con resistencia y la destilación se realizó en un destilador automático Büchi

4.9. Determinación del peso molecular de muestras de pectina de melocotón

Se determina el peso molecular de muestras seleccionadas. Una porción alicuota de cada una de estas muestras se purifica posteriormente mediante etanol con clorhídrico al 5 % (Ihl et al., 1992). También se determina el peso molecular de las muestras purificadas.

La determinación del peso molecular se realiza mediante la técnica de la

cromatografía de exclusión molecular mediante HPLC, inyectando pectina disuelta en el cromatógrafo. Como patrones internos se utilizan estándares de dextrano de peso molecular de 1080-401000 que se disuelven en el eluyente (Copenhagen Pectin, 1991).

Las condiciones del análisis por HPLC son:

Cromatógrafo: Waters 600
Columna 1: TSK Gel 4000 PUV * L
Columna 2: Ultrahidrogel 250
Columna 3: Ultrahidrogel 120
Disolvente: Acetato amónico 0,4 M
Flujo: Isocrático
Detector: De dispersión de luz

El peso molecular medio de cada banda se determina usando su tiempo de retención y la curva de calibrado. El área y el peso molecular medio de cada banda se usan para calcular los pesos moleculares medios M_w , siendo

$$M_w = \frac{\sum [(\text{Área}) (M)]}{(\text{Área})}$$

donde:

(Area) es el área de cada banda

(M) es el peso molecular de cada banda

4.10. Determinación de la viscosidad intrínseca de muestras de pectina

MATERIAL

Viscosímetro capilar Oswald 100
Baño termostatzado

Las viscosidades intrínsecas se determinan midiendo 6 tiempos de flujo de soluciones de pectina de una misma muestra a 4 concentraciones distintas a 30°C en el viscosímetro capilar. El disolvente es una disolución acuosa conteniendo Na_2EDT 5 mM y NaCl 0,155 M. con el pH ajustado a 5.

Se obtiene la densidad de cada concentración a 30°C mediante picnómetro y a partir de estos valores se determina la viscosidad de la dispersión mediante la expresión $\eta = k \cdot t \cdot d$ (1),
siendo:

η la viscosidad en $\text{mPa}\cdot\text{s}$

k la constante del viscosímetro capilar a 30°C

t el tiempo de flujo en segundos

d la densidad de la disolución en kg/L

A pesar que las unidades de viscosidad cinemática deben expresarse en poises o su submúltiplo centipoises, se unifican las unidades de viscosidad de este trabajo usándose las unidades de viscosidad dinámica mPa•s con el objeto de poder comparar datos obtenidos en distintos apartados.

Una vez obtenido el valor de η , se determina la viscosidad específica mediante:

$$\eta_{sp} = (\eta / \eta_{agua}) - 1$$

siendo:

η_{sp} la viscosidad específica (adimensional)

η la viscosidad de la solución, en mPa•s

η_{agua} la viscosidad del agua, en mPa•s

Se determina la constante del viscosímetro solo con agua destilada desaireada, y en la representación η / concentración frente concentración, el valor de la ordenada en el origen corresponde al parámetro viscosidad intrínseca de la muestra, $[\eta]$ (Owens et al., 1946)

4.11. Determinación de la actividad exopoligalacturonásica de una mezcla industrial de enzimas pectolíticas

INSTRUMENTAL Y REACTIVOS ESPECIALES

Espectrofotómetro (4.4)

Centrífuga ALC 4218

m-hidroxidifenil (Aldrich)

Acido cítrico

Bifosfato sódico

Polipectato sódico (Sigma)

Mezcla industrial de enzimas pectolíticas obtenida de *Aspergillus Niger* (suministrada por Indulleida S.A.), con las siguientes características:

temperatura de actividad máxima: 45°C

contenido en proteína enzimática: 4 mg/mL

cronómetro con medidas hasta 1/100 s

El fundamento del método consiste en que a un tiempo determinado y controlado, la enzima degrada ácido poligalacturónico (patrón puro) liberando moléculas de AGA de sus extremos. La reacción finaliza mediante la acción combinada de la disminución del pH hasta 1,80 (con lo que se anula la actividad enzimática) con la centrifugación del medio. El sobrenadante resultante contiene los ácidos urónicos que son objeto de cuantificación. El pH de la degradación enzimática se ha controlado con tampón ácido cítrico-bifosfato sódico.

Para adaptar la cantidad de ácidos urónicos presentes en el medio dentro del margen de posibilidades de lectura del colorímetro, previamente se diluye el contenido del sobrenadante en una proporción adecuada y diferente según el ensayo.

Los ácidos urónicos se tratan con un medio sulfúrico en caliente y se miden colorimétricamente a 530 nm por medio de la reacción con el cromóforo m-hidroxidifenil (Lanzarini et al., 1984)

4.12. Determinación de la actividad endopoligalacturonásica de una mezcla industrial de enzimas pectolíticas

MATERIAL Y REACTIVOS ESPECIALES

Viscosímetro capilar Ostwald 100

Baño termostatzado

Cronómetro con medidas hasta 1/100 s

Polipectato sódico (Sigma)

Acido cítrico

Bifosfato sódico

Mezcla industrial de enzimas pectolíticas de *aspergillus niger* (de características descritas en 4.11)

La determinación específica de la actividad endo-poligalacturonásica se lleva a cabo viscosimétricamente, ya que esta enzima se encuentra acompañada de exo-poligalacturonasa, y de esta manera se evita que se haga necesario el aislamiento.

El fundamento se basa en determinar el cambio de viscosidad de una disolución de ácido poligalacturónico puro (polipectato) debido a la actuación de la enzima.

La unidad de actividad endo-poligalacturonásica se define arbitrariamente como la cantidad de enzima que provoca un descenso de una unidad de viscosidad en un minuto en las condiciones de las experiencias.

Para la medida se utiliza un viscosímetro Ostwald 100 termostatzado.

El control del pH se efectúa tamponando la disolución con ácido cítrico- bifosfato sódico.

Para evitar una concentración de solutos demasiado alta, la disolución también se utiliza más diluida que en caso de la actividad exo-poligalacturonásica, vigilando, sin embargo, que se mantenga su potencial regulador.

4.13. Reología de las muestras de pectina

4.13.1 INSTRUMENTAL

Las medidas reológicas se realizan en un viscosímetro de cilindros concéntricos ROTOVISCO RV -12 (Haake).

El equipo de medida de este viscosímetro, se encuentra representado en la [Figura 4-3](#), y sus características principales en la [Figura 4-4](#) y el subsiguiente esquema en la Tabla 4-2.

Gracias al sistema de atemperación con el que está dotado el equipo, es posible fijar la

temperatura deseada en el interior del vaso que contiene el fluido a medir.

EQUIPO DE MEDIDA NV		
ROTOR	Radio R ₂ ; R ₃	18,85; 20,1
	Altura L (MM)	60
RECIPIENTE DE MEDIDA	Radio R1; R4 (mm)	17,5; 20,5
RELACIÓN DE RADIOS	R _a /R ₁	1,02
VOLUMEN DE LLENADO	V (cm ³)	9
TEMPERATURA	Max (°C)	100
	Min. (°C)	-30
CARACTERÍSTICAS	A (Pa / div. de escala)	1,78
	M (min/s)	5,41
	G (mPa·s/div. escala. min)	329

Tabla 4-2

Características del viscosímetro Rotovisco RV 12 (Haake).

MEDIDAS DEL VISCOSÍMETRO:

- Velocidad giro rotor (1/min)
- Par de torsión S

Cálculo de τ y $\dot{\gamma}$

$$\tau = A \cdot S \text{ (Pa)}$$

$$\dot{\gamma} = M \cdot n \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

MEDIDAS REOLÓGICAS DE LAS MUESTRAS

Se colocan en el viscosímetro 9 ml de disolución acuosa de pectina al 5 %, seleccionando la temperatura de trabajo deseada, haciendo circular agua por el sistema de atemperación desde un baño a temperatura constante. Las velocidades del rotor pueden seleccionarse de 1 a 512 min⁻¹, lo que permite obtener pares de valores del esfuerzo cortante σ y velocidad de deformación $\dot{\gamma}$, según las instrucciones del fabricante del aparato.

Las mediciones se han realizado por duplicado tomándose las lecturas a velocidades crecientes del rotor, y una vez alcanzada la velocidad máxima se disminuye gradualmente dicha velocidad.

En las medidas reológicas en las que no se mide la tixotropía, ésta debe eliminarse. Para ello, se hace girar el rotor a la velocidad máxima del aparato hasta que no se observa disminución en el valor del esfuerzo cortante.

4.14. Determinación de la cinética de degradación enzimática de las muestras de pectina

Las muestras de pectina en disolución acuosa tamponada del 5 % se colocan en el viscosímetro, y una vez atemperadas a la temperatura óptima de actuación de la enzima, se vierten sobre la muestra 20 microlitros de una mezcla industrial de enzimas pectolíticos de *aspergillus niger* al mismo tiempo que con un cronómetro se procede a la medición de los tiempos, de manera que se determinan los valores de los esfuerzos de deformación σ a incrementos de tiempo constantes hasta que no se observa disminución en los valores de σ .

Las experiencias se efectúan al valor de 512 min^{-1} de la velocidad de deformación. Antes de verter la enzima sobre la muestra debe tomarse lectura del valor del esfuerzo cortante de la muestra de pectina sin enzima.

4.15. Preparación de geles azucarados de pectina

INSTRUMENTAL

Refractómetro Shibuya (tipo Abbe)

PROCEDIMIENTO

Para los experimentos realizados se prepararon jaleas con tres tipos de contenido en pectina y azúcar, aunque en todos ellos el contenido en sólidos solubles fué de 65° Brix.

Para la preparación de los geles, se siguió el procedimiento estándar utilizado en la industria para controlar los grados SAG de las jaleas de pectina de alto metoxilo (I.F.T., 1959). Los pesos de pectina para cada concentración de gel fueron: 4,333 g de pectina; 3,610 g y 2,888 g. El peso final de los geles preparados fué aproximadamente de 100 g.

Los porcentajes finales de pectina sobre los sólidos solubles del gel, se calculan según,

$$\% \text{ de pectina} = \frac{\text{g de pectina}}{65 \text{ g}} \cdot 100$$

Los porcentajes finales de pectina sobre los sólidos solubles fueron: 6,66 % para los pesos de 4,333 g de pectina; 5,55 % para 3,610 g y 4,44 % para 2,88 g.

4.16. Cinética de formación de los geles

INSTRUMENTAL

Viscosímetro Haake CV 20N. Sistema cono-placa conectado a ordenador.

PROCEDIMIENTO

Se procede a tomar datos sobre las muestras de geles a un intervalo de segundos determinado durante 24 horas a la temperatura de 20°C en las condiciones de trabajo que se indican a continuación: Sistema de medición cono-placa PK 45° a una frecuencia de 0,463 Hz, manteniendo una deformación del 10 %.

4.17. Cálculos y gráficas

- Los cálculos del análisis estadístico se han efectuado a través del programa informático Statgraphics 5.0

- Las gráficas se han dibujado a través del programa informático Harvard Graphics

3.0

- El sistema seguido para evaluar la calidad de muestras de pectina que presentan valores diferentes en algunas de sus características, es el método multicriterio Valor Técnico (Thieravs, 1976; Romero y Rehman, 1989). El método consiste en definir los factores a tener en cuenta, y analizar cada muestra asignando una calificación p_i para cada factor o criterio. Se suman las calificaciones para cada muestra, y se divide por el número de factores y la calificación máxima.

El Valor Técnico se define por la expresión:

$$VT = \sum p_i / p_{\max} \cdot n = p / p_{\max},$$

donde:

VT, es el Valor Técnico, en tanto por uno

i , es el número de cada factor o criterio

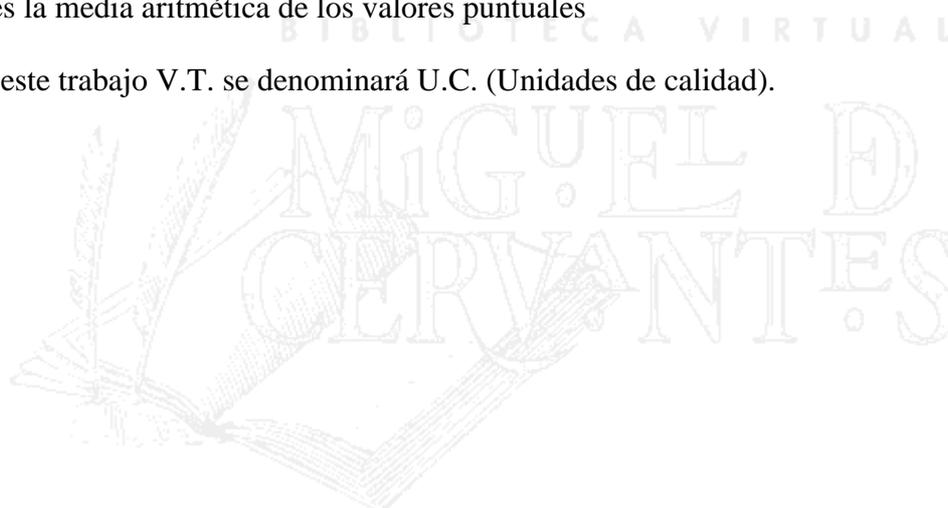
p_i , son los valores puntuales o criterios para una solución dada

p_{\max} , es la máxima puntuación de los factores con que puede valorarse un criterio o factor en el sistema que se estudia

n , es el número de factores considerados

p , es la media aritmética de los valores puntuales

En este trabajo V.T. se denominará U.C. (Unidades de calidad).



5. Resultados y discusión

5.1. Extracción de la pectina de melocotón

Tal como se ha descrito en los apartados 4.2 y 4.3, se ha obtenido la pectina de melocotón a partir del bagazo.

La pectina se ha extraído a las temperaturas de 40°, 50°, 60°, 70° y 80° C. A cada temperatura se han efectuado extracciones a pH: 2, 53; 2,05; 1,79; 1,54; 1,40 y 1,20. A cada pH se han efectuado extracciones a tiempos de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 minutos. A las temperaturas de 50 y 70° C se han hecho también extracciones a pH de 0,91 y un tiempo de 120 minutos en cada serie de extracciones. En total se han obtenido 270 muestras. Los valores del porcentaje de pectina calculado de las extracciones se muestran en la Tabla 5-1, Tabla 5-2, Tabla 5-3, Tabla 5-4, Tabla 5-5 y Tabla 5-6.

Vol. ácido nítrico / 500 mL	pH
0,1	2,53
0,3	2,05
0,5	1,79
0,8	1,54
1,0	1,40
1,5	1,20
2,5	0,91

Tabla 5-1
Volumen de HNO₃ y pH obtenido.

Tiempo (min)	% pectina (pH 1,20)	% pectina (pH 1,40)	% pectina (pH 1,54)	% pectina (pH 1,79)	% pectina (pH 2,05)	% Pectina (pH 2,53)
10	6,22	8,87	5,92	3,75	3,86	3,78
20	7,00	10,88	5,73	5,08	2,95	
30	6,61	7,01		5,14	3,71	3,66
40	5,80	10,38	4,59	5,43	4,46	5,45
50	8,40	9,65	5,17	5,22	4,51	6,12
60	8,25	7,44	3,81	7,03	3,82	4,79
70	9,21	11,65	4,90	7,00	3,60	4,22
80	9,05	7,67	4,87	5,66	3,56	5,16

Tabla 5-2
% de pectina extraída a distintos tiempos y pH, a temperatura de 40°C.

Tiempo (min)	% pectina (pH 1,20)	% pectina (pH 1,40)	% pectina (pH 1,54)	% pectina (pH 1,79)	% pectina (pH 2,05)	% pectina (pH 2,53)
10	8,83	8,01	6,30	7,35	4,49	4,67
20	8,37	7,74	7,59	7,12	3,38	4,26
30	9,72	7,72	8,80	6,01	2,86	5,28
40	8,64	7,86	8,00	6,37	5,59	3,25
50	10,80	11,01	8,21	9,94	5,45	4,78
60	9,98	9,59	7,82	7,54	5,36	5,50
70	9,62	9,43	11,35	5,61	4,40	5,47
80	9,49	8,41	7,43	7,64	3,69	4,36

Tabla 5-3

% de pectina extraída a distintos tiempos y pH, a temperatura de 60°C.

Tiempo (min)	% pectina (pH 1,20)	% pectina (pH 1,40)	% pectina (pH 1,54)	% pectina (pH 1,79)	% pectina (pH 2,05)	% pectina (pH 2,53)
10	8,55	8,84	9,96	6,96	5,07	5,02
20	11,14		8,82	7,39	5,37	4,93
30	10,99	9,96	10,77	9,13	5,79	5,45
40	14,71	10,37	11,24	9,71	6,07	6,49
50	9,75	9,72	9,24	9,95	6,48	6,28
60	15,40	11,62	10,89	9,38	6,64	5,35
70	8,95	12,37	10,26	8,34	4,86	5,74
80	9,46	11,06	10,36	9,07	8,63	4,18

Tabla 5-4

% de pectina extraída a distintos tiempos y pH, a temperatura de 80°C.

Tiempo (min)	% pectin. (pH 0,91)	% pectin. (pH 1,20)	% pectin. (pH 1,40)	% pectin. (pH 1,54)	% pectin. (pH 1,79)	% pectin. (pH 2,05)	% pectin. (pH 2,53)
10	6,80	5,30	9,01	4,02	3,10	2,60	3,33
20	8,80	7,61	12,62	8,75	5,95	4,89	4,67
30	10,21	10,49	13,96	9,25	6,59	4,86	5,23
40	12,03	12,54	15,37	9,44	7,62	6,07	7,10
50	13,81	13,31	15,40	10,28	8,91	6,26	7,60
60	14,06	13,34	16,03	12,11	8,34	7,30	7,40
70	12,31	13,32	15,66	11,43	9,35	7,67	8,07
80	11,81	13,30	15,41	12,74	9,60	7,59	7,00
120	8,87	12,09	11,73	11,83	9,53	6,81	6,50

Tabla 5-5

% de pectina extraída a distintos tiempos y pH, a temperatura de 50°C.

Tiempo (min)	% pectin. (pH 0,91)	% pectin. (pH 1,20)	% pectin. (pH 1,40)	% pectin. (pH 1,54)	% pectin. (pH 1,79)	% pectin. (pH 2,05)	% pectin. (pH 2,53)
10	9,35	9,70	8,00	8,40	6,53	4,41	3,80
20	11,74	15,44	11,00	14,22	9,50	7,12	6,47
30	14,06	17,98	15,69	14,40	13,20	8,07	7,20
40	16,33	17,82	15,91	15,90	13,85	9,92	7,41
50	16,43	17,75	16,71	17,40	14,35	11,57	8,63
60	17,28	17,70	17,76	16,90	14,89	10,18	8,10
70	16,88	16,77	17,25	16,20	14,87	10,90	8,84
80	16,75	15,62	15,62	15,44	14,32	11,86	8,54
120	13,81	11,65	13,03	16,70	12,78	9,29	6,76

Tabla 5-6

% de pectina extraída a distintos tiempos y pH, a temperatura de 70°C.

Las soluciones ácidas utilizadas en la extracción de la pectina se han preparado con 500 mL de agua desionizada, añadiendo diferentes cantidades de HNO₃ al 70 % p/p. La solución que se obtenía era cargada al reactor. La correspondencia entre los distintos volúmenes de ácido añadido y pH se da en la [Tabla 5-1](#).

Para comprobar la fiabilidad y repetibilidad de las extracciones se han efectuado 8 extracciones en idénticas condiciones de temperatura, pH y tiempo de distintas muestras de

bagazo que se exponen en la tabla siguiente. Las condiciones de extracción han sido, temperatura 60° C, pH de 1,79 y tiempo de 30 minutos. Los resultados en % han sido de 5,56; 5,66; 5,54; 5,23; 5,89; 4,76; 5,32 y 5,27. El valor medio de las extracciones repetidas es de $5,40 \pm 0,34$

Para las diferentes extracciones realizadas, los resultados obtenidos varían desde el 2,95 % hasta el 17,98 % de pectina extraída tal como puede verse en la [Tabla 5-2](#), [Tabla 5-3](#), [Tabla 5-4](#), [Tabla 5-5](#) y [Tabla 5-6](#).

Las muestras extraídas a las temperaturas de 40°, 60° y 80° C se obtuvieron en un intervalo breve desde la recepción del bagazo de melocotón y se analizaron seguidamente. Las muestras extraídas a 50° y 70°C, en cambio fueron obtenidas al cabo de 10 meses desde que comenzó el trabajo.

Se observa, no obstante, un mayor rendimiento de extracción en las muestras de bagazo almacenado durante 10 meses. Este incremento puede ser debido a la degradación de la protopectina soluble en agua por hidrólisis acuosa durante al almacenamiento.

De la no correspondencia de valores entre las muestras de pectina extraídas en breve con las muestras de bagazo almacenado, hará que se opte por el criterio de correlacionar aparte los valores de ambos grupos de muestras en los distintos apartados de este trabajo, si bien, el estudio principal se hará sobre las muestras extraídas a 40°, 60° y 80°C.

[Tabla 5-2](#)

[Tabla 5-3](#)

[Tabla 5-4](#)

[Tabla 5-5](#)

[Tabla 5-6](#)

5.1.1. Influencia del pH y de la temperatura sobre el rendimiento de pectina extraída

La gran diferencia de valores observados en porcentaje de pectina extraída, se debe probablemente, a las condiciones de extracción. En este apartado se analiza la influencia de dos de estas condiciones: el pH y la temperatura

En las gráficas de las siguientes figuras se representan los valores del porcentaje de pectina extraída a diferentes temperaturas frente a los diferentes pH, a tiempos constantes.

[Figura 5-1](#)

[Figura 5-2](#)

[Figura 5-3](#)

[Figura 5-4](#)

[Figura 5-5](#)

[Figura 5-6](#)

[Figura 5-7](#)

[Figura 5-8](#)

[Figura 5-9](#)

[Figura 5-10](#)

[Figura 5-11](#)

[Figura 5-12](#)

[Figura 5-13](#)

[Figura 5-14](#)

[Figura 5-15](#)

[Figura 5-16](#)

[Figura 5-17](#)

En dichas gráficas se puede observar una clara tendencia a disminuir el porcentaje de pectina extraída al aumentar el pH. También se observa un incremento en el rendimiento de pectina extraída, a medida que se aumenta la temperatura de extracción.

En las gráficas de las figuras 5-1 a 5-8 se han correlacionado por una parte los valores

de las muestras extraídas a 40°, 60° y 80°C, mientras que las muestras extraídas a 50° y 70°C se dan en las gráficas de las figuras 5-9 a 5-17.

El rendimiento máximo de extracción de entre las temperaturas de 40°, 60° y 80°C corresponde a pectina extraída a 80°C, pH 1,20 y tiempo de 60 minutos

5.1.2 Cinética de extracción

Otra de las variables que puede influir sobre los valores del rendimiento de pectina extraída es el tiempo, ya que las extracciones se han efectuado a tiempos distintos.

A pH y temperatura constantes, a medida que aumenta el tiempo de extracción, aumenta el porcentaje de pectina obtenida, hasta llegar a un valor máximo. A partir de este valor disminuye el rendimiento de la extracción en todos los casos.

Puede observarse en la [Tabla 5-2](#), [Tabla 5-3](#), [Tabla 5-4](#), [Tabla 5-5](#) y [Tabla 5-6](#) que los tiempos de mayor rendimiento de extracción en las series está comprendido entre 40 y 70 minutos.

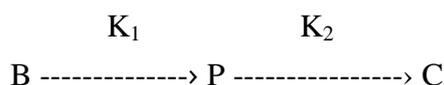
Los datos obtenidos se pueden interpretar como un proceso de dos etapas. Se supone que primeramente se produce una solubilización de la pectina que pasa de la fase sólida a la solución ácida, y a continuación una hidrólisis de la pectina soluble que pasa a productos degradados.

La primera etapa predomina hasta un tiempo determinado en el que se agota pectina del sustrato y a partir de aquí, el predominio de la segunda hidrólisis produce una disminución en el rendimiento de la pectina extraída a tiempos superiores.

A continuación se representan en las [Figura 8-1](#), [Figura 8-2](#), [Figura 8-3](#), [Figura 8-4](#) y [Figura 8-5](#) (Anexo) los valores de la proporción de pectina extraída frente al tiempo a las temperaturas de 40°, 50°, 60°, 70° y 80° C en las que los valores se han tomado de las tablas del apartado 5.1

5.1.2.1. Cálculo de las constantes cinéticas y energía de activación

Como consecuencia de la interpretación cualitativa de los valores obtenidos de la cinética de extracción (5.1.3.) se considera que es un proceso de cinética de dos reacciones consecutivas



siendo:

- B: bagazo
- P: pectina
- C: productos de degradación

Las ecuaciones diferenciales de velocidad son:

$$\frac{dC_B}{dt} = -K_1 C_B \quad (1)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = K_1 C_B - K_2 C_P \quad (2)$$

$$\frac{dC_C}{dt} = K_2 C_P \quad (3)$$

La ecuación (1) se integra con la condición límite para $t = 0$, $C_B = C_B^0$ obteniéndose,

$$C_B = C_B^0 e^{-K_1 t}$$

siendo C_B^0 la concentración inicial de bagazo.

Sustituyendo este valor en la ecuación (2) ésta se transforma en

$$\frac{dC_P}{dt} = K_1 C_B^0 e^{-K_1 t} - K_2 C_P \quad (4)$$

Ecuación que se puede integrar con la condición límite para $t = 0$ y $C_P^0 = 0$ y se obtiene: (Díaz y Roig, 1980)

$$C_P = C_B^0 \frac{K_1}{K_2 - K_1} (e^{-K_1 t} - e^{-K_2 t}) \quad (5)$$

Si el volumen de reacción es constante, las concentraciones pueden sustituirse por cantidades en (5) que se transforma en:

$$P = B_0 \frac{K_1}{K_2 - K_1} (e^{-K_1 t} - e^{-K_2 t}) \quad (6)$$

Siendo:

- P: cantidad de pectina obtenida a un tiempo t
- B_0 : cantidad inicial de bagazo
- K_1 : constante cinética de extracción de pectina
- K_2 : constante cinética de degradación de pectina

Thibault et al. (1993) han estudiado el mecanismo de la segunda etapa de la reacción y proponen que la desaparición de pectina se produce en otras dos etapas consecutivas. K_2 sería la constante global de la desaparición de pectina. La primera es la etapa más rápida y

fue interpretada como la de hidrólisis de los enlaces más débiles entre los residuos de ramnosa y los galacturónicos. La segunda etapa, más lenta, con valores similares para todos los ácidos pécticos se interpretó como una lenta hidrólisis de los enlaces más resistentes entre los residuos galacturónicos.

Los valores de la cantidad de pectina obtenida en cada tiempo ([Figura 8-1](#), [Figura 8-2](#), [Figura 8-3](#), [Figura 8-4](#) y [Figura 8-5](#), Anexo) se ajustan a la ecuación (6) por una regresión no lineal mediante el programa informático Statgraphics y se calculan K_1 y K_2 .

Los resultados se muestran en la Tabla 5-7 y se puede observar por los valores de R^2 que el ajuste a este modelo es muy aceptable.

T (°C)	PH (min ⁻¹)	$K_1 \cdot 10^3$	$K_2 \cdot 10^2$ (min ⁻¹)	K_2/K_1	R^2
40	1,20	5,538	4,472	8,07	0,883
	1,40	12,819	7,871	6,14	0,985
	1,54	3,663	6,084	16,60	0,996
	1,79	3,962	4,953	12,50	0,664
	2,05	3,099	6,650	21,45	0,946
	2,53	6,231	9,168	14,70	0,956
50	0,91	7,391	3,861	5,22	0,883
	1,20	5,771	2,830	4,90	0,984
	1,40	9,194	3,510	3,81	0,888
	1,54	4,704	2,660	5,65	0,885
	1,79	3,480	2,606	7,48	0,959
	2,05	2,863	3,044	10,63	0,953
60	2,53	3,599	3,766	10,46	0,913
	1,20	9,991	6,157	6,16	0,921
	1,40	4,925	3,865	7,84	0,939
	1,54	8,189	6,942	8,47	0,981
	1,79	4,674	4,982	10,65	0,810
	2,05	7,928	10,846	13,68	0,976
70	2,53	4,190	6,434	15,35	0,973
	0,91	8,600	3,000	3,49	0,897
	1,20	11,882	3,744	3,15	0,956
	1,40	8,808	3,103	3,52	0,957
	1,54	10,204	3,646	3,57	0,939
	1,79	7,134	3,042	4,26	0,973
80	2,05	4,990	3,208	6,43	0,932
	2,53	4,717	4,231	8,97	0,934
	1,20	12,295	7,480	6,08	0,985
	1,40	7,806	4,508	5,77	0,876
	1,54	7,720	4,858	6,29	0,998
	1,79	7,885	5,955	7,55	0,958
	2,05	6,521	8,251	12,65	0,920
	2,53	7,981	10,106	12,66	0,949

Tabla 5-7

Constantes cinéticas obtenidas en la regresión no lineal.

En todos los casos (270 muestras extraídas) K_2 es siempre mayor que K_1 . Estos resultados contrastan con los obtenidos por Panchev et al. (1989) que en 36 extracciones, los valores de las constantes de degradación eran inferiores a las de la primera etapa de extracción.

Si en la Tabla 5-7 se observan los valores de K_1 a las temperaturas de 40°, 60° y 80°C, se puede comprobar que a 80°C se obtienen valores más altos que a las otras dos

temperaturas,. lo que indica que la velocidad de extracción de pectina es mayor a esta temperatura.

También, si se correlacionan los valores de las K_1 a 50° y 70°C, se observa que los valores a 70° son mayores que a 50°C.

Por otra parte, se observa que no hay ninguna influencia definida de la temperatura sobre los valores de K_2 , pero sí se observa que los valores de K_2 que corresponden a las temperaturas de extracción de 50° y 70°C son sensiblemente inferiores a las de 40°, 60° y 80°C, lo que indica que las muestras extraídas de bagazo almacenado se degradan en el reactor con menor velocidad, lo cual podría interpretarse como una mayor presencia de enlaces más fuertes entre residuos en estas muestras (mayor número de enlaces entre residuos de ácido galacturónico). Probablemente, una parte del total de enlaces débiles entre residuos (ácido galacturónico-ramnosa), podría haberse degradado durante el almacenamiento.

Tabla 5-7

Si se compara los valores de K_1 a los distintos pH de extracción para cada temperatura, se puede comprobar, salvo excepciones, una tendencia al aumento del valor de la constante al disminuir el pH. La disminución del pH, pues, influye en aumentar la velocidad de reacción. En cambio, no se observa ninguna influencia del pH sobre K_2 . Sin embargo, se comprueba que la relación entre K_2 y K_1 va aumentando claramente cuando a una misma temperatura aumenta el pH, lo que se interpreta como un aumento del predominio de la etapa de degradación sobre la de extracción cuando se produce este aumento del pH

En consecuencia, es importante estudiar mejor el efecto que la temperatura y el pH ejercen sobre el proceso de extracción de la pectina. Al objeto de cuantificar el efecto de la temperatura, se supone que la variación de las constantes K_1 y K_2 con la temperatura siguen la ecuación tipo Arrhenius:

$$K = K_0 \exp (- E_a / RT)$$

siendo:

- K_0 , el factor de frecuencia o preexponencial
- T, la temperatura en grados Kelvin
- R, la constante de los gases

Para calcular la energía de activación (E_a) se efectúa una regresión lineal representando el logaritmo neperiano de las constantes frente a la inversa de la temperatura y calculando la pendiente de la recta con la expresión linealizada de la ecuación de Arrhenius:

$$\ln K = \ln K_0 - E_a / RT$$

En la Tabla 5-8 se representan los valores calculados de las energías de activación cuyas R^2 son aceptables, y se observa para la K_1 que los valores de E_a disminuyen cuando hay un aumento del pH de extracción.

pH	Constante (min^{-1})	$\ln K_0$	E_a (kJ/mol)	R^2
----	------------------------------------	-----------	-------------------	-------

1,20	K ₁	2,220	19,23	0,940
	K ₂	1,461	11,85	0,989
1,54	K ₁	1,239	17,48	0,722
	K ₂	----	----	0,355
1,79	K ₁	0,407	15,61	0,897
	K ₂	1,440	4,14	0,743
2,53	K ₁	0,960	12,50	0,997
	K ₂	----	----	0,338

Tabla 5-8

Energías de activación calculadas a partir de la ecuación de Arrhenius.

5.1.3. Extracción a tiempos elevados

Se quiso estudiar también qué efecto podría tener sobre la extracción el proceso a tiempos muy largos, y para ello se hicieron extracciones de pectina de 500 minutos que dieron los resultados mostrados en la Tabla 5-9.

T (°C)	pH	g pectina extraída (80 min)	g pectina extraída (500 min)	Degradación (%)
40	1,20	1,813	0,166	91,3
50	1,20	2,661	0,286	89,2
60	1,20	1,894	0,026	98,6
70	1,20	3,124	0,024	99,8
80	1,20	1,892	-----	100,0

Tabla 5-9

Extracciones efectuadas a 500 minutos y comparación con las efectuadas a 80 minutos.

Si se prolonga la permanencia del bagazo en el reactor desde 80 a 500 minutos, se observa en la tabla anterior, una drástica disminución del valor del peso de pectina extraída, que se puede interpretar como que la propia pectina extraída en la disolución ácida ha sufrido una degradación.

Se ha denominado % de degradación en la Tabla 5-9 al porcentaje de pectina extraída a 80 minutos que se ha degradado al prolongar el tiempo de permanencia en el reactor hasta 500 minutos.

Se puede también observar en la misma tabla que, tal como se esperaba, existe una tendencia a aumentar el % de degradación con el aumento de la temperatura de extracción de la pectina.

5.1.4. Fibra residual insoluble

En cada uno de los procesos de extracción de pectina a tiempos elevados cuyos resultados ya se han comentado en el apartado anterior (5.1.3.), el bagazo ya sin pectina soluble en ácido ni otros componentes solubles (fibra residual insoluble), se deseca en estufa

a 60°C durante 12 horas y se pesa. Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 5-10.

T (°C)	pH	Peso fibra (g)	% fibra (g fibra / g bagazo)
40	1,20	6,46	32,3
50	1,20	6,54	32,5
60	1,20	6,36	31,8
70	1,20	6,25	31,2
80	1,20	6,15	30,7

Tabla 5-10

Obtención de fibra residual a diferentes temperaturas.

De los valores obtenidos se observa que la cantidad de fibra obtenida, es muy parecida a las cinco temperaturas experimentales de extracción, aunque con una ligera tendencia a la disminución con el aumento de la temperatura.

Esto puede ser debido a que cuando se incrementa la temperatura de extracción hay un incremento de transferencia de materia del bagazo a la disolución ácida, tanto por incremento de solubilidad, que propicia el paso a la disolución de componentes solubles (monosacáridos, pectina, almidón, aminoácidos, proteína, etc.), como por el aumento del valor de la constante de transferencia de materia, facilitando de esta forma, que haya un mayor paso de pectina a la disolución.

5.2. Determinaciones analíticas en la pectina de melocotón

5.2.1. Determinación del grado de metoxilación (D.E.)

El grado de esterificación o metoxilación, es una característica química muy importante relacionada con la velocidad de gelificación tal como ya se refirió en Introducción (1.1.6). Es una de las características, por tanto, que deben determinarse.

Se han efectuado determinaciones analíticas sobre las muestras extraídas a cada temperatura (40°, 50°, 60°, 70° y 80°C)

Los valores del D.E. obtenidos varían desde el 74 al 97 % en las muestras extraídas a 40°, 60° y 80°C que corresponden a valores de pectina de alto metoxilo y desde el 15 al 89% en las muestras extraídas a 50° y 70°C que corresponderían a valores tanto de alto como de bajo metoxilo.

5.2.1.1. Influencia del tiempo de extracción sobre el grado de metoxilación

A partir de los valores analíticos obtenidos del DE, se efectúan representaciones en diagramas de barras de los valores del porcentaje de pectina extraída frente a tiempos de extracción de las muestras extraídas a 40°, 60° y 80°C (gráficas de las figuras 5-18 a 5-35). En estas gráficas puede observarse la total ausencia de influencia del tiempo de extracción sobre la pectina obtenida.

Para comprobar la fiabilidad de los resultados se ha efectuado la determinación del grado de metoxilación de cinco muestras extraídas a las mismas condiciones de pH, tiempo y

temperatura. La representación gráfica de los resultados se muestra en la gráfica de la [Figura 5-36](#).

[Figura 5-18](#)
[Figura 5-21](#)
[Figura 5-24](#)
[Figura 5-27](#)
[Figura 5-30](#)
[Figura 5-33](#)
[Figura 5-36](#)

[Figura 5-19](#)
[Figura 5-22](#)
[Figura 5-25](#)
[Figura 5-28](#)
[Figura 5-31](#)
[Figura 5-34](#)

[Figura 5-20](#)
[Figura 5-23](#)
[Figura 5-26](#)
[Figura 5-29](#)
[Figura 5-32](#)
[Figura 5-35](#)

5.2.1.2. Influencia del pH y la temperatura de extracción sobre el grado de metoxilación (D.E.)

En el apartado anterior, ya se observó la ausencia de influencia del tiempo sobre el grado de metoxilación. En este apartado se estudiará la influencia de los otros dos parámetros: el pH y la temperatura.

En la Tabla 5-11 y gráficas de la [Figura 5-37](#), [Figura 5-38](#), [Figura 5-39](#), [Figura 5-40](#) y [Figura 5-41](#) se muestran los valores medios de los grados de metoxilación para cada pH de cada serie de extracción de la pectina y se puede observar en las series extraídas a 60° y 80° C en las que el DE disminuye cuando la pectina se extrae a pH cada vez más bajos. Esta tendencia no se observa tan claramente en la series extraídas a 40°C. En las muestras extraídas a 50 y 70°C se observa una acusadísima disminución del grado de metoxilación con el descenso de valores del pH de extracción. Las diferencias de estos descensos de los valores del pH en estos dos últimas temperaturas en comparación con las de 40°, 60° y 80°C son muy grandes lo que indica que el tiempo de almacenamiento del bagazo afecta de alguna manera a los enlaces ester de la cadena favoreciendo su hidrólisis.

Si se observan los valores medios del D.E. de las muestras a las distintas temperaturas, se ve que no hay influencia de la temperatura de extracción al comparar muestras del mismo pH a las temperaturas de 40°, 60° y 80°C, en cambio sí que se observa una disminución en los valores medios de las muestras de 70°C en comparación con las extraídas a 50°C, también aquí se ve que influye en factor del tiempo de almacenamiento.

En general la influencia de temperaturas altas y pH bajos parece favorecer la desmetilación de la pectina.

T (°C)	pH	Valor medio (%)	
40	1,20	88,14	±1,01
	1,40	82,92	±2,19
	1,54	79,20	±2,01
	1,79	86,96	±3,20
	2,05	87,79	±1,35
	2,53	89,19	±4,18
60	1,20	78,15	±2,09
	1,40	84,12	±3,13
	1,54	90,18	±0,83
	1,79	92,20	±1,13
	2,05	94,90	±0,82
	2,53	94,46	±1,05

80	1,20	78,71	±2,22
	1,40	80,25	±2,66
	1,54	80,86	±2,35
	1,79	87,95	±1,68
	2,05	91,10	±1,85
50	2,53	96,04	±0,67
	0,91	21,07	±4,11
	1,20	29,42	±11,75
	1,40	29,37	±2,67
	1,54	31,13	±3,84
70	1,79	44,08	±8,49
	2,05	79,85	±6,42
	2,53	81,44	±6,90
	0,91	21,15	±3,62
	1,20	23,79	±8,40
	1,40	35,27	±13,29
	1,54	35,52	±13,05
	1,79	38,55	±13,42
	2,05	50,41	±6,37
	2,53	50,76	±5,48

Tabla 5-11

Valores medios y desviación típica del DE.

5.2.2. Riqueza en ácido galacturónico

La riqueza en ácido galacturónico (AGA), es otra de las características que hay que determinar de cada muestra ya que está relacionada con la pureza de la pectina obtenida.

Para obtener la riqueza en AGA se han obtenido valores espectrofotométricos para distintas concentraciones patrón de AGA, obteniéndose la ecuación:

$$\text{u.a.} = 0,0672 + \text{ppm AGA} \cdot 9,53 \cdot 10^{-3}, \quad \text{siendo } R^2 = 0,973$$

Se han efectuado las determinaciones analíticas sobre las muestras extraídas a 40°, 60° y 80°C. Los resultados se muestran en los diagramas de columnas 42 a 59 y se puede observar que la mayoría de valores se encuentran entre el 55 y el 75 % de AGA.

5.2.2.1. Influencia del tiempo de extracción sobre el % de AGA

En las gráficas de las figuras 5-42 a 5-59, se representa la riqueza en AGA frente a tiempo de extracción a pH y temperatura constante de las diferentes muestras extraídas. No se aprecia ninguna tendencia estadística. Los diferentes porcentajes representan una gran disparidad de valores que pueden ir desde 8,05 % hasta 95 %.

[Figura 5-42](#)

[Figura 5-43](#)

[Figura 5-44](#)

[Figura 5-45](#)

[Figura 5-46](#)

[Figura 5-47](#)

[Figura 5-48](#)

[Figura 5-49](#)

[Figura 5-50](#)

[Figura 5-51](#)

[Figura 5-52](#)

[Figura 5-53](#)

[Figura 5-54](#)

[Figura 5-55](#)

[Figura 5-56](#)

[Figura 5-57](#)

[Figura 5-58](#)

[Figura 5-59](#)

5.2.2.2. Influencia del pH y de la temperatura de extracción sobre el porcentaje de AGA

Descartada la influencia del tiempo sobre el % de AGA de las muestras de pectina, en este apartado se estudiará la influencia de los otros dos parámetros: el pH y la temperatura. Para ver la influencia del pH se han calculado los valores medios del porcentaje de AGA de muestras del mismo pH y a la misma temperatura. Estos valores se muestran en la Tabla 5-12. En esta tabla podemos observar la ausencia total de tendencia de los valores del % de AGA a los distintos pH.

Si se compara los valores medios de muestras de distintas temperaturas pero del mismo pH se comprueba también que no hay diferencias significativas que indiquen una tendencia determinada

T (°C)	pH	Valores medios (%)	
40	1,20	72,53	± 4,14
	1,40	58,3	± 10,84
	1,54	60,73	± 6,57
	1,79	55,35	± 4,89
	2,05	55,73	± 5,10
	2,53	73,08	± 13,71
60	1,20	57,29	± 8,63
	1,40	30,16	± 14,22
	1,54	56,78	± 9,92
	1,79	76,91	± 5,82
	2,05	73,57	± 3,14
	2,53	54,50	± 5,71
80	1,20	43,87	± 10,86
	1,40	80,85	± 9,72
	1,54	55,50	± 7,13
	1,79	58,51	± 4,93
	2,05	70,95	± 5,68
	2,53	65,18	± 12,31

Tabla 5-12

Valores medios del % de AGA a diferentes pH.

5.2.3. Determinación de los grupos acetilo

Los grupos acetilos de la pectina pueden impedir la gelificación de la pectina si su porcentaje en la molécula es alto, y por ello es importante su determinación.

Como se ha descrito en material y métodos (4.7) se efectúan en espectrofotómetro lecturas de absorbancia a 340 nm. En la Tabla 5-13 se muestran los valores del porcentaje de grupos acetilo en las muestras en las que se ha obtenido el máximo % de pectina extraída de cada serie de tiempos a diferentes pH y diferentes temperaturas (pectina de extracción

máxima).

El mayor valor obtenido es de 1,48 % y la casi totalidad es inferior al 1%. En este aspecto la pectina de melocotón tiene características de buena calidad ya que si los valores son superiores al 3 % la pectina puede presentar dificultades para gelificar.

T (°C)	pH	tiempo extr. (min.)	grupos acetilo (%)
40	1,20	70	0,39
	1,40	70	0,40
	1,54	70	0,004
	2,05	50	0,24
	2,53	50	0,26
60	1,20	50	1,48
	1,40	50	0,29
	1,54	50	1,02
	1,79	50	0,98
	2,05	40	0,81
	2,53	60	0,49
80	1,20	40	0,63
	1,40	70	0,35
	1,54	40	0,62
	2,05	60	0,61
	2,53	40	0,82

Tabla 5-13

Porcentaje de grupos acetilo en muestras de extracción máxima a diferentes pH y temperaturas.

5.2.4. Determinación del contenido en almidón de la pectina de melocotón

En la extracción de pectina de manzana sin purificar, se obtiene al mismo tiempo gran cantidad de almidón que impurifica la pectina, también en este trabajo se ha querido comprobar los niveles de almidón que se extraen junto con la pectina.

Las determinaciones se han efectuado sobre las muestras que presentan el mayor porcentaje de pectina extraída en cada serie de tiempos de extracción a pH y temperatura constantes (muestras de máxima extracción)

En la Tabla 5-14 quedan reflejados los resultados obtenidos para las muestras analizadas.

Se han analizado un total de 18 muestras. El valor medio de contenido en almidón de la pectina de melocotón ha sido de 3,22 % con un valor mínimo de 0,56 % y un valor máximo de 8,4 %. La máxima frecuencia de valores corresponde a las muestras del 2,5 al 3,5 %

T (°C)	Muestras		Almidón (%)
	pH	tiempo (min)	
40	1,20	70	3,46
	1,40	70	8,40
	1,54	70	1,03
	1,79	70	5,70

	2,05	50	2,60
	2,53	50	4,90
60	1,20	50	5,06
	1,40	50	1,53
	1,54	50	1,46
	1,79	40	1,93
	2,05	40	3,00
	2,53	60	1,93
80	1,20	60	4,43
	1,40	70	2,66
	1,54	40	4,26
	1,79	50	2,72
	2,05	60	2,46
	2,53	40	0,56

Tabla 5-14

Valores del contenido en almidón de las muestras de pectina de máximos valores de extracción.

De los resultados obtenidos en la tabla anterior, puede deducirse que el contenido en almidón de las muestras de pectina de melocotón sin purificar es mucho más bajo que el de muestras de pectina extraída de manzana. Este autor, en otro trabajo, aún sin publicar, encontró niveles del 6 al 10 % de almidón en muestras pectina de manzana sin purificar extraídas a las mismas condiciones que las de las muestras de la tabla anterior, ello es debido probablemente al menor contenido en almidón del tejido de melocotón que en el de manzana.

5.2.5. Determinación del contenido en proteína de las muestras de pectina de melocotón

La proteína es un componente de los tejidos vegetales, es por lo tanto un elemento susceptible de extraerse junto con la pectina y por lo tanto impurificarla, de aquí también la importancia de su determinación.

Las determinaciones analíticas se han efectuado sobre muestras de pectina extraídas a 40°, 60° y 80° C a 20 y 80 minutos de extracción a cada temperatura y a todos los pH. También se ha analizado la proteína de las muestras correspondientes a valores máximos de extracción de cada serie de pH de extracción.

En la Tabla 5-15 se muestran los resultados de los contenidos en proteína obtenidos para las muestras analizadas.

Se han analizado un total de 54 muestras. El valor medio del contenido en pectina ha sido de 4,96 % con un valor mínimo de 1,35 y un valor máximo de 6,94. La máxima frecuencia de valores va del 4 al 6,5 % de proteína.

Muestra extraída a:			Proteína	
T (°C)	pH	Tiempo (min)	(%)	
40	1,20	20	5,95	
	1,20	70	5,33	
	1,20	80	5,45	
	1,40	20	4,98	
	1,40	70	6,56	
	1,40	80	6,10	
	1,54	20	4,71	
	1,54	70	2,75	
	1,54	80	4,34	
	1,79	20	4,83	
	1,79	70	6,01	
	1,79	80	6,00	
	2,05	20	4,26	
	2,05	50	3,86	
	2,05	80	4,19	
	2,53	20	3,26	
	2,53	50	6,90	
	2,53	80	4,06	
	60	1,20	20	4,96
		1,20	50	6,94
1,20		80	6,10	
1,40		20	4,68	
1,40		50	1,35	
1,40		80	5,80	
1,54		20	4,59	
1,54		50	5,35	
1,54		80	5,29	

	1,79	20	5,82
	1,79	40	3,63
	1,79	80	5,06
	2,05	20	4,15
	2,05	40	2,77
	2,05	80	5,02
	2,53	20	3,71
	2,53	60	2,95
	2,53	80	4,84
80	1,20	20	6,88
	1,20	50	4,88
	1,20	80	6,60
	1,40	20	5,68
	1,40	50	5,56
	1,40	80	6,56
	1,54	20	4,98
	1,54	50	5,84
	1,54	80	5,82
	1,79	20	4,69
	1,79	40	4,91
	1,79	80	5,74
	2,05	20	4,42
	2,05	40	4,13
	2,05	80	4,83
	2,53	20	4,28
	2,53	60	4,97
	2,53	80	4,58

Tabla 5-15

Contenido en proteína de muestras de pectina.

5.2.5.1. Influencia del pH y del tiempo de extracción sobre el contenido en proteína de las muestras de pectina

Si se observan los resultados de la Tabla 5-15, puede constatarse que no hay influencia de la temperatura de extracción sobre el porcentaje de proteína extraída en la pectina.

En las gráficas de la [Figura 5-60](#), [Figura 5-61](#) y [Figura 5-62](#), en las que se representa el contenido en proteína de la pectina a los diferentes pH de extracción y a tiempos de 20 y 80 minutos, se puede observar una tendencia a la disminución del contenido en proteína a medida que aumenta el pH de extracción, debido probablemente a una menor hidrólisis de las cadenas protéicas del tejido vegetal. La influencia del tiempo de extracción no se observa para las muestras extraídas a 40°C, aunque para las muestras extraídas a 60° y 80°C, sí que se observa una tendencia a contener mayor cantidad de proteína las muestras extraídas a 80 minutos que a 20, debido probablemente a que la mayor permanencia del bagazo en el reactor que produce mayor cantidad de pectina extraída, produce también la extracción de mayor cantidad de proteína estructural unida a la pectina en el tejido vegetal.

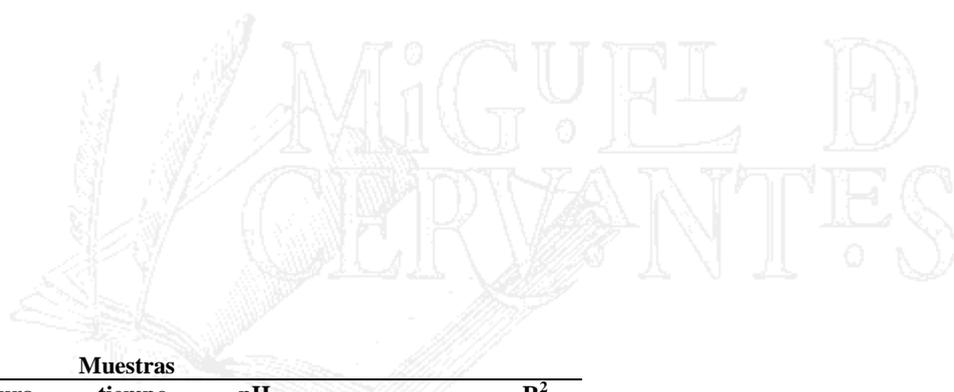
5.2.6. Determinación de la viscosidad intrínseca de muestras de pectina de melocotón

Tal como se refirió en el apartado 1.1.7 en Introducción, la viscosidad intrínseca de la pectina es una característica propia de sus moléculas y está relacionada directamente con el peso molecular. Es una característica que debe determinarse en la mayoría de polímeros

Se han efectuado determinaciones de la viscosidad intrínseca sobre muestras de pectina de melocotón que han presentado los valores máximos de porcentaje de pectina en las extracciones efectuadas a todas las condiciones descritas en 5.1.1.

Las representaciones gráficas de los valores de cada muestra corresponden a las [Figura 5-63](#), [Figura 5-64](#), [Figura 5-65](#), [Figura 5-66](#) y [Figura 5-67](#) (valores de η_{sp}/C frente a valores de C). La ordenada en el origen de la regresión lineal de los puntos es el valor de $[\eta]$. Sus valores se muestran en la Tabla 5-17.

BIBLIOTECA VIRTUAL



Temperatura (°C)	Muestras		$[\eta]$ (dL/g)	R^2
	tiempo (min)	pH		
40	70	1,20	4,000	0,9945
	70	1,40	4,270	0,9994
	50	1,54	5,845	0,9953
	60	1,79	2,803	0,9904
	50	2,05	5,057	0,9977
	50	2,53	2,188	0,9990
50	60	0,91	0,8146	0,9174
	60	1,20	2,009	0,9978
	60	1,40	2,368	0,9943
	80	1,54	2,880	0,9993
	80	1,79	2,462	0,9947
	70	2,05	2,892	0,9984
	70	2,53	2,220	0,9954
	60	50	1,20	3,994
60	50	1,40	5,187	0,9882
	70	1,54	4,802	0,9752
	50	1,79	5,511	0,9967
	40	2,05	6,118	0,9946
	60	2,53	4,974	0,9762
	70	60	0,91	1,460
30		1,20	2,104	0,9902
60		1,40	2,403	0,9916

	50	1,54	2,971	0,9942
	60	1,79	3,495	0,9989
	80	2,05	2,397	0,9945
	70	2,53	2,674	0,9902
80	60	1,20	2,483	0,9971
	70	1,40	3,586	0,9976
	40	1,54	4,358	0,9992
	50	1,79	4,516	0,9998
	60	2,05	4,560	0,9996
	40	2,53	4,625	0,9982

Tabla 5-17

Viscosidades intrínsecas de muestras de pectina de melocotón de máxima extracción.

Los resultados de las viscosidades intrínsecas corresponden a muestras cuya diferencia máxima de tiempos de extracción es de sólo 30 minutos. Podría pensarse que el tiempo de extracción influye en el valor de la $[\eta]$, sin embargo en otro trabajo similar al presente pero con pectina de manzana del presente autor (aún sin publicar), se observa que muestras extraídas a las mismas condiciones de pH y T con tiempos de extracción entre 40 y 70 minutos no presentan prácticamente diferencias en los valores de viscosidad intrínseca.

Aún considerando un comportamiento análogo en la pectina de melocotón, se han efectuado determinaciones en condiciones extremas de temperatura y pH en los tiempos de máxima diferencia entre las muestras. Los resultados se muestran en la tabla Tabla 5-17 y corroboran la ausencia de influencia del tiempo de extracción sobre los resultados obtenidos.

Muestra (n°)	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (min)	$[\eta]$
1	80	1,20	30	2,647
2	80	1,20	70	2,483

Tabla 5-16

Viscosidades intrínsecas a distintos tiempos de extracción.

[Tabla 5-17](#)

5.2.6.1. Influencia de la temperatura y del pH de extracción sobre la viscosidad intrínseca

A partir de los valores de la [Tabla 5-17](#) se representan valores de las viscosidades intrínsecas en función del pH (gráficas de las [Figura 5-68](#), [Figura 5-69](#), [Figura 5-70](#), [Figura 5-71](#) y [Figura 5-72](#)), y se puede comprobar que los valores más altos, salvo alguna excepción, corresponden a muestras extraídas a 60°C. Los valores de las muestras extraídas a 40°C y 80°C tienen niveles parecidos. Las muestras de 50° y 70°C, extraídas de bagazo almacenado 10 meses, en cambio, presentan viscosidades intrínsecas muy inferiores al resto de las temperaturas, de valores a veces la mitad si se comparan muestras extraídas a las mismas condiciones, aunque también si se comparan los valores entre las dos temperaturas, las muestras extraídas a 50°C presentan viscosidades intrínsecas en conjunto superiores a las de 70°C. Todo ello se puede observar en la gráficas de las figuras 5-68 a 5-72. Esta disminución tan grande para las muestras de 50° y 70°C significa que ha podido haber degradación de

pectina dentro del bagazo durante el tiempo de almacenamiento.

Si en las gráficas de las figuras 5-68 a 5-72 se observan los valores de las viscosidades intrínsecas a los diferentes pH, se puede constatar una clara tendencia a la disminución de los valores de las viscosidades intrínsecas con la disminución del pH.

5.2.7. Determinación de la calidad de la pectina extraída

Para la determinación de la calidad de las muestras de pectina extraída, el presente trabajo se ha basado en la idea del modelo de Aravantinos-Zafiri y Oreopoulou (1991).

Estos autores expresan la calidad de la pectina en unidades de gelificación ("Unit Jelly"), que la calculan multiplicando la viscosidad de una disolución de pectina por el tanto por ciento de extracción de la misma.

En este apartado se adopta el método multicriterio ya definido en la parte Material y métodos 4. 17, y se pretende relacionar muestras de pectina extraídas con factores de que de alguna manera indiquen unas propiedades deseables en las diferentes aplicaciones de la pectina. Una muestra de pectina extraída se desea que tenga la máxima longitud de cadena y el máximo grado de metoxilación posible.

Se definirá la calidad de la pectina medida en unidades de calidad (U.C.)

$$U.C. = \frac{\sum P_i}{P_{\max} \cdot n},$$

donde:

U.C. = unidades de calidad de la pectina extraída

i = número de cada factor o criterio

P_i = valores puntuales o criterios para una solución dada

P_{max} = 10

n = 2

El valor de P_{max} será de 10 de manera que la muestra que tenga el valor máximo en un determinado factor adoptará el valor 10 y el mínimo de 1. El resto de valores serán números intermedios entre el 1 y el 10.

En la Tabla 5-18 se muestran los valores de los dos factores que son la base de cálculo para determinar las U.C. en las muestras de máximo rendimiento de extracción a cada temperatura y pH.

En la Tabla 5-19 se muestran los valores en U.C. calculados para las muestras consideradas en la tabla anterior y se comprueba que las muestras de mayor calidad son la muestra extraída a 60°C, pH 2,05 y 40 minutos, y la muestra extraída a 60°C, pH 1,79 y 40 minutos. Puede también intentarse relacionar la temperatura de extracción con la calidad de las muestras, para ello se puede observar en la Tabla 5-19, que a 60°C se extraen, en conjunto, las muestras de máxima calidad, aunque a 40°C los valores también son muy altos.

Las muestras de menores valores en U.C. corresponderían a las muestras de bagazo almacenado extraídas a 50° y 70°C con valores muy inferiores al resto de las temperaturas.

Muestra extraída a: (°C/pH / min)	[η] (dL/g)	°Metoxilación/100
40/1,20/70	4,009	0,890
40/1,40/70	4,270	0,837
40/1,54/50	5,845	0,758
40/1,79/60	2,803	0,911
40/2,05/50	5,047	0,871
40/2,53/50	2,188	0,804
60/1,20/50	3,994	0,741
60/1,40/60	5,187	0,841
60/1,54/70	4,802	0,905
60/1,79/50	5,511	0,939
60/2,05/40	6,118	0,954
60/2,53/60	4,974	0,951
80/1,20/60	2,483	0,766
80/1,40/70	3,586	0,784
80/1,54/40	4,112	0,813
80/1,79/50	4,516	0,902
80/2,05/60	4,560	0,921
80/2,53/40	4,625	0,944
50/1,20/60	2,010	0,202
50/1,40/60	2,360	0,293
50/1,54/80	2,880	0,283
50/1,79/80	2,460	0,364
50/2,05/70	2,890	0,845
50/2,53/70	2,220	0,807
70/1,20/30	2,100	0,182
70/1,40/60	2,400	0,372
70/1,54/60	2,970	0,509
70/1,79/70	3,500	0,296
70/2,05/80	2,400	0,588
70/2,53/70	2,670	0,581

Tabla 5-18

Factores para el cálculo de U.C. para las muestras de pectina de máxima extracción a diferentes temperaturas y pH.

Muestra extraída a: T/pH/tiempo (°C/pH/min)	[η]	° Metoxilación	ΣP_1	U.C.
40/1,20/70	6	9	15	0,75
40/1,40/70	7	9	16	0,80
40/1,54/70	10	8	18	0,90
40/1,79/70	7	9	16	0,80
40/2,05/50	9	9	18	0,90
40/2,53/50	6	8	14	0,70
60/1,20/50	6	8	14	0,70
60/1,40/60	8	9	17	0,85
60/1,54/50	8	9	17	0,85
60/1,79/40	9	10	19	0,95
60/2,05/40	10	10	20	1,00
60/2,53/60	8	10	21	0,70
80/1,20/60	4	8	12	0,60
80/1,40/70	6	8	14	0,85

80/1,54/40	7	8	15	0,75
80/1,79/50	7	9	16	0,80
80/2,05/60	7	10	17	0,85
80/2,53/40	7	10	17	0,85
50/1,20/70	3	1	4	0,20
50/1,40/70	4	2	6	0,30
50/1,54/80	4	2	6	0,30
50/1,79/80	4	3	7	0,35
50/2,05/70	4	9	13	0,65
50/2,53/70	3	8	11	0,55
70/1,20/80	3	1	4	0,20
70/1,40/60	4	3	7	0,35
70/1,54/60	5	5	10	0,50
70/1,79/70	6	2	8	0,40
70/2,05/80	4	6	10	0,50
70/2,53/70	4	6	10	0,50

Tabla 5-19

Matriz de efectos de los distintos parámetros que definen la calidad de las muestras de pectina extraídas de máximo rendimiento.

5.2.8. Determinación de los pesos moleculares de muestras de pectina de melocotón

Tal como se refirió en Introducción (1.1.6), el peso molecular es una característica muy importante de la pectina relacionada con la consistencia de los geles que forma, por consiguiente, debe también determinarse.

Se procedió a analizar y calcular los pesos moleculares de las muestras extraídas de pectina de máximo rendimiento por el procedimiento descrito en Material y métodos (4.9). Los cromatogramas obtenidos se representan en el Anexo de este trabajo (página 308).

En el cromatograma de cada muestra se observan dos picos: el de mayor altura corresponde a la muestra sin purificar. El de menor altura corresponde a la muestra tratada con HCl al 5%. Una vez procesados los datos por ordenador y obtenidos los valores de los pesos moleculares, se comprueba que los pesos moleculares de las muestras sin purificar son muy superiores a los del resto de muestras, lo que induce a sospechar que las muestras purificadas con ácido clorhídrico pueden haberse degradado parcialmente por el propio procedimiento de purificación.

Como consecuencia de ello se tomarán como valores de los pesos moleculares los de las muestras sin purificar, valores que se muestran en la Tabla 5-20. En esta tabla también se muestran los valores de las viscosidades intrínsecas correspondientes para que puedan cotejarse. Los valores se han dispuesto en orden decreciente, y puede observarse que los pesos moleculares de las muestras varían muy poco dentro de un rango estrecho que va desde 85896, como valor mínimo hasta 108616, valor máximo. También puede verse la correlación entre los valores de los pesos moleculares y las viscosidades intrínsecas. A mayor valor del peso molecular, mayor valor de la viscosidad intrínseca.

Con ambos valores obtenidos en cada muestra, peso molecular y viscosidad intrínseca, se pueden calcular los parámetros de la ecuación de Mark-Houwink (1.1.5.) para

la pectina de melocotón. Para ello se efectúa un análisis de regresión lineal de los valores del logaritmo de las viscosidades intrínsecas, frente a los valores del logaritmo de los pesos moleculares. La representación se muestra en la gráfica de la [Figura 5-73](#). De la regresión lineal se obtiene como valor de la pendiente $a = 5,166 \pm 0,602$ y ordenada en el origen, logaritmo de $K = -25,1234$, y a partir de este valor, $K = 7,526$ con $R^2 = 0,852$ con lo que la ecuación de Mark-Houwink para pectina de melocotón será de:

$$[\eta] = 7,526 \cdot 10^{-26} M_w^{5,166}$$

Con esta expresión se podrán determinar los pesos moleculares de la pectina de melocotón aproximadamente, con el sencillo método de determinar la viscosidad intrínseca con un viscosímetro capilar, sin demasiados errores, siempre que los valores de $[\eta]$ estén comprendidos entre 2,00 y 8,00.

Muestra (T/pH/t)	Peso molecular (g/mol)	$[\eta]$ (dL/g)
60°/2,05/40	108616	6,118
40°/1,54/70	104155	5,845
60°/1,79/40	100116	5,511
60°/1,40/50	99317	5,187
40°/2,05/50	97825	5,047
60°/2,53/60	97615	4,974
60°/1,54/50	97263	4,802
80°/2,53/40	96944	4,625
80°/2,05/60	96720	4,560
80°/1,79/50	95954	4,516
40°/1,40/70	95543	4,270
80°/1,54/40	95511	4,112
40°/1,20/70	95294	4,009
60°/1,20/50	94911	3,994
80°/1,40/70	93765	3,586
40°/1,79/70	92584	2,803
80°/1,20/60	90281	2,483
40°/2,53/50	85896	2,188

Tabla 5-20

Pesos moleculares de las pectinas de máxima extracción.

5.3. Degradación enzimática de la pectina de melocotón

5.3.1. Determinación de la actividad exo-poligalacturonásica de una mezcla industrial de enzimas pectolíticas

La mezcla consta de enzimas descritas en la [Tabla 1-3](#) en Introducción.

La actividad exopoligalacturonásica será la capacidad enzimática de hidrólisis del último enlace de la cadena de pectina.

Previa a la hidrólisis por las exo polimetilgalacturonasas, la pectina se desmetila por la acción de las pectina esterasas. En consecuencia, el resultado final de la actividad exopoligalacturonásica sería la conversión de pectina en ácido galacturónico, y dentro de esta actividad, se incluye la actividad esterásica de las pectina esterasas.

La metodología para la determinación de la actividad, se expone en el apartado 4.11 en Material y métodos.

5.3.1.1. Fijación de las condiciones de actuación enzimática

Como criterio inicial se estima que la concentración de la mezcla industrial de enzimas pectolíticos en el medio de actuación sea la más cercana a la que utiliza la industria clarificadora de zumos de fruta dulce (8 mL de mezcla enzimática / hL) y con el fin de determinar las condiciones óptimas de actuación de las exopoligalacturonasas se efectúan ensayos a:

- Temperatura de 45°C
- Concentración de la mezcla enzimática de 10^{-4} mL / mL de disolución tamponada de sustrato que equivale a $4 \cdot 10^{-3}$ mg de proteína enzimática /mL medio.
- Se descarta la pérdida de actividad enzimática debida a la desnaturalización en un periodo de tiempo largo (la actuación de la enzima en la industria es de 4 h)
- pH 3,0; 3,6; 4,0 y 4,5
- Concentración de sustrato (ácido poligalacturónico, PGA) 0,5 g/L
- Las pruebas en blanco contienen 0,5 g/L de PGA en disolución tampón
- En los ensayos no se diluye la fracción sobrenadante que contiene el ácido galacturónico libre

Los ensayos finalizan cuando ya no se observa ningún incremento de absorbancia

En la Tabla 5-21 se muestran los resultados de las determinaciones y se puede observar en todos los casos que la capacidad máxima de hidrólisis de las enzimas exo-PGAs de la mezcla industrial de enzimas se obtendrá a pH 3,6 por el sustrato utilizado y en las condiciones especificadas.

	Absorbancia (unidades de absorbancia)			
	pH 3,0	pH 3,6	pH 4,0	pH 4,5
Prueba 1	0,248	0,716	0,666	0,394
Prueba 2	0,263	0,700	0,632	0,402
Prueba 3	0,256	0,637	0,627	0,411

Tabla 5-21

Capacidad de hidrólisis exopoligalacturonásica a diferentes pH.

También es necesario determinar el peso molecular del PGA, aunque sea de manera aproximada si se quiere expresar sus disoluciones en concentraciones molares.

Se determina en primer lugar la viscosidad intrínseca del ácido poligalacturónico

ensayado, para tener una idea aproximada de su longitud de cadena.

En la Tabla 5-22 se muestran los resultados de los ensayos con el viscosímetro capilar a la temperatura de 45°C, para determinar la viscosidad intrínseca del ácido poligalacturónico (PGA)

Concentración (PGA/100 mL)	Densidad (g/mL)	Tiempo (s)	η (Pa.s)	η_{sp}	η_{sp}/C (dL/g)
1,5	1,0010	101,9	1,320	1,250	0,8100
1,0	0,99988	80,2	1,037	0,7415	0,7415
0,5	0,99866	59,3	0,766	0,2857	0,5714
0,4	0,99853	57,3	0,741	0,2426	0,6065

Tabla 5-22

Determinación de la viscosidad intrínseca del sustrato PGA.

De los resultados de la viscosidad específica / concentración y de la concentración de pectina de la tabla anterior, se efectúa una regresión lineal y el valor de la ordenada en el origen de la ecuación de la recta resultante, será la viscosidad intrínseca cuyo resultado es:

$$[\eta] = 0,500 \quad \text{con } R^2 = 0,9318$$

y mediante la ecuación de Mark-Houwink tomando como parámetros $K = 9,55 \cdot 10^{-2}$ y $a = 0,73$ (Tabla 1-3, Introducción), el peso molecular del PGA que se obtiene es de 5304 g/mol.

5.3.1.2. Determinación de parámetros cinéticos de la actividad exopoligalacturonásica

Primeramente deberá obtenerse la recta de calibrado espectrofotométrica del ácido α -D galacturónico ya que facilita el seguimiento de la formación del producto de hidrólisis enzimática (monómeros de ácido galacturónico libres).

Ensayo sin presencia de ácido poligalacturónico

En este caso la muestra en blanco de referencia contiene solamente disolución tampón. La fracción sobrenadante que contiene el ácido galacturónico libre no se diluye.

Una vez calculada la regresión lineal de los datos obtenidos por espectrofotometría, la concentración de ácido galacturónico libre y las unidades de absorbancia se relacionan según las expresiones:

$$u. a. = 1,649 \cdot 10^{-3} + \text{ppm AGA} \cdot 2,492 \cdot 10^{-3} \quad \text{siendo } R^2 = 0,9998$$

$$u.a. = 1,651 \cdot 10^{-3} + \mu\text{mol AGA/mL} \cdot 0,529 \quad \text{siendo } R^2 = 0,9988$$

siendo u. a.: unidades de absorbancia

Ensayo con presencia de ácido poligalacturónico

Ahora la muestra en blanco de referencia contiene una mezcla de disolución tampón y

de disolución de ácido poligalacturónico de concentración 2,0 g/L; la fracción sobrenadante que contiene el ácido galacturónico libre no se diluye.

De acuerdo con la regresión lineal de los datos obtenidos por espectrofotometría, las expresiones siguientes relacionan la concentración del ácido galacturónico libre y las unidades de absorbancia.

$$u. a. = 0,671 + ppm \text{ AGA} \cdot 2,076 \cdot 10^{-3} \quad \text{siendo } R^2 = 0,9985$$

$$u. a. = 0,671 + \mu\text{mol AGA/mL} \cdot 0,440 \quad \text{siendo } R^2 = 0,9985$$

En la gráfica de la [Figura 5-74](#) se representan los valores de las rectas de calibrado del ácido galacturónico y del ácido galacturónico conteniendo ácido poligalacturónico.

Dentro de las condiciones experimentales de temperatura, pH del medio y concentración de enzima se realizan una serie de ensayos de seguimiento de la hidrólisis enzimática de distintas disoluciones de ácido poligalacturónico puro de diferente concentración, para obtener las diferentes velocidades iniciales de formación del producto.

Las condiciones adicionales de los ensayos son:

- Seguimiento de la formación de producto (monómeros de ácido galacturónico libre) durante los primeros 10 minutos de actuación de la enzimas exopoligalacturonasas
- Actuación de las enzimas sobre concentraciones de PGA de 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 1,25; 1,50 y 2,00 g/l
- La fracción sobrenadante que contiene el ácido galacturónico no se diluye
- Las muestras en blanco contienen ácido poligalacturónico puro de concentración distinta en cada caso y disolución tampón

Los resultados del seguimiento de la actividad de hidrólisis de las enzimas se muestran en la gráfica de la [Figura 5-75](#), en la que se representa la cantidad de producto liberado en $\mu\text{mol} / \text{mL}$ de ácido galacturónico determinado a cada tiempo.

Si se observan los valores de la gráfica de la [Figura 5-75](#) para cada concentración de sustrato, puede constatarse que hay una tendencia clara a seguir una función hiperbólica. La función que representa la tendencia de los valores correspondería a la ecuación:

$$\text{Producto liberado} = \frac{\text{Producto máximo liberado} \cdot \text{tiempo}}{c + \text{tiempo}} \quad (1)$$

(c, en min., valor constante para cada curva)

y la velocidad inicial de formación se calcula como la derivada en el origen de la ecuación (1), resultado la expresión:

$$\text{Producto máximo liberado}$$

$$\text{Velocidad inicial} = \frac{\text{-----}}{c} \quad (2)$$

Los valores de c obtenidos de la ecuación (1) y de las velocidades iniciales a partir de la ecuación (2) se exponen en la Tabla 5-23.

El valor de cada actividad inicial se obtiene dividiendo los valores de las velocidades iniciales por $4 \cdot 10^{-3}$ mg proteína enzimática / mL y expresándose U en $\mu\text{mol} / \text{min}$

Actividad exoPGAsica a diferentes concentraciones de sustrato

(PGA)		Producto máx. liberado	c	Velocidad inicial	Actividad inicial	R^2
(g/L)	(M). 10^{-4}	($\mu\text{mol/mL}$)	(min)	($\mu\text{mol/mL. min}$)	(U/mg)	
0,25	0,4713	0,508	0,476	1,067	266,7	0,9790
0,50	0,9427	1,147	0,731	1,568	392,0	0,9485
0,75	1,411	1,703	0,548	3,106	776,5	0,9288
1,00	1,885	2,688	0,666	4,034	1008,5	0,9282
1,25	2,357	2,883	0,667	4,316	1079,0	0,9165
1,50	2,828	2,311	0,408	5,655	1413,7	0,9821
2,00	3,771	2,802	0,599	4,676	1169,0	0,8357

(PGA) es la concentración del ácido poligalacturónico.

Tabla 5-23

Actividad exoPGAsica a diferentes concentraciones de sustrato.

Los resultados de la tabla anterior de las velocidades iniciales a distintas concentraciones de sustrato se representan en la gráfica de la [Figura 5-76](#).

Los valores del producto máximo liberado aumentan a medida que aumenta la concentración de sustrato hasta estabilizarse a partir de 1,25 g/L. Las cantidades oscilan entre 0,508 $\mu\text{mol/mL}$ a la concentración más baja y 2,883 $\mu\text{mol/mL}$ a concentración de sustrato de 1,25 g/L

De manera parecida pasa con los valores de la velocidad inicial; éstos también aumentan a medida que la concentración de sustrato es mayor, y se estabilizan a partir de 1,50 g/L. Oscilan entre el menor (1,067 $\mu\text{mol/mL}$) a la concentración de sustrato inferior, y 5,655 $\mu\text{mol/mL}$ cuando la concentración de sustrato es de 1,5 g/L

Los ajustes son en la mayoría de los casos medianamente buenos a excepción del último valor.

Caracterización de la actividad enzimática

La variación de la velocidad inicial de formación de producto a medida que crece la concentración de sustrato puede expresarse mediante la relación de Michaelis y Menten,

$$v = \frac{V \cdot S}{K_m + S} \quad (\text{Briggs y Haldane, 1925})$$

$$K_m + S$$

siendo:

v, la velocidad inicial, en micromol de AGA/mL • min

V, la velocidad inicial máxima, en micromol de AGA / mL • min

S, la concentración inicial de sustrato, en mol / L

K_m, la constante de Michaelis y Menten, en mol / L

Si se ajustan los valores inversos de las velocidades iniciales y de las concentraciones de AGA de la [Tabla 5-23](#) (linealización de Lineweaver-Burk), se obtienen los valores de las constantes que representan la velocidad inicial máxima de formación de producto y K_m que caracteriza la actividad exopoligalacturonásica de la mezcla industrial de enzimas pectolíticas en las condiciones de las experiencias, con un ajuste medianamente bueno (gráfica de la [Figura 5-77](#), con R² = 0,9539)

$$\text{Velocidad inicial máxima} = 16,537 \quad \mu\text{mol AGA/ml. min}$$

$$K_m \text{ exoPGAsica} = 7,097 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

5.3.2. Determinación de la actividad endopoligalacturonásica de una mezcla industrial de enzimas pectolíticas

Las enzimas endopoligalacturonasas y endometilpoligalacturonasas hidrolizan los enlaces entre los residuos de AGA al azar y previamente a la hidrólisis, la pectina se desmetila por acción de las pectina esterases. El resultado de la actuación de estas enzimas, será la aparición de cadenas de ácido poligalacturónico de longitud variable.

La actividad endopoligalacturonásica se traduce por una disminución de la viscosidad de las disoluciones de pectina y por tanto, ésta será una propiedad medible de la actividad enzimática. En este trabajo, la actividad endopoligalacturonásica, englobará también la actividad de la pectina esterasa.

La metodología para la determinación de la actividad, se expone en el apartado 4.12 en Material y métodos.

5.3.2.1. Fijación de las condiciones de actuación enzimática

Como criterio inicial se estima que la concentración de la mezcla industrial de enzimas pectolíticas en el medio de actuación sea la más cercana a la que utiliza la industria clarificadora de zumos de fruta dulce tal como se ha visto en el apartado 5.3.1.1.

Con el fin de determinar las condiciones óptimas de actuación de las endopoligalacturonasas se efectúan ensayos a:

- Temperatura de 45°C

- Concentración de la mezcla enzimática de 10⁻⁴ mL mezcla / mL disolución tamponada de sustrato, que equivale a 4 • 10⁻³ mg de proteína enzimática/mL medio. El

volumen total de disolución es de 10 mL

- pH 3,6; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5

- Concentración de sustrato (PGA) de 15 g/L

- El seguimiento de la disminución de la viscosidad de la disolución de sustrato se efectúa durante 60 minutos.

La transformación de los datos de las experiencias de unidades de tiempo (s) en unidades de viscosidad (mPa•s) se efectúa mediante la expresión dada en Material y métodos 4.10 (1):

$$\eta = k \cdot t \cdot d$$

en la que los valores de la k y de la densidad de la disolución original a 45°C son:

$$k = 0,0125 \text{ mPa} \cdot \text{mL/g} \cdot \text{s}$$

$$d = 0,99942 \text{ g/mL}$$

El valor de t_{agua} , se obtiene en el viscosímetro capilar a 45°C, y a través del valor en tablas de la viscosidad y la densidad del agua a la temperatura de 45°C se obtiene el valor de k

$$\eta_{\text{agua}} = 0,5960 \text{ mPa} \cdot \text{s}$$

$$d_{\text{agua}} = 0,99021 \text{ g/mL}$$

$$t_{\text{agua}} = 48,1 \text{ s}$$

El valor de la densidad de la disolución de ácido poligalacturónico de concentración 15 g/L se obtiene experimentalmente mediante picnómetro.

Los resultados de los ensayos se representan en las gráficas de la [Figura 5-78](#), [Figura 5-79](#), [Figura 5-80](#), [Figura 5-81](#) y [Figura 5-82](#).

La evolución de la viscosidad de la disolución de ácido poligalacturónico en los primeros minutos de actuación de la enzima, puede expresarse en función del tiempo mediante la expresión

$$\eta = (\eta_0 - C) e^{-k \cdot t} + C \quad (1)$$

en la que η es el valor de la viscosidad de la disolución, y C es el valor asintótico al que tiende la viscosidad de la disolución; k es un parámetro constante particular característico de la curva, y es en realidad la constante cinética de primer orden; t es el tiempo y η_0 es la viscosidad inicial de la disolución.

La velocidad de reacción se puede definir como

$$v = - \frac{dh}{dt} = (h_0 - C) \cdot k \cdot e^{-kt} \quad (2)$$

de la que se obtiene la velocidad inicial para $t = 0$, y

$$\text{velocidad inicial} = (\eta_0 - C) \cdot k \quad (3)$$

siendo η_0 la viscosidad inicial de la disolución.

Esta ecuación se corresponde con la derivada de la ecuación (1) en el origen.

En consecuencia, la velocidad inicial de degradación del sustrato se calculará mediante la ecuación (3)

En la Tabla 5-24, se exponen estos valores ya calculados a partir de los datos de las experiencias. El valor de cada actividad inicial se obtiene dividiendo los valores de las velocidades iniciales por $4 \cdot 10^{-3}$ mg de proteína enzimática / mL, siendo U (mPa·s / min).

En todos los ensayos, el descenso de la viscosidad es más acusado en el inicio y se va atenuando posteriormente, hasta que al final de las experiencias se puede decir que prácticamente se ha estabilizado.

Según los ensayos, la actuación de la enzima muestra comportamiento óptimo cuando el pH del medio es 3,6 y 4,0 debido a que las actividades enzimáticas son las mayores, aunque la máxima actividad enzimática se produce cuando el pH es 4,0. En cambio, en los ensayos a pH 4,5; 5,0; y 5,5 los valores de la actividad enzimática son menores, aunque a pH 5,0 vuelve a mostrar un pico mayor posiblemente debido a la entrada en acción de la enzima pectina-liasa y ha incrementado la velocidad de degradación del sustrato.

pH (mPa·s)	η_0 (mPa·s)	C (mPa·s)	K (min ⁻¹)	Velocidad inicial·10 ³ (mPa·s/min·mL)	Actividad inicial (U/mg)
3,6	1,230	0,601	0,1585	9,97	2,49
4,0	1,277	0,601	0,1561	10,60	2,65
4,5	1,110	0,601	0,1341	6,83	1,70
5,0	1,263	0,601	0,1341	8,09	2,02
5,5	1,286	0,850	0,1372	5,98	1,49

Tabla 5-24
Actividad endoPGAasa a distintos pH.

En consecuencia, la capacidad máxima de hidrólisis de las enzimas endoPGAsas de la mezcla industrial de enzimas pectolíticos se produce a pH 4,0 por el sustrato utilizado y en las condiciones especificadas.

5.3.2.2. Determinación de parámetros cinéticos de la actividad endopoligalacturonásica

Los ensayos se repiten ahora en las condiciones seleccionadas, pero con distintas disoluciones de ácido poligalacturónico puro como sustrato, de concentraciones de 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; y 20,0 g/L

Se hace un seguimiento de la disminución de la viscosidad de la disolución del sustrato durante 60 minutos, y se transforman los datos de las experiencias, de unidades de tiempo a unidades de viscosidad.

Los resultados de los ensayos se representan en las gráficas de las figuras siguientes:

[Figura 5-83](#)

[Figura 5-84](#)

[Figura 5-85](#)

[Figura 5-86](#)

[Figura 5-87](#)

[Figura 5-88](#)

[Figura 5-89](#)

La evolución de la viscosidad de la disolución del PGA en los primeros minutos de actuación de las enzimas se puede expresar en función del tiempo mediante la misma relación que en el caso anterior, la expresión 5.3.2.1. (1).

$$\eta = (\eta_0 - C) e^{-kt} + C$$

De la misma manera se calcula la velocidad inicial de degradación del sustrato mediante la ecuación 5.3.2.1. (3)

$$\text{velocidad inicial} = (\eta_0 - C) \cdot k$$

En la gráfica de la [Figura 5-90](#) se muestran los valores ya calculados de las velocidades iniciales a partir de los datos de las experiencias.

La viscosidad de la disolución de sustrato disminuye en todos los ensayos más acusadamente al inicio del tiempo de actuación de enzimática hasta que se atenúa progresivamente, estabilizándose al final del seguimiento. En consecuencia, habrá incrementos de las velocidades de las velocidades con la concentración de sustrato, hasta valores máximos que se estabilizan.

Caracterización de la actividad de la enzima

La variación de la velocidad inicial de la degradación de la pectina por las enzimas endopoligalacturonasas a medida que aumenta la concentración, puede expresarse mediante la relación de Michaelis y Menten:

$$v = \frac{V \cdot S}{K_m + S}$$

siendo:

v, la velocidad inicial, en mPa/min • mL

S, la concentración inicial de sustrato, en mol / L

V, la velocidad inicial máxima, en mPa•s / min • L

K_m, la constante de Michaelis y Menten, en mol / L

debido al comportamiento michaeliano de la actividad enzimática.

Si se ajustan los datos ya plasmados en la gráfica de la [Figura 5-90](#) mediante la transformación lineal de Lineweaver-Burk), se obtienen los valores de las constantes que representan la velocidad inicial máxima de pérdida de la viscosidad y $K_{m\text{-endo}}$ que caracteriza la actividad endopoligalacturonásica de la enzima en las condiciones de las experiencias, en la gráfica de la [Figura 5-91](#).

Del ajuste anterior, se obtienen los siguientes valores:

$$V = 1,602 \cdot 10^{-2} \text{ mPa.s / min} \cdot \text{mL}$$

$$K_{m\text{-endo}} = 2,229 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

con $R^2 = 0,913$

5.3.3. Relación entre la actividad endo y exopoligalacturonásica de una mezcla industrial de enzimas pectolíticas

Las distintas mezclas de enzimas pectolíticas que se obtienen industrialmente por biotecnología, pueden tener distintas actividades tanto exo como endopoligalacturonásicas. Aparte de la determinación de las actividades endo y exo por separado, determinaciones que ya se han efectuado en los apartados anteriores, también puede ser de interés, obtener un parámetro que relacione ambos tipos de actividades, y de esta manera poder comparar entre distintas mezclas industriales de enzimas pectolíticas.

La comparación de la actividad de los dos tipos de enzimas es preciso que se haga a partir de experiencias con condiciones de trabajo idénticas para utilizar un criterio objetivo.

Se mantiene asimismo el criterio inicial de seleccionar condiciones de trabajo cercanas a las que utiliza la industria clarificadora. De esta manera, las condiciones comunes serán las mismas utilizadas que en los ensayos para determinar por separado la actividad de las enzimas exo y endopoligalacturonasas.

- Temperatura: 45°C
- pH del medio: 3,6 (disolución tampón de ácido cítrico- bifosfato sódico)
- Concentración de enzima: 10⁻⁴ mL concentrado/mL disolución sustrato que equivalen a una concentración de proteína enzimática de 4 • 10⁻³ mg / mL
- Concentración de la disolución de sustrato (PGA puro): 15 g/L

5.3.3.1. Determinación de la actividad exopoligalacturonásica para relacionar las actividades endo y exo

Recta de calibrado del ácido α -D-galacturónico

Facilita el seguimiento de la formación de producto (ácido galacturónico libre) debido a la hidrólisis enzimática.

Sin presencia de ácido poligalacturónico

En este caso la muestra en blanco contiene solamente disolución tampón.

Después del análisis de regresión lineal de los datos obtenidos, la concentración de ácido galacturónico libre y la absorbancia se relacionan según las expresiones:

$$\text{u.a.} = -1,441 \cdot 10^{-3} + \text{ppm AGA} \cdot 8,462 \cdot 10^{-4} \quad \text{siendo } R^2 = 0,9974$$

$$\text{u.a.} = -1,427 \cdot 10^{-3} + \mu\text{mol AGA/mL} \cdot 0,1795 \quad \text{siendo } R^2 = 0,9974$$

Con presencia de ácido galacturónico

En este caso la muestra en blanco de referencia contiene una mezcla de disolución tampón y de disolución de ácido poligalacturónico de concentración 15 g/L;

Según el análisis de la regresión lineal de los datos obtenidos, las expresiones siguientes relacionan la concentración de ácido galacturónico libre y la absorbancia.

$$\text{u.a.} = 0,756 + \text{ppm AGA} \cdot 6,297 \cdot 10^{-4} \quad \text{siendo } R^2 = 0,9951$$

$$\text{u.a.} = 0,756 + \mu\text{mol AGA/mL} \cdot 0,1470 \quad \text{siendo } R^2 = 0,9951$$

Actividad enzimática

Los resultados del seguimiento de la actividad hidrolítica enzimática están representados en la gráfica de la [Figura 5-92](#), expresando la cantidad de producto liberado en $\mu\text{mol/mL}$ de AGA.

La muestra en blanco contiene ácido poligalacturónico de concentración 15 g/L

De 5.3.1.2 (1), la progresión en la formación de producto en función del tiempo puede expresarse mediante:

$$\text{Producto liberado} = \frac{\text{Producto máximo liberado} \cdot \text{tiempo}}{c + \text{tiempo}} \quad (1)$$

c (en min) valor constante de la curva

La actividad enzimática exo se definiría como la cantidad de enzima que liberaría un micromol de AGA / min. La actividad se va modificando a medida que transcurre la hidrólisis del PGA. Es conveniente, pues, calcular la actividad de la enzima en cada intervalo de tiempo a través de la expresión:

$$\text{Actividad}_{t_n} = \frac{\text{producto liberado}_{t_n} - \text{producto liberado}_{t_{n-1}}}{t_n - t_{n-1}}$$

siendo:

t_n , el tiempo en minutos en el que se efectúa una medida espectrofotométrica.

t_{n-1} , el tiempo medido anterior a t_n

Las unidades de la expresión anterior, pueden expresarse como unidades de velocidad ($\mu\text{mols/mL} \cdot \text{min}$) o como unidades de actividad específica (U/mg).

Ajustando los datos de la experiencia a la ecuación (1), se obtienen los valores de las constantes:

Velocidad inicial de formación = $14,924 \mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$

Producto máximo liberado = $9,823 \mu\text{mol/mL}$

$c = 0,650 \text{ min}$; siendo $R^2 = 0,9679$

5.3.3.2. Determinación de la actividad endopoligalacturonásica para relacionar las actividades endo y exo

Se utilizan los datos del ensayo realizado por la determinación de la actividad endopoligalacturonásica de las enzimas en que coinciden las condiciones de trabajo usadas con las de la determinación de la actividad exoPGAsica del apartado anterior. Los resultados del ensayo que contiene los datos necesarios están representados en la gráfica de la [Figura 5-78](#).

A continuación, se resumen los resultados de los cálculos y ajustes correspondientes.

Los parámetros cinéticos de la degradación endoPGAsica a $\text{pH} = 3,6$ ([Tabla 5-24](#)) son:

$\eta_0 = 1,230 \text{ mPa}\cdot\text{s}$

$C = 0,601 \text{ mPa}\cdot\text{s}$

$k = 0,1585 \text{ min}^{-1}$

Velocidad inicial = $9,97 \cdot 10^{-3} (\text{mPa}\cdot\text{s} / \text{min} \cdot \text{mL})$

Donde η_0 es el valor de la viscosidad inicial de la disolución y C es el valor asintótico al que tiende la viscosidad de la disolución; k es la constante cinética de degradación.

La actividad de la enzima en cada intervalo de tiempo se calcula por medio de la expresión:

$$\text{actividad}_{t_n} = \frac{\text{viscosidad}_{t_n} - \text{actividad}_{t_{n-1}}}{t_n - t_{n-1}} \quad (\text{en mPa}\cdot\text{s}/\text{min})$$

$$t_n - t_{n-1}$$

siendo:

t_n , el tiempo en minutos en el que se efectúa una medida viscosimétrica,

y

t_{n-1} el tiempo de la medida anterior a t_n .

5.3.3.3. Índice de capacidad macerante de una mezcla de enzimas pectolíticas industriales

Inspirado en el parámetro introducido por Chan y Tam (1982), proporcional al carácter endo de una preparación pectolítica, se puede establecer un coeficiente que relacione la actividad de las enzimas endo y exo poligalacturonasas presentes conjuntamente en una mezcla, el coeficiente, índice de capacidad macerante, ICM, calculado para cada intervalo de tiempo.

$$\text{ICM} = \frac{\text{actividad endoPGAsica}}{\text{actividad exoPGAsica}}$$

Las unidades de ICM se expresarán en $\text{mPa}\cdot\text{s} / \mu\text{mol AGA}$

Una mezcla de enzimas pectolíticas sería deseable que tuviera una alta actividad endo y exo poligalacturonásica, y también un alto valor de ICM que aumentara con el tiempo, ya que implicaría una mayor actividad endopoligalacturonásica que sería muy útil en la resolución de problemas técnicos en la industria agroalimentaria como: la eliminación de la turbidez de zumos, la eliminación de posos vegetales que obturan filtros en las industrias de zumos, enológicas, etc.

En la Tabla 5-25y gráfica de la [Figura 5-93](#) se muestran los valores de las actividades y del ICM calculados a partir de los datos de las experiencias, sin embargo con el fin de expresar el I.C.M. en las unidades que más arriba se exponen, es necesario expresar las actividades endo y exo en unidades de actividad específica.

Para la actividad endopoligalacturonásica, se utilizaron 10 mL de solución en el viscosímetro capilar y hay que tener en cuenta que la concentración de proteína enzimática en la disolución es de $4 \cdot 10^{-3}$ mg enz/mL

$$\begin{aligned} \text{mg enzimas} &= \frac{4 \cdot 10^{-3} \text{ mg enz.}}{\text{mL disolución}} \cdot 10 \text{ mL disolución} = \\ &= 4 \cdot 10^{-2} \text{ mg enz.} \end{aligned}$$

por tanto, los resultados de la actividad enzimática endo, en $\text{mPa}\cdot\text{s}$, deberán dividirse por $4 \cdot 10^{-2}$ para poder expresarse como $\text{mPa}\cdot\text{s}/\text{min} \cdot \text{mg enz.}$

La actividad exopoligalacturonásica, se expresará en μmol de sustrato/min \cdot mg de

proteína enzimática, para ello las unidades se modificarán de la manera siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Actividad exo} &= \frac{\mu \text{ mol de AGA}}{4 \cdot 10^{-3} \text{ mg enz.} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}} = \\ &= \frac{\mu \text{mol AGA}}{\text{min} \cdot 4 \cdot 10^{-3} \text{ mg enz.}} \end{aligned}$$

La actividad exopoligalacturonásica se expresará en $\mu\text{mol AGA}/\text{min} \cdot \text{mg}$

Tiempo (min)	Actividad endoPGAsica		Actividad exo PGAsica		ICM
	(mPa·s/min) 10 ²	(mPa·s/min·mg enz.)	($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$)	($\mu\text{mol AGA}/\text{min} \cdot \text{mg enz}$)	(mPa·s/ μmol) 10 ⁴
0,00	9,970	2,492	14,924	3731,0	6,80
1,17	9,402	2,350	5,372	1343,2	17,50
3,08	2,618	0,6545	0,9459	236,4	27,67
4,83	2,286	0,5715	0,3151	78,77	72,54
6,58	2,117	0,5292	0,1627	40,67	133,43
8,25	1,677	0,4192	0,1002	25,05	167,23
9,83	1,709	0,4272	0,0692	17,30	246,97
11,42	1,447	0,3617	0,0510	12,75	283,45
13,00	1,266	0,3165	0,0392	9,80	323,01
14,50	1,133	0,2832	0,0312	7,80	362,95
16,00	1,000	0,2500	0,0256	6,40	390,59

Tabla 5-25

Índice de capacidad macerante en el tiempo de actuación enzimática.

El índice de capacidad macerante, aumenta de manera lineal durante los primeros minutos de actuación de las enzimas (Gráfica de la [Figura 5-93](#)): Su incremento puede expresarse de la forma.

$$\text{ICM} = - 0,00272 + 0,00263 t \quad (1);$$

t, en minutos y con $R^2 = 0,9809$

Es decir a medida que avanza el tiempo de actuación de las enzimas de la mezcla industrial de enzimas pectolíticas analizada, la actividad de las enzimas endopoligalacturonasas es más importante respecto a la actividad de las enzimas exopoligalacturonasas.

5.3.3.3.1. Capacidad macerante al 50 % de viscosidad

Un criterio para caracterizar distintas mezclas de enzimas pécicas que contengan las enzimas endo y exopoligalacturonasas consiste en obtener el valor que tenga el ICM definido en el tiempo necesario, para que la viscosidad de la disolución de sustrato disminuya al 50 % de la inicial.

En la gráfica de la [Figura 5-94](#) se muestran los valores del descenso de viscosidad en % en función del tiempo.

En la misma gráfica se observa, que el porcentaje de pérdida de viscosidad de la disolución de sustrato es más acusado al comienzo del periodo de actuación de las enzimas y va atenuándose después de forma progresiva hasta que se estabiliza hacia el final del seguimiento, probablemente por inhibición por producto.

De la propia gráfica de la [Figura 5-94](#), el tiempo que transcurre hasta que el valor de la viscosidad se reduce en un 50 % resulta ser de 8,92 min

Calculando para éste tiempo a través de la expresión 5.3.3.3 (1), el valor del índice de capacidad macerante al 50 % de viscosidad, resulta entonces:

$$\text{ICM} = 0,0207 \text{ mPa} \cdot \text{s} / \mu\text{mol AGA}$$

Este resultado tiene un valor comparativo en relación a otras mezclas pectolíticas y da la idea de la capacidad de conseguir niveles más o menos grandes de despectinación en los procesos industriales agroalimentarios.

5.3.4. Estudio cinético de la degradación enzimática de la pectina de melocotón y su modelización

En los apartados anteriores se han determinado los parámetros cinéticos de la mezcla industrial de enzimas pectolíticas. Esta misma mezcla enzimática estudiada, se va a utilizar para efectuar el estudio de la degradación de la pectina de melocotón extraída a distintas condiciones y, como el número de muestras extraída es muy alto, el estudio se acota a las muestras de máximo rendimiento en la extracción a las temperaturas de 40°, 50°, 60°, 70° y 80°C.

Se han efectuado degradaciones sobre las muestras de pectina de melocotón de acuerdo con el apartado 4.14 de Material y métodos. Las disoluciones de pectina se han tamponado a un pH de 3,6 y las experiencias se efectúan a 45°C. Ya se ha visto en los apartados anteriores las actividades de la mezcla enzimática a estas condiciones.

A partir de los valores del σ (esfuerzo cortante) y $\dot{\gamma}$ obtenidos de las lecturas del viscosímetro Rotovisco RV 12, se calcula el valor de la viscosidad aparente (η_a) según:

$$\eta_a = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \text{ (Pa}\cdot\text{s)} \quad (1)$$

A partir de ahora se utilizará en término viscosidad para denominar a la viscosidad aparente.

Se han efectuado degradaciones sobre las muestras de melocotón de máxima extracción y, una vez obtenidos los resultados de las viscosidades en función del tiempo que se muestran en las gráficas de las figuras de número impar desde la 5-95 a la 5-158 (a

continuación), se observa que la unión de los puntos trazados en las gráficas de número impar, sugiere la forma de curvas exponenciales negativas. Estas curvas son típicas de la cinética de primer orden, y en éste modelo cinético:

$$dC_p/dt = -k_p C_p \quad (2)$$

siendo:

C_p , concentración de pectina

t , el tiempo de degradación

k_p , la constante cinética de pseudoprimer orden

[Figura 5-95](#)
[Figura 5-98](#)
[Figura 5-101](#)
[Figura 5-104](#)
[Figura 5-107](#)
[Figura 5-110](#)
[Figura 5-113](#)
[Figura 5-116](#)
[Figura 5-119](#)
[Figura 5-122](#)
[Figura 5-125](#)
[Figura 5-128](#)
[Figura 5-131](#)
[Figura 5-134](#)
[Figura 5-137](#)
[Figura 5-140](#)
[Figura 5-143](#)
[Figura 5-146](#)
[Figura 5-149](#)
[Figura 5-152](#)
[Figura 5-155](#)
[Figura 5-158](#)

[Figura 5-96](#)
[Figura 5-99](#)
[Figura 5-102](#)
[Figura 5-105](#)
[Figura 5-108](#)
[Figura 5-111](#)
[Figura 5-114](#)
[Figura 5-117](#)
[Figura 5-120](#)
[Figura 5-123](#)
[Figura 5-126](#)
[Figura 5-129](#)
[Figura 5-132](#)
[Figura 5-135](#)
[Figura 5-138](#)
[Figura 5-141](#)
[Figura 5-144](#)
[Figura 5-147](#)
[Figura 5-150](#)
[Figura 5-153](#)
[Figura 5-156](#)

[Figura 5-97](#)
[Figura 5-100](#)
[Figura 5-103](#)
[Figura 5-106](#)
[Figura 5-109](#)
[Figura 5-112](#)
[Figura 5-115](#)
[Figura 5-118](#)
[Figura 5-121](#)
[Figura 5-124](#)
[Figura 5-127](#)
[Figura 5-130](#)
[Figura 5-133](#)
[Figura 5-136](#)
[Figura 5-139](#)
[Figura 5-142](#)
[Figura 5-145](#)
[Figura 5-148](#)
[Figura 5-151](#)
[Figura 5-154](#)
[Figura 5-157](#)

Como la viscosidad de las soluciones de pectina es proporcional a la concentración de pectina ($C_p \propto \eta - C$), siendo C el límite de η a $t = \infty$, la ecuación (2) se puede expresar como:

$$\frac{d(\eta - C)}{dt} = -k(\eta - C) \quad (3)$$

y separando variables e integrando la ecuación (3), tomando como límites iniciales $\eta = \eta_0$ y $t = 0$, obtenemos la ecuación (1) de 5.3.2.1. que puede linealizarse si se expresa en forma logarítmica y queda:

$$\ln(\eta - C) = \ln(\eta_0 - C) - kt \quad (4)$$

Así pues, la constante k de la ecuación (1), sería la constante global cinética de 1er

orden de la degradación enzimática de la pectina de melocotón por poligalacturonasas de la mezcla industrial de enzimas pectolíticas.

Si se representan los valores del primer miembro de la ecuación (4) respecto al tiempo, los puntos representados se ajustan a una recta cuya pendiente es k y cuya ordenada en el origen es $\ln(\eta_0 - C)$. Todo ello se representa en las gráficas de las figuras anteriores de la 5-92 a 5-155 de número par.

En la Tabla 5-26 se muestran los valores de la constante cinética de pseudoprimer orden, k . La media de los valores es de $k = 1,071 \cdot 10^{-2} \text{s}^{-1}$ y la gama de máxima frecuencia de valores es de $0,9$ a $1,3 \cdot 10^{-2} \text{s}^{-1}$ para las muestras de temperaturas de extracción de 40° , 60° y 80°C .

En la mayoría de representaciones gráficas que corresponden a los ajustes lineales de las curvas de degradación se observa, que en la alineación de los puntos hay un ligero cambio de pendiente que empieza entre 150 y 200 s. Ello se interpreta como un proceso en dos etapas consecutivas no simultáneas. Hay que tener en cuenta que en ésta reacción y a éste pH, en realidad actúan dos tipos de enzimas: en primer lugar las pectinesterasas que catalizan la desmetilación de la pectina, y en segundo lugar las poligalacturonasas. Estas últimas no pueden actuar si los residuos no están desmetilados. Se descarta la actividad de las pectinidas cuyo pH de actividad óptima es muy superior al de las experiencias.

Probablemente hay una primera etapa en la cual hay mayor cantidad de residuos metilados que impiden parcialmente la degradación a las poligalacturonasas por impedimento estérico, y una segunda etapa en la que la pectina puede presentar mayores segmentos desmetilados y las poligalacturonasas tienen más acceso a los enlaces que degradan. Una prueba de ello, es que en muestras con grado de metilación bajo presentan un mejor ajuste que las muestras de grado de metilación alto. En la Tabla 5-26 se incluye para algunas muestras las constantes de las dos etapas mencionadas, siendo k_1 la constante de la primera etapa y k_2 la de la segunda. De los valores de estas dos constantes se deduce que, en la segunda etapa la velocidad de degradación aumenta entre dos y tres veces con respecto a la primera etapa.

Muestra extraída a Temp/pH/tiempo (°C) (s)	η_0 (mPa·s)	$k \cdot 10^3$ (s ⁻¹)	R^2	$k_1 \cdot 10^3$ (s ⁻¹)	R^2	$k_2 \cdot 10^3$ (s ⁻¹)	R^2
40/1,20/70	229	12,7	0,952	7,33	0,996	13,0	0,998
40/1,40/70	117	10,2	0,960				
40/1,54/70	98,6	11,0	0,957				
40/1,79/70	120	12,6	0,942	6,82	0,990	15,8	0,998
40/2,05/50	128,1	16,6	0,937	8,83	0,987	14,5	0,985
40/2,53/70	83,7	9,46	0,924				
60/1,20/50	98,5	8,96	0,961	6,92	0,993	20,2	0,999
60/1,40/50	160,4	11,9	0,905				
60/1,54/50	88,8	9,17	0,904				
60/1,79/40	136,9	15,6	0,968				
60/2,05/40	112,9	12,2	0,939				
60/2,53/60	68,1	2,00	0,942				
80/1,20/60	127,0	5,43	0,935	2,39	0,999	5,76	0,984
80/1,40/70	77,7	4,48	0,925	2,92	0,993	8,81	0,998
80/1,54/40	80,1	10,2	0,954	6,46	0,998	11,6	0,990
80/1,79/50	76,2	5,38	0,944				
80/2,05/60	104,7	19,5	0,958				
80/2,53/40	130,6	14,5	0,916				

50/0,91/50	19,2	9,3	0,910
50/1,20/60	104,0	6,34	0,935
50/1,40/60	58,8	7,36	0,880
50/1,54/80	211,0	3,24	0,900
50/1,79/80	51,1	11,6	0,970
50/2,05/70	77,1	14,7	0,977
50/2,53/70	61,4	15,0	0,954
70/0,91/60	68,1	7,31	0,920
70/1,20/30	189,0	7,33	0,970
70/1,40/60	119,0	8,91	0,890
70/1,54/50	449,0	6,23	0,915
70/1,79/60	588,0	6,86	0,973
70/2,05/80	69,5	7,80	0,900
70/2,53/70	211,0	7,50	0,984

Tabla 5-26

Resultados del ajuste lineal de las curvas de degradación.

5.4. Caracterización reológica de geles azucarados de pectina de melocotón

La pectina se utiliza principalmente en la industria agroalimentaria. En procesos tales como en la fabricación de mermelada, se añade pectina junto con azúcar, formándose un gel que da espesor y consistencia al producto acabado.

Es por ello que, en éste trabajo, se determinan diferentes parámetros reológicos a tres concentraciones de pectina en disoluciones azucaradas: 6,66 %; 5,55 % y 4,44 %

5.4.1. Reogramas de los geles

Los resultados de las medidas reológicas se representan en las gráficas de las figuras 8-1 a 8-59 en el apartado Anexo (págs 304-305) en las que corresponden a valores de esfuerzo cortante frente a la velocidad de deformación para los geles de distintas concentraciones a todas las temperaturas ensayadas.

Estos datos experimentales se han ajustado a la expresión de la ley de la potencia [$\sigma = k(\dot{\gamma})^n$] mediante el método de los mínimos cuadrados, resultando tanto el ajuste como las estimaciones de los parámetros índice de consistencia (k), e índice de comportamiento al flujo (n), significativos en un nivel del 95 % de probabilidad en un test de F.

Al obtenerse unos valores del índice de comportamiento al flujo (n) muy próximos a la unidad se ha hecho posteriormente otro ajuste de los datos experimentales, en este caso a la ley de Newton de la viscosidad ($\sigma = \eta \dot{\gamma}$) también con un nivel de significación del 95 %, obteniéndose un ajuste mayor para esta ecuación que para la ley de la potencia. Los resultados de estos ajustes se hallan en las tablas 5-27 a 5-35 (a continuación). En estas tablas se puede ver claramente que para un mismo gel, su viscosidad disminuye al aumentar la temperatura o disminuir la concentración de pectina del mismo.

El parámetro σ_0 representa el umbral de fluencia que necesitan los geles para comenzar a fluir, al ser los valores del umbral de fluencia, en general, menores que 1 Pa, puede suponerse que su valor es despreciable (Vitali y Rao, 1982), esta suposición se ha confirmado posteriormente en los estudios de relajación (Barbosa y Peleg, 1983)

El hecho de observarse un comportamiento newtoniano se debe a que previamente se había producido una ruptura de la estructura del gel al hacer el estudio tixotrópico del mismo.

BIBLIOTECA VIRTUAL

Pectina extraída a:			Concentración (%)	Temp. (°C)	η (mPa·s)	r			
T ^a (°C)	pH	t (min.)							
40	2.53	50	6.66	25	82.1 ± 0.7	0.9999			
				35	44.9 ± 0.3	0.9999			
				45	29.8 ± 0.7	0.9993			
				55	21.3 ± 0.4	0.9996			
				65	17.3 ± 0.5	0.9990			
				75	13.1 ± 0.4	0.9990			
				5.55	25	76.0 ± 1.0	0.9998		
			35	39.8 ± 0.5	0.9998				
			45	24.9 ± 0.4	0.9997				
			55	18.3 ± 0.4	0.9995				
			65	12.6 ± 0.2	0.9996				
			75	9.5 ± 0.2	0.9993				
			4.44	25	43.2 ± 0.8	0.9991			
			35	29.3 ± 0.6	0.9993				
			45	20.1 ± 0.3	0.9993				
			55	14.3 ± 0.4	0.9976				
			65	10.1 ± 0.2	0.9988				
			75	8.2 ± 0.2	0.9985				
			40	2.05	50	6.66	25	92.6 ± 0.8	0.9999
							35	89.0 ± 1.0	0.9997
							45	44.0 ± 0.6	0.9997
55	29.0 ± 1.0	0.9975							
65	19.0 ± 0.5	0.9997							
75	17.4 ± 0.4	0.9996							
5.55	25	82.8 ± 0.9					0.9998		
35	79.0 ± 2.0	0.9990							
45	33.6 ± 0.4	0.9980							
55	21.2 ± 0.4	0.9996							
65	15.0 ± 0.4	0.9993							
75	13.6 ± 0.2	0.9997							
4.44	25	59.3 ± 0.7				0.9998			

35	48.0 ± 3.0	0.9964
45	23.8 ± 0.4	0.9995
55	15.0 ± 0.4	0.9991
65	10.9 ± 0.3	0.9991
75	8.6 ± 0.2	0.9990

Tabla 5-27

Ajuste de las curvas de fluidez de geles de pectina extraída a diferentes condiciones.

Pectina extraída a:			Concentración (%)	Temp. (°C)	η (mPa·s)	r	
T ^a (°C)	pH	t (min.)					
40	1.79	60	6.66	25	95.7 ± 0.5	0.9999	
				35	66.0 ± 0.7	0.9998	
				45	48.0 ± 1.7	0.9997	
				55	43.0 ± 1.0	0.9994	
				65	28.7 ± 0.4	0.9997	
				75	21.4 ± 0.6	0.9988	
				5.55	25	84.6 ± 0.2	0.9989
	35	48.9 ± 0.5	0.9998				
	45	34.3 ± 0.7	0.9994				
	55	23.5 ± 0.3	0.9997				
	65	21.1 ± 0.5	0.9994				
	75	17.5 ± 0.3	0.9997				
	4.44	25	45.0 ± 1.0	0.9990			
	35	40.6 ± 0.8	0.9995				
	45	31.8 ± 0.4	0.9998				
	55	20.8 ± 0.4	0.9996				
	65	15.8 ± 0.4	0.9993				
	75	12.3 ± 0.3	0.9992				
	40	1.54	50	6.66	25	108.9 ± 0.8	0.9999
					35	61.0 ± 1.0	0.9996
					45	36.7 ± 0.7	0.9993
55					29.8 ± 0.6	0.9995	
65					23.3 ± 0.6	0.9991	
75					19.8 ± 0.7	0.9982	
5.55					25	94.0 ± 3.0	0.9986
35		48.0 ± 3.0	0.9972				
45		30.0 ± 1.0	0.9966				
55		24.0 ± 2.0	0.9937				
65		15.0 ± 1.0	0.9994				

4.44	75	14.3 ± 0.4	0.9988
	25	71.8 ± 0.9	0.9998
	35	36.0 ± 1.0	0.9987
	45	26.9 ± 0.5	0.9996
	55	19.6 ± 0.9	0.9973
	65	13.2 ± 0.4	0.9988
	75	7.1 ± 0.3	0.9983

Tabla 5-28

Ajuste de las curvas de fluidez de geles de pectina extraída a diferentes condiciones.

Pectina extraída a:			Concentración (%)	Temp. (°C)	η (mPa·s)	r		
T ^a (°C)	pH	t (min.)						
40	1.79	70	6.66	25	85.5 ± 0.6	0.9999		
				35	40.3 ± 0.7	0.9965		
				45	29.0 ± 0.5	0.9993		
				55	18.6 ± 0.5	0.9989		
				65	12.6 ± 0.3	0.9991		
				75	9.3 ± 0.3	0.9988		
				25	81.0 ± 1.0	0.9996		
		5.55	35	38.8 ± 0.6	0.9997			
						45	25.8 ± 0.9	0.9983
						55	17.2 ± 0.5	0.9991
						65	11.6 ± 0.2	0.9995
						75	8.8 ± 0.2	0.9992
						25	66.9 ± 0.9	0.9997
		4.44	35	33.0 ± 0.5	0.9996			
						45	23.1 ± 0.7	0.9990
						55	14.5 ± 0.5	0.9987
						65	10.4 ± 0.4	0.9985
						75	8.2 ± 0.4	0.9970
						25	100.0 ± 1.0	0.9999
						40	1.2	70
		45	28.9 ± 0.6	0.9994				
55	21.3 ± 0.5	0.9973						
65	14.1 ± 0.4	0.9988						
75	10.1 ± 0.3	0.9986						
5.55	25	97.4 ± 0.9	0.9999					
				35	44.4 ± 0.7			0.9997
				45	23.7 ± 0.5			0.9995

	55	18.0 ± 0.6	0.9986
	65	10.6 ± 0.2	0.9993
	75	8.8 ± 0.3	0.9987
4.44	25	86.0 ± 1.0	0.9998
	35	39.0 ± 0.5	0.9998
	45	21.0 ± 0.2	0.9998
	55	15.0 ± 0.3	0.9996
	65	9.4 ± 0.2	0.9994
	75	7.2 ± 0.2	0.9987

Tabla 5-29

Ajuste de las curvas de fluidez de geles de pectina extraída a diferentes condiciones.

Pectina extraída a:			Concentración (%)	Temp. (°C)	η (mPa·s)	r		
T ^a (°C)	pH	t (min.)						
60	2.53	60	6.66	25	101. ± 01.0	0.9998		
				35	52.0 ± 2.0	0.9985		
				45	34.0 ± 0.9	0.9991		
				55	24.2 ± 0.5	0.9993		
				65	19.6 ± 0.6	0.9990		
				75	14.8 ± 0.4	0.9990		
				5.55	25	95.0 ± 3.0	0.9990	
					35	45.8 ± 0.9	0.9995	
					45	31.0 ± 0.5	0.9996	
		4.44	55	21.3 ± 0.3	0.9997			
			65	16.2 ± 0.3	0.9996			
			75	12.0 ± 0.2	0.9996			
			25	76.0 ± 3.0	0.9971			
			35	39.7 ± 0.7	0.9995			
			45	28.7 ± 0.5	0.9996			
			55	17.9 ± 0.3	0.9996			
			65	12.5 ± 0.5	0.9976			
			75	8.1 ± 0.4	0.9968			
		40	2.05	60	6.66	25	104.0 ± 2.0	0.9996
						35	53.0 ± 1.0	0.9990
						45	35.1 ± 0.7	0.9995
55	26.1 ± 0.5					0.9976		
65	18.4 ± 0.4					0.9992		
75	14.0 ± 0.3					0.9993		
5.55	25					73.0 ± 3.0	0.9980	

	35	42.0 ± 1.0	0.9991
	45	28.6 ± 0.5	0.9995
	55	20.9 ± 0.4	0.9995
	65	15.8 ± 0.3	0.9994
	75	12.3 ± 0.3	0.9994
4.44	25	42.6 ± 0.6	0.9997
	35	21.2 ± 0.7	0.9988
	45	16.8 ± 0.4	0.9992
	55	11.7 ± 0.4	0.9986
	65	8.8 ± 0.3	0.9986
	75	6.9 ± 0.2	0.9986

Tabla 5-30

Ajuste de las curvas de fluidez de geles de pectina extraída a diferentes condiciones.

BIBLIOTECA VIRTUAL

MIGUEL D
CERVANTES

Pectina extraída a:			Concentración (%)	Temp. (°C)	η (mPa·s)	r
T ^a (°C)	pH	t (min.)				
60	1.79	50	6.66	25	84.0 ± 1.0	0.9998
				35	45.6 ± 0.5	0.9998
				45	36.8 ± 0.5	0.9997
				55	24.9 ± 0.4	0.9997
				65	16.2 ± 0.4	0.9993
			75	13.2 ± 0.3	0.9992	
			5.55	25	78.4 ± 0.8	0.9998
				35	38.1 ± 0.7	0.9995
				45	25.9 ± 0.5	0.9996
				55	17.4 ± 0.3	0.9995
				65	12.4 ± 0.4	0.9988
			4.44	75	10.0 ± 0.3	0.9986
				25	75.0 ± 1.0	0.9997
				35	32.3 ± 0.6	0.9995
				45	23.4 ± 0.6	0.9991
55	14.8 ± 0.4	0.9991				
60	1.54	70	6.66	65	11.2 ± 0.3	0.9987
				75	9.0 ± 0.2	0.9994
				25	85.0 ± 0.5	0.9999
				35	49.8 ± 0.6	0.9998
				45	34.1 ± 0.4	0.9998
				55	25.6 ± 0.6	0.9993
65	15.8 ± 0.4	0.9990				

5.55	75	12.1 ± 0.5	0.9976
	25	73.0 ± 1.0	0.9997
	35	37.0 ± 1.0	0.9989
	45	26.2 ± 0.6	0.9992
	55	18.7 ± 0.5	0.9991
4.44	65	13.4 ± 0.4	0.9986
	75	10.9 ± 0.4	0.9984
	25	71.0 ± 1.0	0.9997
	35	31.1 ± 0.6	0.9995
	45	21.4 ± 0.5	0.9994
	55	14.1 ± 0.3	0.9995
	65	11.0 ± 0.3	0.9989
	75	8.2 ± 0.2	0.9992

Tabla 5-31

Ajuste de las curvas de fluidez de geles de pectina extraída a diferentes condiciones.

BIBLIOTECA VIRTUAL

MIGUEL D
CERVANTES

Pectina extraída a:			Concentración (%)	Temp. (°C)	η (mPa·s)	r
T ^a (°C)	pH	t (min.)				
60	1.4	50	6.66	25	94.2 ± 0.9	0.9999
				35	30.3 ± 0.4	0.9997
				45	20.7 ± 0.5	0.9993
				55	14.6 ± 0.5	0.9988
				65	11.1 ± 0.3	0.9988
				75	9.9 ± 0.4	0.9977
				5.55	25	73.0 ± 2.0
			35	26.3 ± 0.6	0.9994	
			45	18.0 ± 0.3	0.9997	
			55	12.0 ± 0.3	0.9994	
			65	9.2 ± 0.3	0.9984	
			75	8.3 ± 0.3	0.9985	
			4.44	25	57.1 ± 0.7	0.9998
			35	18.0 ± 0.5	0.9991	
			45	12.4 ± 0.3	0.9991	
55	9.5 ± 0.3	0.9988				
65	7.6 ± 0.3	0.9975				
75	6.6 ± 0.3	0.9969				
60	1.2	50	6.66	25	69.0 ± 1.0	0.9997
				35	27.4 ± 0.7	0.9993

	45	18.9 ± 0.6	0.9986
	55	11.9 ± 0.5	0.9975
	65	8.7 ± 0.3	0.9980
	75	7.7 ± 0.3	0.9984
5.55	25	52.0 ± 0.9	0.9995
	35	21.6 ± 0.5	0.9999
	45	14.2 ± 0.4	0.9990
	55	10.4 ± 0.3	0.9990
	65	7.4 ± 0.3	0.9973
	75	61.3 ± 0.2	0.9982
4.44	25	40.4 ± 0.8	0.9994
	35	18.9 ± 0.5	0.9991
	45	12.2 ± 0.3	0.9989
	55	8.5 ± 0.3	0.9989
	65	6.0 ± 0.3	0.9972
	75	4.8 ± 0.2	0.9975

Tabla 5-32

Ajuste de las curvas de fluidez de geles de pectina extraída a diferentes condiciones.



Pectina extraída a:			Concentración (%)	Temp. (°C)	η (mPa·s)	r
T ^a (°C)	pH	t (min.)				
60	2.53	40	6.66	25	107.0 ± 1.0	0.9998
				35	59.0 ± 1.0	0.9993
				45	36.8 ± 0.6	0.9997
				55	27.5 ± 0.4	0.9997
				65	19.4 ± 0.2	0.9998
				75	16.1 ± 0.4	0.9992
			5.55	25	96.0 ± 1.0	0.9999
				35	53.4 ± 0.9	0.9996
				45	32.2 ± 0.4	0.9998
				55	22.8 ± 0.4	0.9997
				65	16.9 ± 0.4	0.9994
				75	13.0 ± 0.3	0.9993
			4.44	25	68.0 ± 2.0	0.9993
				35	39.8 ± 0.7	0.9996
				45	28.4 ± 0.4	0.9998
				55	18.7 ± 0.2	0.9998
				65	13.7 ± 0.2	0.9997

80	2.05	60	6.66	75	10.0 ± 0.3	0.9992
				25	72.8 ± 0.9	0.9998
				35	30.0 ± 0.9	0.9989
				45	21.0 ± 0.6	0.9990
				55	15.8 ± 0.6	0.9984
				65	11.1 ± 0.4	0.9985
			5.55	75	8.5 ± 0.3	0.9987
				25	58.3 ± 0.9	0.9997
				35	28.2 ± 0.7	0.9992
				45	18.7 ± 0.6	0.9985
				55	13.8 ± 0.4	0.9989
				65	9.4 ± 0.3	0.9984
			4.44	75	7.5 ± 0.3	0.9980
				25	50.4 ± 0.6	0.9998
				35	20.0 ± 1.0	0.9963
				45	14.2 ± 0.4	0.9990
				55	11.0 ± 0.4	0.9984
				65	7.7 ± 0.4	0.9973
			75	6.2 ± 0.3	0.9977	

Tabla 5-33

Ajuste de las curvas de fluidez de geles de pectina extraída a diferentes condiciones.



Pectina extraída a:			Concentración (%)	Temp. (°C)	η (mPa·s)	r
T ^a (°C)	pH	t (min.)				
80	1.79	40	6.66	25	73.0 ± 2.0	0.9993
				35	37.7 ± 0.9	0.9993
				45	24.0 ± 1.0	0.9976
				55	15.2 ± 0.3	0.9994
				65	11.2 ± 0.3	0.9991
				75	8.9 ± 0.3	0.9986
			5.55	25	63.0 ± 1.0	0.9996
				35	30.5 ± 0.7	0.9993
				45	21.4 ± 0.5	0.9993
				55	12.7 ± 0.5	0.9981
				65	9.7 ± 0.3	0.9984
				75	8.0 ± 0.3	0.9983
			4.44	25	54.7 ± 0.4	0.9999
				35	23.5 ± 0.5	0.9994

				45	17.5 ± 0.4	0.9993
				55	10.2 ± 0.3	0.9986
				65	7.2 ± 0.3	0.9982
				75	6.4 ± 0.3	0.9971
80	1.54	40	6.66	25	84.9 ± 0.7	0.9999
				35	39.0 ± 0.5	0.9997
				45	28.2 ± 0.5	0.9995
				55	23.2 ± 0.5	0.9995
				65	17.6 ± 0.5	0.9989
				75	14.5 ± 0.4	0.9989
			5.55	25	77.1 ± 0.6	0.9999
				35	33.6 ± 0.4	0.9998
				45	23.7 ± 0.4	0.9996
				55	16.8 ± 0.3	0.9995
				65	15.2 ± 0.3	0.9995
				75	10.3 ± 0.3	0.9989
			4.44	25	66.0 ± 0.5	0.9999
				35	27.8 ± 0.3	0.9998
				45	18.1 ± 0.2	0.9998
				55	12.5 ± 0.1	0.9998
				65	9.6 ± 0.4	0.9982
				75	7.2 ± 0.2	0.9993

Tabla 5-34

Ajuste de las curvas de fluidez de geles de pectina extraída a diferentes condiciones.



Pectina extraída a:			Concentración (%)	Temp. (°C)	η (mPa·s)	r
T ^a (°C)	pH	t (min.)				
80	1.4	70	6.66	25	89.5 ± 0.4	0.9999
				35	48.5 ± 0.6	0.9998
				45	31.9 ± 0.5	0.9996
				55	21.0 ± 0.5	0.9993
				65	14.3 ± 0.4	0.9989
				75	11.2 ± 0.3	0.9989
			5.55	25	80.1 ± 0.7	0.9999
				35	42.2 ± 0.7	0.9997
				45	26.6 ± 0.7	0.9990
				55	17.0 ± 0.4	0.9992
				65	11.7 ± 0.4	0.9988

				75	9.2 ± 0.3	0.9985
			4.44	25	66.3 ± 0.6	0.9999
				35	33.3 ± 0.6	0.9996
				45	21.4 ± 0.4	0.9994
				55	14.8 ± 0.3	0.9995
				65	9.9 ± 0.3	0.9988
				75	7.9 ± 0.3	0.9983
80	1.2	60	6.66	25	96.0 ± 1.0	0.9997
				35	41.0 ± 1.0	0.9990
				45	27.0 ± 1.0	0.9978
				55	21.0 ± 0.6	0.9989
				65	15.3 ± 0.4	0.9993
				75	12.3 ± 0.4	0.9984
			5.55	25	80.5 ± 0.5	0.9999
				35	37.3 ± 0.8	0.9994
				45	24.2 ± 0.7	0.9988
				55	16.0 ± 0.5	0.9989
				65	11.8 ± 0.5	0.9976
				75	9.3 ± 0.5	0.9975
			4.44	25	76.0 ± 1.0	0.9997
				35	34.2 ± 0.3	0.9998
				45	19.5 ± 0.5	0.9990
				55	12.7 ± 0.3	0.9992
				65	9.9 ± 0.3	0.9988
				75	7.8 ± 0.2	0.9989

Tabla 5-35

Ajuste de las curvas de fluidez de geles de pectina extraída a diferentes condiciones.

5.4.2. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad de los geles

Al efecto de cuantificar el efecto de la temperatura sobre la viscosidad en el caso de fluidos newtonianos, se utiliza una ecuación que para correlacionar la variación de la viscosidad con la temperatura es una ecuación del tipo Arrhenius

$$\eta = K_0 \exp(E_a/RT)$$

siendo:

- η la viscosidad
- K_0 el factor de frecuencia
- E_a la energía de activación al flujo
- R la constante de los gases perfectos
- T la temperatura absoluta

Se ha estudiado la variación de la viscosidad con la temperatura para geles de distintas concentraciones conteniendo la pectina extraída a diferentes condiciones.

En las Tabla 5-37 y Tabla 5-38 se muestran los resultados de los ajustes realizados con un nivel de probabilidad del 95 % en las que puede observarse que los valores de E_a son del orden de 8 kcal/mol.

En la Tabla 5-36 se muestran los valores medios de la E_a a cada una de las concentraciones de pectina en porcentaje, y se observa que hay un ligero aumento del valor medio de la E_a cuando hay aumento de las concentraciones. El aumento de la E_a implica pues,

mayor influencia de la temperatura, pero poca ya que los valores de E_a son parecidos.

Concentración (%)	n° de muestras	Valor medio de E_a (kcal/mol)
6,66	18	$7,96 \pm 0,890$
5,55	18	$8,25 \pm 0,771$
4,44	18	$8,35 \pm 0,962$

Tabla 5-36

Valores medios de E_a a diferentes concentraciones de pectina en los geles.

Pectina extraída a:			Concentración (%)	K_0 (mPa·s)·10 ³	E_a (kcal/mol)	r
T ^a (°C)	pH	t (min.)				
40	2.53	50	6,66	0.3 ± 0.2	7.3 ± 0.5	0.9912
			5,55	0.07 ± 0.04	8.1 ± 0.7	0.9862
			4,44	0.4 ± 0.1	6.8 ± 0.2	0.9986
40	2.05	50	6,66	0.2 ± 0.1	7.9 ± 0.8	0.9773
			5,55	0.05 ± 0.02	8.5 ± 1	0.9715
			4,44	0.03 ± 0.01	8.6 ± 0.6	0.9891
40	1.79	60	6,66	4.1 ± 0.5	5.9 ± 0.4	0.9924
			5,55	1.8 ± 0.9	6.4 ± 0.6	0.9806
			4,44	3.0 ± 1.0	5.7 ± 0.5	0.9840
40	1.54	50	6,66	0.8 ± 0.2	6.9 ± 0.7	0.9786
			5,55	0.17 ± 0.08	7.7 ± 0.7	0.9817
			4,44	0.026 ± 0.009	8.7 ± 0.6	0.9901
40	1.4	70	6,66	0.023 ± 0.008	8.8 ± 0.5	0.9938
			5,55	0.019 ± 0.007	8.9 ± 0.5	0.9932
			4,44	0.03 ± 0.01	8.5 ± 0.5	0.9922
40	1.2	70	6,66	0.015 ± 0.008	9.2 ± 0.5	0.9939
			5,55	0.005 ± 0.001	9.8 ± 0.8	0.9869
			4,44	0.0029 ± 0.0009	10 ± 0.7	0.9900
60	2.53	60	6,66	0.21 ± 0.08	7.6 ± 0.6	0.9869
			5,55	0.07 ± 0.02	8.2 ± 0.6	0.9893
			4,44	0.0021 ± 0.0007	8.9 ± 0.3	0.9975
60	2.05	40	6,66	0.12 ± 0.03	8.0 ± 0.5	0.9921
			5,55	0.32 ± 0.09	7.2 ± 0.4	0.9940
			4,44	0.20 ± 0.08	7.1 ± 0.6	0.9877
60	1.79	50	6,66	0.22 ± 0.08	7.5 ± 0.4	0.9932
			5,55	0.05 ± 0.02	8.5 ± 0.8	0.9821
			4,44	0.03 ± 0.01	8.3 ± 0.6	0.9898

Tabla 5-37

Efecto de la temperatura sobre la viscosidad en geles de pectina extraída a diferentes condiciones.

Pectina extraída a:			Concentración (%)	K_0 (mPa·s) 10 ⁻³	E_a (kcal/mol)	r
T ^a (°C)	pH	t (min.)				
60	1.54	70	6,66	0.11 ± 0.04	7.9 ± 0.3	0.9973
			5,55	0.15 ± 0.07	7.6 ± 0.5	0.9900
			4,44	0.03 ± 0.01	8.5 ± 0.7	0.9854
60	1.4	50	6,66	0.003 ± 0.001	9.3 ± 1.0	0.9490
			5,55	0.002 ± 0.001	9.1 ± 1.0	0.9594
			4,44	0.004 ± 0.002	8.0 ± 1.0	0.9378

60	1.2	50	6.66	0.0022 ± 0.001	9.0 ± 1.0	0.9740
			5.55	0.0024 ± 0.0009	8.5 ± 0.9	0.9775
			4.44	0.0018 ± 0.001	8.5 ± 0.7	0.9877
80	2.53	40	6.66	0.18 ± 0.04	7.8 ± 0.5	0.9909
			5.55	0.08 ± 0.01	8.2 ± 0.5	0.9928
			4.44	0.12 ± 0.03	7.8 ± 0.2	0.9981
80	2.05	60	6.66	0.053 ± 0.03	8.3 ± 0.8	0.9795
			5.55	0.048 ± 0.02	8.2 ± 0.6	0.9892
			4.44	0.052 ± 0.03	8.0 ± 1.0	0.9715
80	1.79	50	6.66	0.028 ± 0.007	8.6 ± 0.6	0.9911
			5.55	0.027 ± 0.009	8.5 ± 0.7	0.9868
			4.44	0.016 ± 0.008	8.8 ± 0.9	0.9809
80	1.54	40	6.66	0.7 ± 0.2	6.8 ± 0.8	0.9700
			5.55	0.16 ± 0.08	7.6 ± 0.9	0.9717
			4.44	0.021 ± 0.009	8.7 ± 0.9	0.9811
80	1.4	70	6.66	0.04 ± 0.01	8.5 ± 0.4	0.9963
			5.55	0.019 ± 0.006	8.9 ± 0.4	0.9952
			4.44	0.025 ± 0.008	8.7 ± 0.5	0.9931
80	1.2	60	6.66	0.09 ± 0.02	8.0 ± 0.9	0.9967
			5.55	0.03 ± 0.01	8.7 ± 0.7	0.9871
			4.44	0.010 ± 0.005	9.2 ± 0.9	0.9817

Tabla 5-38

Efecto de la temperatura sobre la viscosidad en geles de pectina extraída a diferentes condiciones.

5.4.3. Efecto de la concentración de pectina sobre la viscosidad de los geles

En la bibliografía pueden encontrarse principalmente dos tipos de correlaciones que relacionan la viscosidad de los fluidos alimentarios con su contenido en sólidos solubles (Harper y El-Sharigi, 1965; Rao et. al. 1981, 1984; Ibarz y Pagán, 1987; Ibarz et al., 1988; Ibarz et al., 1989; Ibarz et al., 1995), según un modelo potencial y otro exponencial.

$$\eta = K_1 (C)^A \quad (\text{Modelo potencial})$$

$$\eta = K_2 \cdot \exp(A_1 C) \quad (\text{Modelo exponencial})$$

Se han ajustado los datos experimentales a los dos modelos obteniéndose un mejor ajuste para el modelo exponencial.

En la Tabla 5-39, Tabla 5-40 y Tabla 4-41, se muestran los resultados del ajuste al modelo exponencial con un nivel de probabilidad del 95 %. Se ha observado como el parámetro K_2 disminuye al aumentar la temperatura así como que el coeficiente A_1 no guarda ninguna relación con la temperatura del gel, esto último indica que no hay diferencias significativas en la velocidad de variación de la viscosidad de dichos geles con la concentración al variar la temperatura de los mismos.

Es importante recalcar el hecho de que aunque se trabaja sólo con tres concentraciones, en el caso de fluidos alimentarios es suficiente evaluar tres valores con buena correlación para determinar óptimamente la ecuación que rige el efecto de la concentración sobre la viscosidad (Labuza, 1993). En éste caso los coeficientes r de los ajustes son muy elevados, generalmente mayores de 0,9.

Pectina extraída a:	Temperatura	A_1	K^2	r
---------------------	-------------	-------	-------	-----

T ^a (°C)	pH	t (min.)	(°C)	(% ⁻¹)	(mPa·s)	
40	2.53	50	25	-0.0088 ± 0.003	300 ± 20	0.9558
			35	-0.0056 ± 0.001	100 ± 6	0.9905
			45	-0.0053 ± 0.003	70 ± 4	0.9987
			55	-0.0055 ± 0.003	50 ± 3	0.9993
			65	-0.0064 ± 0.002	40 ± 2	0.9995
			75	-0.0057 ± 0.003	30 ± 2	0.9378
40	2.05	50	25	-0.0060 ± 0.001	200 ± 10	0.9864
			35	-0.0084 ± 0.002	300 ± 10	0.9734
			45	-0.0081 ± 0.005	150 ± 4	0.9990
			55	-0.0088 ± 0.001	110 ± 6	0.9954
			65	-0.0073 ± 0.003	60 ± 3	0.9996
			75	-0.0091 ± 0.007	70 ± 3	0.9984
40	1.79	60	25	-0.0104 ± 0.003	500 ± 30	0.9676
			35	-0.0063 ± 0.002	200 ± 10	0.9694
			45	-0.0052 ± 0.003	100 ± 7	0.9938
			55	-0.0091 ± 0.006	150 ± 8	0.9865
			65	-0.0078 ± 0.001	90 ± 7	0.9912
			75	-0.0075 ± 0.003	70 ± 4	0.9993
40	1.54	50	25	-0.0006 ± 0.003	300 ± 10	0.9992
			35	-0.0008 ± 0.005	170 ± 9	0.9981
			45	-0.0004 ± 0.002	66 ± 3	0.9488
			55	-0.0005 ± 0.004	70 ± 2	0.9910
			65	-0.0007 ± 0.003	62 ± 2	0.9356
			75	-0.0013 ± 0.002	160 ± 4	0.9960
40	1.4	70	25	-0.0034 ± 0.001	140 ± 8	0.9740
			35	-0.0027 ± 0.008	60 ± 3	0.9739
			45	-0.0029 ± 0.005	40 ± 1	0.9914
			55	-0.0033 ± 0.004	30 ± 1	0.9954
			65	-0.0025 ± 0.0001	20 ± 1	0.9993
			75	-0.0017 ± 0.0007	12 ± 5	0.9995
40	1.2	70	25	-0.0019 ± 0.006	140 ± 6	0.9756
			35	-0.0039 ± 0.001	90 ± 5	0.9744
			45	-0.0041 ± 0.001	50 ± 3	0.9679
			55	-0.0046 ± 0.001	40 ± 1	0.9958
			65	-0.0052 ± 0.002	30 ± 2	0.9394
			75	-0.0048 ± 0.002	21 ± 6	0.9992

Tabla 5-39

Efecto de la concentración sobre la viscosidad en geles de pectina extraída a diferentes condiciones.

Pectina extraída a:			Temperatura	A ₁	K ²	r
T ^a (°C)	pH	t (min.)	(°C)	(% ⁻¹)	(mPa·s)	
60	2.53	60	25	-0.0039 ± 0.001	180 ± 9	0.9795

			35	-0.0036 ± 0.0004	90 ± 3	0.9956
			45	-0.0022 ± 0.0005	50 ± 2	0.9861
			55	-0.0040 ± 0.0001	40 ± 1	0.9996
			65	-0.0059 ± 0.0002	52 ± 1	0.9996
			75	-0.0080 ± 0.0006	48 ± 2	0.9982
60	2.05	40	25	-0.0119 ± 0.0003	600 ± 20	0.9998
			35	-0.0125 ± 0.0003	400 ± 20	0.9873
			45	-0.0099 ± 0.002	160 ± 5	0.9908
			55	-0.0108 ± 0.002	140 ± 4	0.9906
			65	-0.0101 ± 0.003	90 ± 4	0.9776
			75	-0.0097 ± 0.003	60 ± 3	0.9724
60	1.79	50	25	-0.0023 ± 0.001	120 ± 8	0.9907
			35	-0.0056 ± 0.002	110 ± 5	0.9571
			45	-0.0061 ± 0.001	82 ± 3	0.9820
			55	-0.0078 ± 0.001	79 ± 3	0.9894
			65	-0.0048 ± 0.0004	30 ± 1	0.9980
			75	-0.0051 ± 0.0009	26 ± 9	0.9903
60	1.54	70	25	-0.0015 ± 0.0007	100 ± 6	0.9441
			35	-0.0045 ± 0.0008	90 ± 3	0.9903
			45	-0.0054 ± 0.003	80 ± 3	0.8949
			55	-0.0067 ± 0.003	60 ± 2	0.9461
			65	-0.0047 ± 0.002	32 ± 1	0.9329
			75	-0.0049 ± 0.002	28 ± 1	0.9318
60	1.4	50	25	-0.0066 ± 0.0009	250 ± 9	0.9946
			35	-0.0071 ± 0.001	90 ± 4	0.9898
			45	-0.0069 ± 0.001	60 ± 2	0.9900
			55	-0.0057 ± 0.0005	30 ± 1	0.9980
			65	-0.0049 ± 0.0007	20 ± 1	0.9939
			75	-0.0053 ± 0.0005	21 ± 7	0.9973
60	1.2	50	25	-0.0070 ± 0.001	190 ± 7	0.9893
			35	-0.0048 ± 0.002	50 ± 2	0.9622
			45	-0.0056 ± 0.002	40 ± 2	0.9582
			55	-0.0045 ± 0.001	23 ± 4	1.0000
			65	-0.0049 ± 0.0003	18 ± 9	0.9989
			75	-0.0062 ± 0.001	19 ± 8	0.9921

Tabla 5-40

Efecto de la concentración sobre la viscosidad en geles de pectina extraída a diferentes condiciones.

Pectina extraída a:			Temperatura	A_1	K^2	r
T^a	pH	t	(°C)	(% ⁻¹)	(mPa·s)	

(°C)	(min.)					
80	2.53	40	25	-0.0092 ± 0.001	300 ± 10	0.9843
			35	-0.0067 ± 0.001	140 ± 5	0.9903
			45	-0.0032 ± 0.0006	62 ± 2	0.9912
			55	-0.0056 ± 0.0006	58 ± 2	0.9951
			65	-0.0046 ± 0.0002	42 ± 1	1.0000
80	2.05	60	75	-0.0062 ± 0.0004	39 ± 2	0.9984
			25	-0.0065 ± 0.001	140 ± 6	0.9726
			35	-0.0072 ± 0.002	70 ± 3	0.9642
			45	-0.0065 ± 0.0008	50 ± 2	0.9933
			55	-0.0052 ± 0.0002	32 ± 8	0.9995
80	1.79	50	65	-0.0045 ± 0.0004	22 ± 7	0.9980
			75	-0.0041 ± 0.0005	15 ± 5	0.9999
			25	-0.0042 ± 0.0007	130 ± 6	0.9913
			35	-0.0063 ± 0.0004	100 ± 3	0.9984
			45	-0.0044 ± 0.0002	40 ± 1	0.9983
80	1.54	40	55	-0.0056 ± 0.0004	31 ± 1	0.9990
			65	-0.0062 ± 0.0003	27 ± 8	0.9991
			75	-0.0043 ± 0.0002	17 ± 5	0.9998
			25	-0.0034 ± 0.0008	140 ± 4	0.9989
			35	-0.0043 ± 0.0003	80 ± 2	0.9999
80	1.4	70	45	-0.0059 ± 0.0007	70 ± 1	0.9902
			55	-0.0071 ± 0.001	80 ± 2	0.9848
			65	-0.0076 ± 0.002	62 ± 2	0.9953
			75	-0.0075 ± 0.001	59 ± 1	0.9994
			25	-0.0042 ± 0.0002	160 ± 3	0.9994
80	1.2	60	35	-0.0056 ± 0.0002	100 ± 2	0.9980
			45	-0.0057 ± 0.0004	70 ± 2	0.9727
			55	-0.0065 ± 0.001	40 ± 1	0.9859
			65	-0.0036 ± 0.001	30 ± 1	0.9823
			75	-0.0038 ± 0.001	20 ± 1	0.9253
80	1.2	60	25	-0.0034 ± 0.002	150 ± 9	0.9848
			35	-0.0022 ± 0.0006	60 ± 3	0.9992
			45	-0.0056 ± 0.0002	52 ± 2	0.9869
			55	-0.0018 ± 0.001	48 ± 3	0.9738
			65	-0.0076 ± 0.002	29 ± 2	0.9724
			75	-0.0082 ± 0.002	34 ± 2	0.9

Tabla 5-41

Efecto de la concentración sobre la viscosidad en geles de pectina extraída a diferentes condiciones.

5.4.4. Efecto combinado temperatura-concentración sobre la viscosidad de los geles

Desde el punto de vista ingenieril es interesante poder encontrar una sola expresión que correlacione el efecto que la temperatura y la concentración ejercen sobre la viscosidad (Ibarz, 1993). Existen dos modelos utilizados generalmente: uno potencial y otro exponencial, que surgen de combinar los modelos potencial y exponencial que explican el efecto de la concentración con la ecuación tipo Arrhenius que explica la influencia de la temperatura sobre la viscosidad

$$\eta = K_3 \cdot C^{A_2} \exp(Ea/RT) \quad (1)$$

$$\eta = K_4 \exp(Ea/RT + A_3C) \quad (2)$$

Al igual que cuando se estudió el efecto de la concentración sobre la viscosidad, se obtiene un mejor ajuste para el modelo exponencial. En la Tabla 5-42 se muestran los resultados de los ajustes de los datos experimentales al modelo exponencial con un nivel de

probabilidad del 95 % y se observa que los valores de la Ea varían entre 7 y 9 kcal/mol

Pectina extraída a:			K ₄	Ea	A ₃	r
T	pH	t	(mPa.s.).10 ⁻⁴	(kcal/mol)	(%) ⁻¹	
(°C)		(min.)				
40	2.53	50	6.0 ± 3.0	7.5 ± 0.3	-0.006 ± 0.001	0.9990
40	2.05	50	3.0 ± 2	8.4 ± 0.3	-0.008 ± 0.002	0.9961
40	1.79	70	110.0 ± 50.0	6.0 ± 0.3	-0.008 ± 0.002	0.9974
40	1.54	70	6.0 ± 4.0	7.78 ± 0.4	-0.007 ± 0.002	0.9971
40	1.4	70	0.4 ± 0.3	8.82 ± 0.3	-0.003 ± 0.001	0.9990
40	1.2	70	0.1 ± 0.2	9.7 ± 0.4	-0.004 ± 0.002	0.9981
60	2.53	60	2.1 ± 2.0	8.3 ± 0.3	-0.011 ± 0.002	0.9982
60	2.05	40	15.0 ± 7.0	7.4 ± 0.3	-0.005 ± 0.002	0.9985
60	1.79	50	2.2 ± 0.9	8.1 ± 0.3	-0.004 ± 0.002	0.9982
60	1.54	70	2.1 ± 1.0	8.23 ± 0.4	-0.006 ± 0.002	0.9781
60	1.4	50	0.9 ± 0.2	8.5 ± 0.7	-0.005 ± 0.004	0.9992
60	1.2	50	0.5 ± 0.1	8.69 ± 0.5	-0.005 ± 0.002	0.9012
80	2.53	40	3.0 ± 1.0	8.0 ± 0.2	-0.005 ± 0.001	0.9672
80	2.05	60	1.1 ± 0.2	8.19 ± 0.4	-0.005 ± 0.002	0.9930
80	1.79	50	0.6 ± 0.2	8.71 ± 0.4	-0.007 ± 0.002	0.9780
80	1.54	40	4.0 ± 1.0	7.81 ± 0.5	-0.006 ± 0.002	0.9890
80	1.4	70	0.67 ± 0.1	8.78 ± 0.2	-0.005 ± 0.001	0.9960
80	1.2	60	0.69 ± 0.3	8.82 ± 0.4	-0.005 ± 0.002	0.9670

Tabla 5-42

Efecto combinado temperatura - concentración sobre la viscosidad en geles de pectina extraída a diferentes condiciones.

5.4.5. Tixotropía de los geles

Los geles de muestras de la pectina extraída, pueden presentar tixotropía al formarse a partir de moléculas largas de pectina ($M_w \sim 10^5$) y dar lugar a partículas que no presenten, en principio, ninguna orientación concreta en el espacio, aunque al ejercer sobre ellas una fuerza de cizallamiento, se vayan orientando en la dirección de la fuerza, a medida que pasa el tiempo.

La caracterización tixotrópica se ha realizado fijando una velocidad de deformación constante (1385 s^{-1}), estudiando la variación del esfuerzo cortante con el tiempo. Los datos obtenidos se han ajustado al modelo de Figoni y Schoemacker (1983)

$$\sigma = \sigma_e + (\sigma_0 - \sigma_e) \exp(-k_5 t) \quad (1)$$

En las gráficas de las figuras 8-60 a 8-113 (págs 305, 306 y 307) (Anexo) se representan los valores de los resultados de la degradación tixotrópica de los geles azucarados de pectina extraída a diferentes condiciones y el ajuste a la ecuación (1). En la Tabla 5-43 y Tabla 5-44 aparecen los datos del ajuste del modelo anteriormente propuesto.

Se ha observado que el fluido presenta comportamiento tixotrópico, es decir disminuye el esfuerzo cortante que soporta con el tiempo al someterlo a una velocidad de deformación constante.

Por otro lado, no se ha encontrado ninguna influencia de la concentración de los geles de pectina sobre la constante cinética de degradación estructural (k_5) ni tampoco sobre la cantidad de estructura interna cizallada, la cual viene dada por la diferencia $\sigma_0 - \sigma_e$

Figura 5-159

Pectina extraída a:			Concentración (%)	σ_0 (mPa)	σ_e (mPa)	K_5 (s ⁻¹)	r
T ^a (°C)	pH	t (min.)					
40	2.53	50	6.66	69300 ± 300	61500 ± 400	0.021 ± 0.003	0.9963
			5.5	68400 ± 300	65000 ± 300	0.2 ± 0.01	0.9695
			4.44	36200 ± 200	35110 ± 50	0.19 ± 0.05	0.9644
40	2.05	50	6.66	73700 ± 300	72300 ± 100	0.09 ± 0.03	0.9275
			5.55	67100 ± 200	64490 ± 70	0.11 ± 0.01	0.9888
			4.44	47310 ± 20	46400 ± 20	0.062 ± 0.004	0.9990
40	1.79	60	6.66	94900 ± 200	75700 ± 300	0.377 ± 0.006	0.9881
			5.55	97400 ± 200	85400 ± 300	0.31 ± 0.06	0.9712
			4.44	39200 ± 500	36100 ± 200	0.1 ± 0.3	0.9377
40	1.54	50	6.66	90300 ± 500	84500 ± 60	0.45 ± 0.04	0.9949
			5.55	88000 ± 1000	74200 ± 300	0.21 ± 0.02	0.9938
			4.44	70000 ± 1000	56690 ± 80	0.74 ± 0.07	0.9959
40	1.4	70	6.66	67200 ± 100	66470 ± 90	0.05 ± 0.02	0.9633
			5.55	65400 ± 100	64290 ± 50	0.10 ± 0.02	0.9877
			4.44	69000 ± 2000	51700 ± 200	0.6 ± 0.01	0.9875
40	1.2	70	6.66	82300 ± 300	78300 ± 30	0.55 ± 0.04	0.9981
			5.55	93000 ± 4000	78500 ± 1000	0.12 ± 0.08	0.9027
			4.44	71300 ± 200	70300 ± 20	0.547 ± 0.002	0.9895
60	2.53	60	6.66	88400 ± 500	74700 ± 500	0 ± 0.1	0.9981
			5.55	86000 ± 4000	69800 ± 600	0.34 ± 0.30	0.9027
			4.44	70600 ± 100	68800 ± 20	0.316 ± 0.008	0.9875
60	2.05	40	6.66	92900 ± 400	86700 ± 400	0.036 ± 0.006	0.9951
			5.55	66800 ± 400	63400 ± 400	0.023 ± 0.004	0.9982
			4.44	37600 ± 200	34000 ± 2000	0.0027 ± 0.002	0.9976
60	1.79	50	6.66	64410 ± 90	62510 ± 20	0.019 ± 0.003	0.9982
			5.55	84000 ± 2000	57000 ± 2000	0.35 ± 0.06	0.9962
			4.44	85000 ± 3000	59000 ± 500	0.20 ± 0.09	0.9977

Tabla 5-43

Ajuste del comportamiento tixotrópico de los geles de pectina

Pectina extraída a:			Concentración (%)	σ_0 (mPa)	σ_e (mPa)	K_5 (s ⁻¹)	r
T ^a (°C)	pH	t (min.)					
40	2.53	70	6.66	69500 ± 800	64700 ± 400	0.12 ± 0.04	0.9999
			5.55	64500 ± 800	60000 ± 900	0.04 ± 0.01	0.9990
			4.44	60500 ± 200	57500 ± 100	0.06 ± 0.01	0.9975
40	2.05	50	6.66	82600 ± 400	80900 ± 200	0.20 ± 0.09	0.9981
			5.55	78000 ± 6000	63200 ± 300	0.8 ± 0.3	0.9592
			4.44	45530 ± 40	44900 ± 20	0.07 ± 0.01	0.9990
40	1.79	50	6.66	54500 ± 200	53800 ± 100	0.04 ± 0.01	0.9797
			5.55	48100 ± 2000	39100 ± 200	0.6 ± 0.2	0.9325
			4.44	36700 ± 400	31500 ± 400	0.016 ± 0.003	0.9991
40	1.54	40	6.66	97000 ± 2000	86000 ± 2000	0.68 ± 0.03	0.9763
			5.55	81000 ± 2000	74000 ± 2000	0.29 ± 0.09	0.9890
			4.44	67200 ± 700	55800 ± 700	0.035 ± 0.007	0.9090
40	1.4	60	6.66	59000 ± 1000	55000 ± 1000	0.6 ± 0.2	0.9591
			5.55	50400 ± 600	47500 ± 600	0.13 ± 0.05	0.9692
			4.44	43100 ± 600	40200 ± 600	0.11 ± 0.04	0.9493
40	1.2	50	6.66	70000 ± 2000	61000 ± 5000	0.17 ± 0.07	0.9291
			5.55	78000 ± 5000	48000 ± 2000	0.6 ± 0.1	0.9394
			4.44	57000 ± 2000	43000 ± 2000	0.11 ± 0.04	0.9290
60	2.53	40	6.66	79000 ± 2000	68000 ± 2000	0.07 ± 0.03	0.9746
			5.55	67000 ± 2000	60000 ± 2000	0.4 ± 0.1	0.9091
			4.44	53500 ± 200	50800 ± 300	0.78 ± 0.06	0.9090
60	2.05	70	6.66	72100 ± 300	67900 ± 100	0.176 ± 0.004	0.9090
			5.55	62460 ± 90	61070 ± 90	0.046 ± 0.008	0.9015
			4.44	59400 ± 100	53900 ± 100	0 ± 0.1	0.9990
60	1.79	60	6.66	86800 ± 600	76800 ± 600	0.32 ± 0.02	0.9985
			5.55	81700 ± 100	64400 ± 100	0.07 ± 0.08	0.9530
			4.44	60700 ± 200	58700 ± 200	0.10 ± 0.05	0.9020

Tabla 5-44

Ajuste del comportamiento tixotrópico de los geles de pectina.

5.4.6. Relajación

El estudio de la relajación consiste en interrumpir el gradiente de velocidad al que está sometido el gel y ver como desciende el esfuerzo cortante que soporta el mismo con el tiempo.

Se ha observado en todos los geles que al interrumpir el gradiente de velocidad, el esfuerzo soportado por los mismos cae instantáneamente hasta hacerse despreciable, lo que indica, que los geles azucarados de pectina de melocotón no presentan umbral de fluencia. (Barbosa y Peleg, 1983).

[Figura 5-160](#)

5.4.7. Seguimiento del proceso de gelificación mediante caracterización viscoelástica

Las dispersiones acuosas iniciales se han elaborado con pectina de máxima extracción a 40°C y 80°C (las temperaturas de extracción más distantes). En el seguimiento de la

formación de geles de pectina se han obtenido valores de diferentes parámetros durante 24 horas.

A partir de los valores obtenidos, se ha observado la influencia tanto de la concentración de pectina en los geles, como de su temperatura de extracción sobre la evolución de los parámetros obtenidos.

En la gráficas de la [Figura 5-161](#) y [Figura 5-162](#), se representa la evolución de la viscosidad dinámica y del módulo de almacenamiento (G') con el tiempo, para la muestra de 40°C, pH 1,20 de máxima extracción a las concentraciones de pectina de 6,66% y 4,44 %. Como cabía esperar, la muestra de mayor concentración presenta mayores valores tanto para la función módulo de almacenamiento G' , como para la función viscosidad dinámica. Cabe resaltar que durante toda la evolución, la diferencia de valores para estas funciones se muestra aproximadamente constante.

En la gráficas de la [Figura 5-163](#) y [Figura 5-164](#) se compara en la evolución de la viscosidad dinámica y G' respectivamente, durante la formación de geles de dispersiones de pectina extraída a 40°C y 80°C a la misma concentración (6,66 %). Se observa que la viscosidad dinámica inicial es mayor en la dispersión de pectina de 40°C que en la de 80°C, por el mayor peso molecular de sus cadenas. Al cabo de poco tiempo del inicio de la experiencia tanto la viscosidad dinámica como el módulo de elasticidad de la dispersión de pectina de 80°C aumenta rápidamente hasta igualar el valor del módulo de la dispersión de muestra extraída a 40°C. Durante un tiempo los valores de la viscosidad son parecidos hasta que finalmente la dispersión de pectina de 40°C produce geles de mayor viscosidad y módulo elástico.

Este comportamiento puede ser explicado por el tamaño de las cadenas de pectina, que en principio será menor para la muestra extraída a 80°C, debido a la rotura de dichas cadenas durante el proceso de extracción. La muestra extraída a 80°C, por tener cadenas más cortas, presenta una cinética de reticulación más rápida, pero el menor tamaño de las cadenas hace que a la larga la consistencia del gel, viscosidad y módulo de elasticidad, se vuelva menor que para la muestra extraída a 40°C con las longitudes de cadena de pectina mayores.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

6.1.1. Extracción

De los resultados obtenidos y su discusión, pueden obtenerse las siguientes conclusiones por apartados:

◆ A tiempos de extracción constantes, la disminución del pH y el aumento de la temperatura producen un incremento del rendimiento de la pectina extraída, ya que se incrementa la hidrólisis de los enlaces de la protopectina, que pasa a pectina soluble. El máximo porcentaje de pectina extraída a 40°, 60° y 80°C, y a todos los pH experimentales, corresponde a una muestra obtenida a 80°C, pH 1,20 y tiempo de 60 minutos, lo que corrobora la tendencia descrita anteriormente y corresponde a una muestra extraída a la temperatura más alta y el pH más bajo de todas las condiciones ensayadas.

◆ A pH y temperatura constante, el porcentaje de pectina extraída varía con el tiempo según la ecuación:

$$P = B_0 \frac{K_1}{K_2 - K_1} (e^{-K_1 t} - e^{-K_2 t})$$

lo que indica un proceso de dos etapas consecutivas: una primera etapa en la que la pectina pasa de protopectina a pectina soluble cuya constante cinética es K_1 , y una segunda etapa de degradación de la pectina soluble en el medio cuya constante cinética es K_2 . Los valores de K_1 obtenidos varían de 4,71 a $12,81 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, mientras que K_2 varía de 2,60 a $10,84 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$

Los tiempos en los que el porcentaje de extracción es máxima varían entre 40 y 70 minutos para las muestras extraídas a 40°, 60° y 80°C.

◆ Aumentos en las temperaturas y disminución en los pH de extracción, producen un incremento de K_1 . En cambio los valores de K_2 tienden a estabilizarse con el incremento de la temperatura.

◆ La energía de activación de extracción se incrementa de 12,5 a 19,2 kJ/mol cuando hay una disminución del pH de extracción, en consecuencia, la temperatura tiene mayor influencia sobre el porcentaje de pectina extraída cuanto menor es el pH.

◆ La fibra residual insoluble representa aproximadamente el 30% del peso del bagazo inicial después del proceso de extracción de pectina. Esta fibra residual está compuesta principalmente por enlaces muy resistentes al medio ácido y a las altas temperaturas, a tiempos de extracción muy elevados.

6.1.2. Caracterización de la pectina extraída

◆El porcentaje de metoxilación varía del 74 % al 97 %, por lo que la pectina extraída correspondería a una pectina HM

◆La disminución del pH de extracción produce también una disminución del % de metoxilación, debido al aumento de la hidrólisis de los ésteres en los grupos carboxilos metoxilados. Sin embargo, ni la temperatura ni el tiempo de extracción tienen influencia sobre el porcentaje de metoxilación.

◆La riqueza en ácido anhidrogalacturónico (AGA) de la pectina extraída sin purificar varía del 55 % al 75 %.

◆El porcentaje de grupos acetilo es, en prácticamente todas las muestras analizadas inferior al 1 %. Porcentajes por tanto, bajos y deseables en pectinas de buena capacidad gelificante.

◆Para las muestras extraídas, el contenido medio de almidón, en porcentaje es del 3,22 % y el contenido en proteína es del 4,96 %. Estas impurezas se extraen conjuntamente con la pectina del propio tejido vegetal.

◆La viscosidad intrínseca de la pectina extraída disminuye a medida que disminuye el pH de extracción, ya que a menor pH aumenta la degradación de las cadenas, que disminuyen su longitud y la viscosidad intrínseca está relacionada con la longitud de la cadena.

◆Los pesos moleculares de las muestras analizadas varían entre 85896 a 08616 g / mol. teniendo en cuenta que los pesos moleculares de las pectinas varían entre 20000 y 200000, y siendo en general los valores de las pectinas comerciales de alrededor de 80000, el peso molecular de la pectina extraída de melocotón tiene un valor muy aceptable para su comercialización.

◆La ecuación de Mark-Houwink para pectina de melocotón obtenida es:

$$[\eta] = 7,526 \cdot 10^{-26} M_w^{5,166}$$

◆De las muestras extraídas a 40°, 60° y 80°C, las de 60°C presentan los mayores pesos moleculares y viscosidades intrínsecas y poseen en conjunto, los mayores valores en U.C. (que indica la calidad de la pectina). En consecuencia, no son coincidentes la temperatura a la que se obtienen las muestras con mayor poder gelificante y de cadenas más largas (60°C), con la temperatura en la que los rendimientos de extracción son más elevados (80°C).

◆La muestra de máximo valor en U.C. se ha extraído a temperatura de 60°C, pH 2,05 y 40 minutos es decir, a condiciones mucho más suaves que las condiciones de extracción de la muestra que ha dado el máximo rendimiento

6.1.3. Almacenamiento del bagazo

Al comparar los resultados de la extracción para bagazo almacenado durante 10 meses y bagazo obtenido recientemente se han obtenido las siguientes conclusiones:

- ◆ Se extrae mayor cantidad de pectina de bagazo almacenado que de bagazo reciente como consecuencia de la hidrólisis de muchos enlaces de la protopectina durante el almacenamiento, y al haber menos enlaces de unión al tejido vegetal que en el bagazo reciente, se separa más fácilmente pectina en las mismas condiciones de extracción.
- ◆ El grado de metoxilación de la pectina de bagazo almacenado, va disminuyendo notablemente a medida que las condiciones de extracción son más drásticas (pH muy bajo y temperatura alta), aspecto que no se observa en las muestras extraídas de bagazo reciente.
- ◆ La viscosidad intrínseca de la pectina y por consiguiente el peso molecular de la pectina es menor en las muestras de pectina extraídas de bagazo almacenado que en las muestras de bagazo reciente, debido a la hidrólisis de la protopectina en el bagazo. Esta hidrólisis afecta preferentemente los enlaces más débiles de la cadena de pectina, lo que se traduce en pectina extraída de menor longitud.
- ◆ Las muestras extraídas de bagazo almacenado presentan valores en U.C. sensiblemente inferiores a los de las muestras de bagazo reciente como consecuencia de menores valores tanto de la viscosidad intrínseca como de su grado de metoxilación.

6.1.4. Estudio cinético de la degradación enzimática de la pectina

- ◆ De la mezcla industrial de enzimas pectolíticas suministrada, y utilizadas en el presente trabajo para la degradación de la pectina a 45°C, pH de 3,6 y concentración enzimática del medio de $4 \cdot 10^{-3}$ mg de proteína enzimática /mL, con unos parámetros cinéticos de actividad exopoligalacturonásica de:

$$V_{\max} = 16,5 \text{ micromols AGA / min} \cdot \text{mL} \quad \text{y} \quad K_m = 7,09 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

y actividad enzimática endopoligalacturonasa de:

$$V_{\max} = 1,60 \cdot 10^{-2} \text{ mPa} \cdot \text{s} / \text{min} \cdot \text{mL} \quad \text{y} \quad K_m = 2,23 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$\text{- El índice de capacidad macerante (I.C.M.)} = \frac{\text{Actividad endoPGAsica}}{\text{Actividad exoPGAsica}}$$

aumenta en los primeros 16 minutos de degradación según la ecuación:

$$\text{I.C.M.} = -0,00272 + 0,00263 t$$

- El I.C.M. al 50 % de viscosidad = $0,0207 \text{ mPa} \cdot \text{s} / \mu \text{ mol}$

- ◆ La degradación enzimática de la pectina se ajusta a un modelo cinético de primer orden, debido a que los valores que se observan en las gráficas de degradación (viscosidad en función del tiempo) antes del ajuste, esbozan formas

exponenciales negativas, forma típica de las reacciones de primer orden. Los valores de las constantes cinéticas de degradación de pseudoprimer orden obtenidas varían entre $2,00 \cdot 10^{-3}$ y $1,95 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

◆ En las muestras de pectina con alto grado de metoxilación, la degradación se desarrolla según una catálisis en dos etapas consecutivas no simultáneas y en la segunda etapa los valores de las constantes cinéticas de pseudoprimer orden obtenidas son entre 2 y 3 veces mayores que las de la primera etapa.

6.1.5. Caracterización reológica de los geles de pectina

◆ Los geles azucarados presentan comportamiento tixotrópico. La caracterización tixotrópica se ha realizado mediante la aplicación de la ecuación de Figoni y Shoemaker con buen ajuste. No se ha encontrado ninguna influencia de la concentración de los geles de pectina sobre la constante cinética de degradación estructural, ni tampoco sobre la cantidad de estructura interna cizallada.

En los geles azucarados:

◆ Después del cizallamiento de las muestras, la relajación es instantánea lo que indica ausencia de umbral de fluencia y, por lo tanto, no tienen comportamiento de fluido de Bingham.

◆ Cuando se elimina la tixotropía de los geles presentan un comportamiento newtoniano.

◆ El incremento de la temperatura del gel produce disminución de la viscosidad. Los dos parámetros se correlacionan según una ecuación tipo Arrhenius en la que la energía de activación al flujo tiene valores del orden de 8 kcal / mol

◆ El incremento de la concentración del gel produce un incremento de la viscosidad. La mejor correlación entre los dos parámetros la da el ajuste a un modelo exponencial.

◆ La mejor correlación del efecto que la temperatura y la concentración ejercen sobre la viscosidad la proporciona el ajuste a un modelo exponencial en el que los valores de la energía de activación varían entre 6,0 y 9,7 kcal / mol

En la formación de geles a partir de dispersiones acuosas de pectina (sin azúcar),

◆ Dispersiones de la misma muestra a distintas concentraciones evolucionan hacia gel paralelamente, presentando siempre las mismas diferencias que al inicio tanto del módulo elástico (G') como de la viscosidad dinámica.

◆ Dispersiones de muestras de pesos moleculares diferentes, evolucionan hacia gel de manera que las muestras de mayor peso molecular presentan al final del proceso, geles más elásticos y consistentes que las de menor peso molecular.

6.2. Recomendaciones

Para completar el presente trabajo, deberían continuarse los estudios dentro de los siguientes apartados:

- ◆ Estudio de la extracción de pectina extraída de bagazo secado a partir de procedimientos no térmicos (secado por prensado, etc.) y comparación de los rendimientos y características físicas y químicas de la pectina con los resultados obtenidos en el presente trabajo.
- ◆ Estudio del rendimiento y características físicas y químicas de la pectina extraída en reactor variando la relación, cantidad de bagazo / volumen de solución ácida, manteniendo constantes las condiciones que en este trabajo se ha obtenido la pectina de mejor calidad.
- ◆ Estudio de la purificación de la pectina obtenida a condiciones de óptima calidad con amilasas, proteasas, etc., y comparar las características físicas y químicas de la pectina purificada con las de la pectina sin purificar.



7. Referencias bibliográficas

- AHMED, E.A. y LABAVITCH, J. M. (1977). A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *J. Food Biochem.* **1**, 361-365
- AHMED, G.E. (1981). BFMIRA *Scientific and Technical Surveys* No. 127 Letherhead, England
- ALBERSHEIM, P.; Neukon, H.; Deuel, H. (1960). *Helv. Chim. Acta.* **43**, 1422
- ALBERSHEIM, P. (1976): "The Primary Cell Wall". J. Bonner y J.E. Varner (Eds). *Plan Biochemistry*. Academic Press. New York
- ANDERSON. J. W. (1982) "Dietary Fiber in Health and Disease". G.V. Vahouny y D. Kirtchevshy, (Eds); Plenum Press, N.Y.; Chap 14
- ANGYAL,S.J. (1989). Complexes of metal cations with carbohydrates in solution.*Adv. Carbohydr. chem. biochem.* **47**, 1-43
- ANYAS Weizs, L. y Deuel, H. (1950). Uber de Koagulation von Natriumpektinaten. *Helv. Chim. Acta* **33**, 559-562
- ARAVANTINOS-ZAFIRIS, G. y OREOPOULOU, V. (1992). The effect of nitric acid extraction variables of orange pectin. *J. Sci. Food Agric.* **60**, 127-129
- AXELOS, M.A.V. y THIBAUT, J.-F. (1991) en " The Chemistry and Technology of Pectin. Ed. Academic Press. New York. p. 206
- BAGLEY, E. B. y CHRISTIANSON, D.D. (1982). *J. Texture Studies* **13**, 115-126
- BARBOSA-CANOVAS, G.V.; IBARZ, A. Y PELEG, M. (1993). Reología de alimentos fluidos. Revisión. *Alimentaria* **241**, 38-89
- BARBOSA-CANOVAS, G.V. y PELEG, M. (1983) Flow parameters of selected commercial semi-liquid food products. *Journal of Texture Studies* **14**, 213-234
- BARTLEY, I. M. (1977). A further study of b-galactosidase activity in apples ripening in store. *J. Explt. Bot.* **28**, 943-948
- BARTLEY, I.M. y KNEE, M. (1982). The chemistry of textural changes in fruit during storage. *Food Chem.* **9**, 47-58.
- BAYDOUN, E. A. H.; Northcote, D.H. (1981). *Biochem. J.* **193**, 781-792
- BEHALL, K. y REISER, S. (1986). Effects of Pectin in Human Metabolism. En: *Chemistry and Function of Pectin*. Mishman, M. L. y Jen, J. J. (eds.). A.C. S. Symposium Series. The American Chemical Society, New York

- BEN ARIE, R.; KISLEV, N. y FRENKEL, C. (1979). *Plant Physiol.* **64**, 197-202
- BENDER, W.A. (1949). *Analyst Chem.* **21** (3), 408-411
- BERTIN, C.; ROUAU, X. y THIBAUT, J.-F. (1988). Structure and properties of sugar beet fibres. *J. Food Sci.* **44**, 15-29
- BILLMEYER, F. W. (1984) "Textbook of Polymer Science" 3rd Ed. Wiley, New York
- BINGHAM, E.C. (1922). Fluidity and plasticity. Mc Graw Hill Co., New York
- BOEHRINGER INGELHEIMM. Procedimiento analítico para el control de entrada de mercancía "orujo de manzanas". (folleto, s/ref.)
- BOEHRINGER MANNHEIM S.A. (1991). Bioanalítica enzimática. Análisis de alimentos. Barcelona
- BOLWELL, G.P. y NORTHCOTE, D.H. *Biochem. J.* (1983), **210**, 509-515
- BOLWELL, G.P.; NORTHCOTE, D.H. (1985), *Phytochem.* **24**, 699-702
- BOURNE, M.C. (1982) "Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement" Academic Press, New York
- BRACCONNOT, H. (1825); *Ann.Chim.Phys.*, **28**, 173.
- BRADDOCK, R. J.; CRANDALL, P.G. y KESTERTON, J.W. (1978). Pectin content of lime and lemon peel as extracted by nitric acid. *J. Food Sci.* **43**, 72-73
- BRIGGS, G.E. y HALDANE, J.B.A. (1925). *Biochem.* **19**, 338
- CARBONELL, E.; COSTELL, E. y DURAN, L. (1990). Determinación del contenido en pectinas en productos vegetales. *Rev. Agroq. Tecnol. Alim.* **30/1**, 1-9
- CARPENTER, D.K. y WESTERMAN, L. (1975) en "Polymer Molecular Weights" Parte II. P.E. Slade (Ed.), p.398. Marcel Dekker, New York
- CASSON, N. (1959). A fluid equation for pigmented oil suspensions of the printing ink type. En: *Rheology of Disperse Systems*. E. C.C. Mill, Pergamon Press, New York.
- COMBY, S.; DOUBLIER, J. L. y LEFEBVRE, J. (1986). Stress-relaxation study of high-methoxyl pectin gels. En: "Gums and Stabilisers for the Food Industry 3 (Proceedings of the International Conference, Wrexham, Wales)" G.O. Phillips; D. J. Wedlock y P. A. Williams (eds.) pp 203-212, Elsevier Science Publishers, New York,
- CHAN, JR. H.T. y TAM, S.Y.T. (1982). Partial Separation and Characterization of Papaya Endo and Exo-Polygalacturonase. *J. Food Sci.* **47**, 1478-1483

CHANG, K.C. y MIYAMOTO, A. (1992). Gelling characteristics of pectin from sunflower head residues. *J. Food Sci.* **57**, 1435-1438

CHARM, S.E. (1963). *J. Food Sci.* **28**, 107-113

CHEN, T.S. y JOSLYN, M.S. (1967). The effect of sugars on viscosity of pectin solutions II. Comparison of dextrose, maltose and dextrans. *J. Colloid Interface Sci.* **25**, 346-352

CHESSON, A. y CODMER, R.C. (1978). The maceration of vegetable tissue by a strain of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* **44**, 347-364

CHEVALLEY, J. (1975). *J. Texture studies* **6**, 177-196

COPENHAGEN PECTIN. Pectin. General Description (folleto)

COPENHAGEN PECTIN. (1991) Molecular weight distribution of pectin. HPLC method. *Apl. Br.* **April**, 1428

COSTELL, E.; CLEMENTE, G. y DURAN, L.. (1982). *Rev. Agroq.Tecnol. Alim.* **22** (1), 539-550

COSTELL, E.; IZQUIERDO, L. y DURAN, L. (1985). *Rev. Agroq. Tecnol. Alim.* **25** (2), 241-249

CRANDALL, P. G.; CHEN, C. S. y CARTER, R.D. (1982). *Food Technology* **36** (5), 245, 252

CULLEN, R. W. y OACE, S. M. (1978). *J. Nutr.* **108**, 640-645

CUMMINGS, J. H.; SUTHGATE, D. A. T.; BRANCH, W. J.; WIGGINS. H. J.; HOUSTON, H.; JENKINS, D. J. A.; JIVRAG, T. y HILL, M. J. (1979) *Brit. J. Nutr.* **41**, 477-485

DAHMNE, A. (1985). Characterization of linear and nonlinear deformation behavior of a weak standart gel made from high-methoxyl citrus pectin. *J. Texture studies.* **16**, 227-239

DALESSANDRO, G.; NORTHCOTE D.H. (1977). *Biochem.* **162**, 267-288

DALESSANDRO, G; NORTHCOTE, D.H. (1981). *Planta* **151**, 53-67

DANIELS, F.; MATHEWS, J.H.; WILLIAMS J.W.; BENDER, P. y ALBERTY, R.A. (1956). "Experimental Physical Chemistry", 5ª Ed. Mc Graw-Hill, New York.

DANIELS, F.; WILLIAMS, J.W.; BENDER, P.; ALBERTY, R.A.; CORNWELL, C.D. y HARRIMAN,, J.E. (1970) "Experimental Physical Chemistry", 7ª Ed. Mc Graw-Hill, New York

DE GIORGI, A.; TOMASICCHIO, M. y ANDREOTTI, R. (1985). Determinazione rapida delle sostanze pectiche nelle confetture e nelle marmellate. *Ind. Conserve* **60/1**, 36-38

DE VRIES, J. A.; VORAGEN, A.G. J.; ROMBOUTS, F. M. y PILNIK, W. (1984). Changes in the structure of apple pectic substances during ripening and storage. *Carbohydr. Polymers* **4**, 3-13

DE VRIES, J.A.; HANSEN, M.; SODERBERG, J.; GLANHN, P.E. y PEDERSEN, J.K. (1986). Distribution of methoxyl groups in pectins. *Carbohydr. Polymers* **6**, 165-176

DEUEL, H.; HUBER, G.; y ANYAS-WEISZ, L. (1950). Uber "Salzbrucken" zwischen Makromolekullen von Polyelectrolyten, besonders bei Calciumpektaten. *Helv. Chim. Acta* **33**, 563-567

DEY, P. M. y BRINSON, K. (1984). Cell wall and fruit ripening. *Adv. carbohydr. Chem. Biochem.* **42**, 339-382

DIAZ PEÑA, M. y ROIG MONTANER, A. (1980) en "Química Física". Ed. Alhambra. Madrid pp 1070-1071

DI GIACOMO, A.; POSTORINO, E.; CASTORI, R. y RIOLO, D. (1986). Le pectine del bergamotto. *Essence Deriv. Agrummi* **56**, 212-219

DIXON, W.T. y NORTHCOTE, D.H. (1985). In "Developmentbs in Cell Biology: Secretory processes"; Deane, R.T.; Stahl, P. (eds.). Butterworths. London, pp 79-98

DOESBURG (1965). IBVT n° 25, Institute Research Storage Processing Horticultural Produce, Wageningen, Netherlands

DUMPHY, W.G.; BRANDS, R. y ROTHMAN, J.E. (1985). *Cell* **40**, 463-472

ELFAK, A. M.; PASS, G. y PHILLIPS, G.D. (1979). *J. Sci. Agric.* **30**, 724-730

ENDRESS, H.-U. (1991). Capítulo 12. En: The Chemistry and Technology of Pectin. Walter, R. (ed.). Academic Press. New York

FATAH, A. F. A. (1987). Citado en *Indian Food Packer* **41**, 120

FENGEL, D. (1970). *Tappi* **53**, 497

FERRY, J.D. (1980). " Viscoelastic Properties of Polymers". Wiley. New York

FIGONI, P.I. y SCHOEMAKER, C.F. (1983). *J. Texture Studies* **14** (4), 431-442

FISHER, R.L. y BENNETT, A.B., (1991). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 675-703

FISHMAN, M. L. (1986). En "Chemistry and Function of Pectins". ACS Symposium Series, p. 22

- FISHMAN, M. L.; GILLESPIE, D. T.; SONDEY S.M. y BARFORD, R. (1989). Characterization of pectins by size exclusion chromatography in conjunction with viscosity detection. *J. Agr. Food Chem.* **37**, 584-591
- FISZMAN, S. M.; COSTELL, E y DURAN, L. (1984). *Rev. Agroq. Tecnol. Alim.* **24** (2), 191-198.
- FLORY, P.J. (1953). "Principles of Polymer Chemistry". Cornell University Press, Ithaca, New York.
- FRY, S.C. (1983). *Planta* **157**, 111-123.
- GINTER, E.; KUBEC, F. J.; VOZAR, J. y BOBEK, P. (1979). *Internal. J. Vit. Nutr. Res.*, **49**, 406
- GIOVANONI, J. J.; DELLA PENNA, D.; BENNET, A. B. FISHER, R. L. (1989). Expression of chimeric polygalacturonase gene in transgenic *rin* (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant cell* **1**, 53-59
- GROSS, K.C. y WALLNER, S. J. (1979). Degradation of cell-wall polysaccharides during tomato ripening. *Plant Physiol.* **63**, 117-120.
- GROSS, K.C. y SAMS, C.E. (1984). Changes in neutral sugar composition during fruit ripening: A species survey. *Phytochem.* **23**, 2457-2461
- GROSS, M. O.; RAO, V. N. M. y SMITH, C. B. J. (1982). Direct stress-strain dynamic characteristics of low-methoxyl pectin gels. *J. Texture Studies.* **13**, 97-114
- GUERRERO, L. (1993). La textura de los alimentos. Medidas sensoriales e instrumentales. *Alimentación, equipos y tecnología*. Diciembre de 1993
- GUILLON, F. y THIBAUT, J.-F. (1989). Enzymic hydrolysis of the "hairy" fragments of sugar beet pectins. *Carbohydr. Res.* **190**, 97-108
- GUILLON, F.; BARRY, J.-L. y THIBAUT, J.-F. (1992) Effect of autoclaving sugar-beet fibre on its physico-chemical properties and its *in vitro* degradation by human faecal bacteria. *J. Food Sci.* **60**, 69-79
- HAHN, S. J.; REE, T y EYRING, H. (1959). Flow mechanism of thixotropic substances. *Ind.Eng.Chem.* **51**, 856-857
- HARPER, J C. y EL SARHIGI, A.F. (1965). Viscometric behaviour of tomato concentrates. *J.Food Sci.* **30**, 470
- HARRIS, P. J. (1983). Cell Walls. En: J.L. HALL y A.L. MOORE (Eds.) Isolation of membranes and organelles from plant cells. Biological Technical Series. Academic Press, New York

- HENGLEIN, F.A. (1943). *Macromol. Chem.* **1**,121
- HERBSREITH. The apple. The pectine. (folleto)
- HERSHELL, W. H. y BULKLEY, R. (1926). The Ostwald viscometer as a consistometer. *Proc Am.Soc.Testing Materials.* **26**, 621
- HOBSON, G.E. (1963). Pectinesterase in normal and abnormal tomato fruit. *Biochem.. J.* **86**, 358-365
- HOFF, J. E. y Castro, M.D. (1969). Chemical composition of potato cell wall. *Agr.Food Chem.* **17**, 1328-1331
- HUANG, J. M. G. (1973). Improved method for the extraction of pectin. *Fla. Agric.Exp. Stat. J. Series n°* **5101**
- HUANG, C. T. L.; GOPPALAKRISHNA, G.S. y NICHOLS, B. L. (1978). *Am. J. Clin. Nutri.* **31**, 516-526
- HUGGINS, M. L. (1942). The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. 4. Dependence on concentration. *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 2716-2718
- IBARZ, A. y CASERO, T. (1987). Reología de zumos de manzana de diferente variedad. *Alimentaria* **185**, 57-59
- IBARZ, A. y PAGAN, J. (1987). Rheology of Raspberry Juices. *J. Food Eng.* **6**, 269-289
- IBARZ. A.; CASERO, T.; MIGUELSANZ, R. y PAGAN, J. (1988). Comportamiento reológico del zumo y concentrado de grosella negra. *Alimentaria*, **12/88**, 61-66
- IBARZ, A.; CIUTAT, O. y GRAELL, J. (1988). Comportamiento reológico de productos derivados del tomate. *Alimentaria* **196**, 53-62
- IBARZ, A.; PAGAN, J.; GUTIERREZ, J. y VICENTE, M. (1989). Rheological properties of clarified pear juice concentrates. *J.Food Eng.* **10**, 57-63
- IBARZ, A. y SINTES, J. (1989). Análisis tixotrópico de yema de huevo. Influencia del extracto seco y contenido en sal. *Alimentación, Equipos y Tecnología* **1/89**, 271-274
- IBARZ, A. (1993). Reología de productos alimentarios. *Theknos.* **136**, **46-62**
- IBARZ, A.; GINER, J.; PAGAN, J.; GIMENO, V y GARZA, S. (1995). Rheological Behaviour of Dilute Kiwi Concentrates. *J. Texture Studies* **26**, 137-145
- I.F.T. (1959). Committee on Pectin Standardisation. Final report of the IFT Committee. *Food Technol.* **13**, 496-500
- IHL, M.; ASTETE, G. y BIFANI, V. (1992). Precipitación de pectinas de bagazo de

manzanas de la Región de la Araucanía mediante etanol y tricloruro de aluminio. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* **32** (2), 185-197

IRWIN, P.L.; SEVILLA, M.D. Y SHIEH, J. J. (1984). ESR. Evidence for sequential divalent cation binding in higher plant cell walls. *Biochim. Biophys. Acta* **805**, 186-190

JARVIS, M.C.; FORSYTH, W. y DUNCAN, H.C. (1988), A survey of the pectin content of nonlignified of monocot cell walls. *Plant Physiol.* **88**, 309-314

JENCHS, W.P. (1969). "Catalysis in Chemistry and Enzymology". Mc Graw-Hill. New York.

JENKINS, D. J. A.; LEEDS, A. R.; NEWTON, C. y CUMMINGS, J. H (1975). *Lancet* **1**, 1116-1117

JIMENEZ, L.; FERRER, J. L. y GARCIA, I. (1987). *Alimentación, Equip. y Tecnol.* **1**, 295-299

JOHN, M.A. y DEY, P.M. (1986). Postharvest changes in fruit cell wall. En "Advances in Food Research (C.O. Chichester, ed.), Vol 30, pp 139-193. Academic Press, Orlando, Florida.

JORDAN, R.C. y BRANDT, D.A. (1978). An investigation of pectin and pectic acid in dilute aqueous solution. *Biopolymers* **17**, 2885-2895

JOSEPH, G.H. y HAVIGHORST, C.R. (1952). *Food eng.* **87**, 134

JOSLYN, M.A. (1962), *Adv. Fd. Res.*, **11**, 1

JOSLYN, M. A. y DE LUCA, G. (1957). *J. Colloid. Sci.* **12**, 108

JUDD, P. A. y TRUSWELL, A. S. (1982) *Brit. J. Nutr.* **48**, 451-458

KANTER, Y.; EITAN, N.; BROOK, G. y GRAZILAI, D.; (1980), *Israeli J. Med. Sci.* **16**, 1-6

KARR, L.A. (1976): Cell wall biogenesis. En: J. Bonner y J.E. Parker (eds.). *Plant Biochemistry*. 2ª Edición. Academic Press, New York

KAWABATA, A. (1977). Studies on chemical and Physical properties of pectin substances from fruits. Viscoelasticity of fruitl pectin gels. *Memoirs Tokyo Univ. Agr.* **19**, 166-178

KEEGSTRA, K; TALMADGE, K. W.; BAUER, W. D. y ALERSHEIM, P. (1973) *Plant Physiol.* **51**, 188

KERTESZ, Z.I. (1951) "The Pectic Substances". Interscience. New York

KOHN, R. y LUKNAR, O. (1977). Intermolecular calcium ion binding on polyuronates. *Coll Czech. Comun* **42**, 731-744

KORNFELD, R.; KORNFELD, (1985) *S. Ann. Rev. Biochem.* **54**, 631-664

LABUZA, T.P. (1993) en "Química de los alimentos" de Fennema, O.R. (autor). Ed. Acribia (Zaragoza). Capítulo 16, pp 1029-1030

LANZARINI, G; MANZO, A; SPAGNA, G. y PIFFERI, P.G. (1984). Polygalacturonase activity determination by spectrophotometric analysis of uronic acids with m-hidroxydiphenyl. *Annali di Chimica* **74**, 705-713

LAU, J. M.; MC NEIL, M.; DARVILL, A.G. y ALBERSHEIM, P. (1985). Structure of de backbone of rhamnogalacturonan I pectic polysaccharide in the primary cell walls plants *Carbohydr. Res.* **137**, 111-125

LEEDS, A.R.; RALPHS, D.N.; BOULOS, P.; EBIED, F.; METZ, G.; DILAWARI, J.B.; ELLIOTT, A. y JENKINS, D.J.A. (1977) *Proc. Nutr. Soc.* **37**, 23 A

LEI, K. Y.; DAVIS, J. W.; FANG, M. M. y YOUNG, M. M. (1980) *Nutr. Rept. Inter.* **22**, 459-466

LELOIR, L. F.; ROUGINE, M.A. y CARDINI, C.E. (1960): *Nature*, **187**, 918

LIM, M. J. Y.; HUMBERT, E.S. y SOSULSKI, F.W. (1976). *Can. Inst. Food Sci. Technol., J.* **9**, 70

LIST, D.; BUDDRUS, S. y BODTKE (1985). Determination of pectin with metaphenilphenol *Z. Lebensm. Unters Forsh*, **180**, 48-52

LODISH, H.F. y KONG, N.J. (1984). *J. Cell Biol.* **98**, 1720-1729.

Mc COMB, E.A. y Mc Ready, R.M. (1957), *Anal.Chem.*, 29, 819

MAY, C. D. (1990). Industrial pectins: sources, production and applications. *Carbohydr. Polymers* **12**, 79-99

MICHEL, F.; THIBAUT, J.-F.; MERCIER, C.; HEITZ, F. y POILLADE, F. (1985) Extraction and characterization of pectins from sugar beet pulp. *J. Food Sci.* **50**, 1499-1502

MIYAMOTO, A. Y CHANG, K. C. (1992). Extraction and physicochemical characterization of pectin from sunflower head residues. *J. Food Sci.* **57**, 1439-1443

MIZRAHI, S. y BERK, Z. (1972). Flow behavior of concentrated orange juice: mathematical treatment. *J. Texture Studies* **3**, 69-79

MOHR, H. y SCHOPLER, P. (1978). *Lehrbuch der pflanzephysiologie*. Springer Verlag, New York

MORRIS, E. R.; CUTLER, A. N.; ROSS-MURPH; S. B. REES y PRICE, J. (1981).

Concentration and shear-rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydr. Pol.* **1**, 5-21

MORRIS, M.R. y NORTHCOTE, D.H. (1977). *Biochem.* **166**, 603-618

MORT, A. J.; FENG, Q. y MANESS, N. O. (1993). Determination of the pattern of methyl esterification in pectin. Distribution of contiguous nonsterified residues. *Carbohydr. Res.* **247**, 21-35

NAVARRO, G.; NAVARRO, S. (1985). "Sustancias pécticas: química y aplicaciones". Secretariado de publicaciones e intercambio científico. Universidad de Murcia (ed.)

NEUFELD, E.F. y HASSID, W.Z. (1963) *Adv. Carbohydr Chem.* **18**, 309

NEUKOM, H. (1949). Dissertation Eidg. Tch. Hochschule., Zürich

NORTHCOTE, D.H. (1958), *Biol. Rev.*, **33**, 53

NORTHCOTE, D.H. (1972), *Ann.Rev.Plant Physiol.*, **23**, 113-132

NORTHCOTE, D. H. (1986). Control of pectin synthesis and deposition during plant cell wall growth. En "Chemistry and Function of Pectins" de M. Fishman y J. J. Jen (eds.) ACS Symposium Series. The American Society (publ.). New York

OSBORNE, D.R. y VOOGT, P. (1985). Análisis de los nutrientes de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, pp. 118-121

OWENS, H.S.; LOTZKAR, H.; SCHULTZ, T. H. y MARLAY, W.D. (1946). *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 1628-1632

OWENS, H.S.; MIERS, J.C. Y MACLAY, W.D. (1948). Distribution of molecular weights of pectin proprionates. *J. Colloid. Sci.* **3**, 277-291

PALS. D.T. F. y HERMANS, J. J. (1952). Sodium salts of pectin and of carboxy methyl cellulose in aqueous sodium chloride. *Recueil des Travaux Chimiques Des Pays-Bas* **71**, 433-467.

PALLMAN, H.; WEBER,F. y DEUEL, H. (1944). *Schweiz. Landwirtsch.Monatsch* **22**, 306

PANCHEV, I.; KIRCHEV, N. y KRATHANOV, C. (1988) Improving pectin technology. II. Extraction using ultrasonic treatment. *Int. J. Food Sci. Technol.* **23**, 337-341

PANCHEV, I. N.; KIRCHEV, N.A. y KRATCHANOV, C. (1989). Kinetic model of pectin extraction. *Carbohydr.Pol.* **11**, 193-204

PERRING, M. A. (1974). The mineral composition of apples. Method for calcium. *J.Sci. Food Agric.* **25**, 237-245

PETRELLIS, N. C. y FLUMFERT, R. W. (1973). Rheological behavior of shear degradable oils: kinetic and equilibrium properties. *Can.Chem.Eng.* **51**, 291

PLASHINA, I.G.; FOMINA, O.A.; BRAUDO, E.E. y TOLSTOGUZOV, V.B. (1979)

Creep study of high-esterified pectin gels. I. The creep of glycerol-containing gels. *Colloid Polym. Sci.* **257**, 1180-1187

PLASHINA, I.G.; GOTLIEB, A.M.; BRAUDO, E.E. y TOLSTOGUZOV, V.B. (1982).
Creep study on high-esterified gels. II. The creep of glycerol-containing gels. *Colloid Polym. Sci.* **261**, 672-676

PILNIK, W; Rombouts, F.M. (1979) "Pectic Enzymes" en Polysaccharides in Foods. Butlerwarths

PILNIK, W.; Rombouts, F.M. (1985). Polysaccharides and fruit processing. *Carbohydr. Res.* **142**, 93-105

PILNIK, W. y Voragen (1970), "Pectic Substances and Other Uronides" A.C. Hulme (Ed.) The Biochemistry of Foods and Their Products. Vol I. Academic Press. New York

POOVIAH, B.W.; GLENN, G. M. y REDDY, A.S. N. (1988). Calcium and fruit softening: Physiology and biochemistry. *Hort. Rev.* **10**, 107-152

PRESSLEY, R.; HINTON, D. M. y AVANTS, J. K. (1971). Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectin in peaches during ripening. *J. Food Sci.* **36**, 1070-1073.

PRESSLEY, R. (1983). β -galactosidases in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* **71**, 132-135

PRYCE-JONES, J. (1953). The rheology of honey in foodstuffs: Their plasticity, fluidity and consistency. Ed. G. S. Scott Blair, North Holland, Amsterdam.

RAO, M. A. (1977). Rheology of liquids foods. A review. *J. Texture Studies* **8**, 135-168

RAO, M. A. y BOURNE, M. C. (1977). Analysis of the plastometer and correlation of Bostwick Consistometer Data. *J. Food Sci.* **42**, 261-264

RAO, M. A.; BOURNE, M. C. y COOLEY, H.J. (1981). *J. Texture Studies* **12**, 521-538

RAO, M.A.; COOLEY, H.J. y VITALI, A.A. (1984). Flow properties of controlled juices at low temperatures. *Food Technol.*, **38** (3), 113-119

RAO, M. A.; COOLEY, H. J., NOGUEIRA, J. N. y McLELLAN, M. R. (1986). *J. Food Sci.* **51** (1), 175-179

RAO, M. A. y RIZVI, S.S.H. (1986). Engineering properties of foods. Ed. Marcel Dekker, inc., New York

- RAO, M.A.; COOLEY, H.J.; WALTER, R.H. y DOWNING, D. L. (1989). Evaluation of texture of pectin jellies with the Volland-Stevens texture analyser. *J. Texture Stud.* **20**, 87-95
- REES, D.A.; MORRIS, E.R.; THOM, D.; y MADDEN, J. K. (1982). Shapes and interactions of carbohydrate chains. En *The Polysaccharides*. G.O. Aspinall (Ed.). pp. 195-290. Academic Press, New York
- RENARD, C. M.G. C. y THIBAUT, J.F. (1993). Structure and Properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents. *Carbohydr. Res.* **244**, 99-114
- RENARD, C.M.G.C.; VORAGEN, A.G. J.; THIBAUT, J.-F. y PILNIK, W. (1991). Comparison between enzymatically and chemically extracted pectins from apple cell walls. *Animal Feed Sci. and Technology* **32**, 69-75
- RHA, C. (1978). *Food Technol.* **32**, 77-82
- RISTOW, K. A.; GREGORY III, J. F. y DAMRON, G. L. (1982). *J. Nutr.* **112**, 750-758
- ROBINSON, D.G. (1977): En H. W. Woodhouse (Ed.) *Advances in botanical research*. Academic Press, New York.
- ROBINSON, D.G. y KRISTEN, N. (1982). *Int. Rev. Cytol.* **7**, 89-127
- ROLAND, J.C. y VIAN, B. (1970). *CR. Acad. Sci. Paris*, **271**, 572
- ROMBOUTS, F. M. y PILNIK, W. (1980). "Pectic enzymes". *Economic Microbiology*, vol. 5. *Microbial Enzymes and Bioconversions*. Rose, A.H.(ed.), pag. 227-282. Academic Press, London
- ROMBOUTS, F. M. y THIBAUT, J.-F. (1986). Feruloylated pectic substances from sugar-beet pulp. *Carbohydr. Res* **154**, 177-187
- ROMBOUTS, F. M. y THIBAUT, J.-F. (1986). Sugar beet pectins: Chemical structure and gelation through oxidative coupling. En " *Chemistry and function of pectins*" de M. L. Fishman y J. J. Jen (eds.), pp. 49-60. American Chemical Society, Washington, D.C.
- ROMERO, C. y REHMAN, T. (1989) " *Agricultural decision analysis with multiple criteria*". Ed. Elsevier. Amsterdam
- ROTH, J.; BERGER, E.G. (1982) *J. Cell Biol.* **93**, 223-229
- ROS, J.M.; SAURA, D. COLL, L. y LAENCINA, J. (1992). Métodos analíticos avanzados para la determinación de sustancias pécticas y actividades enzimáticas pectolíticas. *Alimentación, equipos y tecnología.* **2**, 149-155
- ROUSE, A.A. y ATKINS, C.D. (1955) "Pectinesterase and pectin in commercial citrus juices as determined by methods used at the citrus experiment station. *Fla. Agric. Exp. Stn. Bull.*

n° 570

SAENZ, C y COSTELL, E. (1986). Comportamiento reológico de productos de limón. Influencia de la temperatura y la concentración. *Rev. Agroqu.Tecnol.Alim.* **26** (4), 581-588

SAJJAANANTAKATUL, T.; VAN BUREN, J. P. y DOWNING, D. L. (1989). Effect of methyl ester content on heat degradation of chelator-soluble carrot pectin. *J. Food Sci.* **54**, 1272-1277

SATIR, B.; SCHOOLEY y SATIR, P.(1973). *J. Cell Biochem.* **56**, 153-156

SCHULTZ, T.H.(1965). Determination of the degree of esterification of pectin, determination of the ester methoxyl content of pectin by saponification and titration. En "Methods in carbohydrate Chemistry" Vol. **5**, 189. Academic Press, New York

SERRA, J. L.; ALKORTA, I. y LLAMA, M. J. (1992). Aplicación industrial de los enzimas pécticos. Producción, purificación, inmovilización y algunas propiedades de la pectina liasa de *Penicilium italicum*. *Alimentación, equipos y tecnología* **10/92**, 127-132

SLY, W.S. y FISHER, H.D. (1982). *J.Cell Biochem.* **18**, 67-85

SHUCH, W.; BIRD, C.R.; RAY, J.; SMITH, C. J. S.; WATSON, C.F.; MORRIS, P.C.; GRAY, J.E.; ARNOLD, C. SEYMOUR, G. B.; TUCKER, G. A. y GRIERSON, D. (1989). Control and manipulation of gene expression during tomato fruit ripening. *Plant mol. biol.* **13**, 303-311

SILLEY, P. (1986). The production and properties of a crude pectin lyase from *Lachnospira multiparus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2**, 29-31

SMIDSROD, O. y HAUG, A. (1971). Estimation of the relative stiffness of the molecular chain in polyelectrolytes from measurements of viscosity at different ionic strengths. *Biopolymers* **10**, 1213-1227

SPILLER G. A. y FREEMAN, H. J.(1981). *Am. J. Clin. Nutr.* **34**, 1145-1152

STODDART, R.W. y NORTHCOTE, D.H. (1967). *Biochem. J.* **105**, 45-59

STONE, J.E. y SCALLAM, A.M.(1968). *cellul. Chem. Technol.*, **2**, 43

TALMADGE, KW; KEEGSTRA, K.; BAUER, W.D. y ALBERSHEIM, P. (1973). *Plant physiol.* **51**, 158

TAM, S.Y.T. (1983) A New Calculation Method for Distinguishing Endo- from Exo-Polygalacturonases. *J.Food Sci.* **48**, 532

TAVAKOLI, M. y WILEY, R.C. (1968). Relation of trimethylsilyl derivatives of fruit -tissue polysaccharides to apple texture. *Proc. Am. Soc. Hort.Sci.* **92**, 780-787

THIBAULT, J.-F.; RENARD, C. M. G. C. y AXELOS, A. V. (1993). Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydr. Res.* **238**, 271-286

THIERAVS, R. (1976) en "Toma de decisiones por medio de investigación operativa" Ed. Limusa. Mexico

TIU, T y BOGER, D. (1974). Complete rheological characterization of time-dependent food products. *J. Texture Studies* **5**, 329

TUNG, M. A.; RICHARDS, J. F.; MORRISON, B.C. y WATSON, E. L. (1970). *J. Food Sci.* **35**, 872-874

TUCKER, G.A.; ROBERTSON, N.G. y GIERSON, D. (1980). Changes in polygalacturonase isoenzymes during ripening of normal and mutant tomato fruit. *Eur. J. Biochem.* **112**, 119-124

U.S.FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food and Nutrition Encyclopedia, 1983

VAN BUREN, J.P. (1991). Function of pectin in plant tissue structure and firmness. En: The Chemistry and Technology of Pectin. Reginald Walter (ed.). Chapter 1. Academic Press, New York.

VARNER, J.E. y TAYLOR, r. (1989). *Plant Physiol.* **91**, 31-33

VIRK, S.S. y CLELAND, R.E. (1988) *Planta* **176**, 60-67

VITALI, A. A. y RAO, M. A. (1982). Flow behavior of guava puree as a function of temperature and concentration. *J Texture Stud.* **13**, 275-289

WADA, S. y RAY, P.M. (1978). Matrix polysaccharides of oat coleoptile cell walls. *Phytochem.* **17**, 923-931

WALLNER, S.J. y WALKER, J.E. (1975). Glycosidases in cell-wall degrading extracts of ripening tomato fruits. *Plant Physiol.* **55**, 94-98

WALLNER, S.J. y BLOOM, H.L. (1977). Characteristics of tomato cell wall degradation *in vitro*. Implications for the study of fruit-softening enzymes. *Plant Physiol.* **60**, 207-210

WARDROB, A. B. (1965): En W.A. Cole (Ed.). Cellular ultrastructure of woody plants. Syracuse University Press

WATSON, E.L. (1966). Stress-strain and creep relationship of pectin gels. *J. Food Sci.* **31**, 373-380

WELTMAN, R. N. (1943). Breakdown of thixotropic structure as function of time *J. Appl. Physics* **14**, 343-350

WILKINSON, W. L. (1960). Non-Newtonian Liquids. Ed. Pergamon Press, New York

BIBLIOTECA VIRTUAL



8. Anexo

Figura 8-1	Figura 8-2	Figura 8-3
Figura 8-4	Figura 8-5	Figura 8-6
Figura 8-7	Figura 8-8	Figura 8-9
Figura 8-10	Figura 8-11	Figura 8-12
Figura 8-13	Figura 8-14	Figura 8-15
Figura 8-16	Figura 8-17	Figura 8-18
Figura 8-19	Figura 8-20	Figura 8-21
Figura 8-22	Figura 8-23	Figura 8-24
Figura 8-25	Figura 8-26	Figura 8-27
Figura 8-28	Figura 8-29	Figura 8-30
Figura 8-31	Figura 8-32	Figura 8-33
Figura 8-34	Figura 8-35	Figura 8-36
Figura 8-37	Figura 8-38	Figura 8-39
Figura 8-40	Figura 8-41	Figura 8-42
Figura 8-43	Figura 8-44	Figura 8-45
Figura 8-46	Figura 8-47	Figura 8-48
Figura 8-49	Figura 8-50	Figura 8-51
Figura 8-52	Figura 8-53	Figura 8-54
Figura 8-55	Figura 8-56	Figura 8-57
Figura 8-58	Figura 8-59	Figura 8-60
Figura 8-61	Figura 8-62	Figura 8-63
Figura 8-64	Figura 8-65	Figura 8-66
Figura 8-67	Figura 8-68	Figura 8-69
Figura 8-70	Figura 8-71	Figura 8-72
Figura 8-73	Figura 8-74	Figura 8-75
Figura 8-76	Figura 8-77	Figura 8-78
Figura 8-79	Figura 8-80	Figura 8-81
Figura 8-82	Figura 8-83	Figura 8-84
Figura 8-85	Figura 8-86	Figura 8-87
Figura 8-88	Figura 8-89	Figura 8-90
Figura 8-91	Figura 8-92	Figura 8-93
Figura 8-94	Figura 8-95	Figura 8-96
Figura 8-97	Figura 8-98	Figura 8-99
Figura 8-100	Figura 8-101	Figura 8-102
Figura 8-103	Figura 8-104	Figura 8-105
Figura 8-106	Figura 8-107	Figura 8-108
Figura 8-109	Figura 8-110	Figura 8-111
Figura 8-112	Figura 8-113	

CROMATOGRAMAS

Figura 8-114	Figura 8-115	Figura 8-116
Figura 8-117	Figura 8-118	Figura 8-119
Figura 8-120	Figura 8-121	Figura 8-122
Figura 8-123	Figura 8-124	Figura 8-125
Figura 8-126	Figura 8-127	Figura 8-128

[Figura 8-129](#)

[Figura 8-130](#)

[Figura 8-131](#)

