



Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de pectinasas producidas por *Bacillus* spp.

Temperature and pH effect on the activity and stability of pectinase produced by *Bacillus* spp.

Julio C. Arellano Barragán, Steban A. Ilich Zerpa, Marco L. Salazar Castillo, Icela M. Rodríguez Haro, Willman N. Alarcón Gutiérrez y Fantasía O. Gasco Álvarez
Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

RESUMEN

Las pectinasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, como por ejemplo en productos de desecho, y su utilidad industrial es de gran importancia. En la presente investigación se trata de establecer algunos parámetros cinéticos a nivel de laboratorio para la producción de pectinasas por *Bacillus* spp. Se aisló y seleccionó cultivos puros de *Bacillus* spp. productores de la enzima a partir de muestras de tierra de cultivo de papa y naranja en medio agar nutritivo con sales y pectina como sustrato, se incubó y se realizó la lectura agregando alícuotas de una solución de lugol y aquellos cultivos que presentaban mayor halo de hidrólisis de pectina fueron seleccionados. Estos cultivos se sembraron en medio líquido nutritivo más sales y pectina y se incubaron por 24 – 48 horas; luego se centrifugaron y se obtuvo el sobrenadante denominado extracto crudo de pectinasa (ECP), el cual sirvió para realizar los ensayos de actividad y estabilidad del ECP a pHs y temperaturas variables. Se encontró que el pH y temperatura de máxima actividad del ECP está alrededor de 6,5 y 35°C, respectivamente. El ECP es estable a pH 6,5 y 8,5 a 35°C por 120 minutos, lo mismo es cierto a temperatura de 50°C hasta por 129 minutos y pierde su estabilidad a 70°C a los 120 minutos.

Palabras clave: *Bacillus*, pectinasas, pH, temperatura, actividad y estabilidad.

ABSTRACT

Pectinases are widely distributed in nature, such as waste products, and its industrial usefulness is of great importance. In the present investigation is to establish some kinetic parameters at the laboratory for the production of pectinase by *Bacillus* spp. Was isolated and selected pure cultures of *Bacillus* spp. producing enzyme from samples of farmland potato and orange in nutritive agar with salts and pectin as substrate, incubated and reading was performed by adding aliquots of a solution lugol and crops that had higher pectin hydrolysis halo were selected. These cultures were plated in more pectin salts and liquid nutritional medium and incubated for 24-48 hours; then centrifuged and the supernatant crude extract called pectinase (ECP), which was used for the tests of ECP activity and stability at pH and temperature variables was obtained. It was found that the pH and temperature of maximum activity of the ECP is about 6.5 and 35 °C, respectively. The ECP is stable at pH 6.5 and 8.5 at 35 °C for 120 minutes, the same is true for a temperature of 50 °C for 129 minutes to lose stability at 70 °C at 120 minutes.

Keywords: *Bacillus*, pectinase, pH, temperature, activity and stability.

INTRODUCCIÓN

Las pectinas son un grupo heterogéneo de polisacáridos complejos constituidos principalmente por cadenas largas de unidades de ácido D-galacturónico unidos entre sí por enlaces α -1-4, cadenas que forman el ácido poligalacturónico o ácido péctico^{1,2,3}. Estas unidades pueden estar parcialmente metiladas, esterificadas en el C-6 con alcohol metílico variable según el origen de la pectina. La pectina también contiene con frecuencia residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa. Generalmente la ramnosa forma parte de la cadena principal, mientras que la arabinosa y la galactosa se encuentran en las cadenas laterales unidas a la cadena principal formando ramificaciones⁴.

Según el tratamiento que se haga a las materias primas (manzanas, frutas cítricas, piña, guayaba dulce, tomate de árbol, maracuyá y remolacha) se obtienen diferentes calidades de pectinas, de acuerdo con las necesidades de los productos terminados. Estas pectinas son, en la actualidad, ingredientes muy importantes en la industria de los alimentos, para hacer gelatinas, helados, salsas, queso^{1,5}.

La presencia de estas sustancias pécticas en el zumo de frutas, origina importantes problemas en su procesamiento industrial. Ello se debe a que, por su escasa solubilidad, retienen el jugo espesándolo y disminuyendo el rendimiento de la extracción y para su empleo en la extracción, clarificación y reducción de viscosidad en jugos de frutas, extracción de aceites de vegetales y cítricos, fermentación de café y té, entre otras numerosas aplicaciones industriales^{6,7,8}.

Las pectinasas actúan de manera sinérgica y secuencial y, además de encontrarse de manera natural en frutas y vegetales, también son producidas por microorganismos, tales como: bacterias, levaduras y hongos filamentosos³. Tanto la actividad enzimática como los mecanismos que controlan su síntesis y su secreción están bajo la influencia de diversos factores ambientales, tales como el pH del medio, la temperatura de incubación y la naturaleza y cantidad de la fuente de carbono⁴.

La inhibición y estabilidad enzimática son consideradas la mayor consternación en el desarrollo de procesos biotecnológicos; la estabilidad enzimática está influenciada por parámetros físicos (pH y temperatura) y parámetros químicos (inhibidores y activadores); asimismo, la hidrólisis enzimática de las sustancias pécticas también depende de varios factores fisicoquímicos, como por ejemplo, del tiempo de contacto, concentración de enzima, temperatura de incubación y pH. El efecto de la temperatura fue estudiado entre 0°C y 90°C así como el pH entre 4 y 11^{7,9,10}.

Se han desarrollado estudios sobre la producción de enzimas pécticas, utilizando la fermentación en medio sólido, sobre diferentes substratos: bagazo de caña de azúcar; salvado de trigo; sin embargo, pocos estudios han sido efectuados sobre la influencia de la composición del medio, en cultivo sobre soporte sólido. La composición del medio de cultivo es un factor importante en la inducción de pectinasas ya que influye sobre la diversidad y la cantidad de dichas enzimas pécticas^{11,12}.

Al mismo tiempo, existe una preocupación creciente por los efectos de la contaminación ambiental, por ello la presión pública ha influido tanto en la industria como en los gobiernos para su disminución. Las enzimas microbianas presentan aplicación industrial debido a su elevada eficiencia catalítica, su uso no daña el ambiente y su alta rentabilidad económica¹⁰.

Teniendo en cuenta que el Perú es un país que ha crecido considerablemente en la agroindustria, se considera conveniente desarrollar un proceso orientado al aprovechamiento integral de recursos provenientes este sector, además evitar la contaminación ambiental, por los residuos provenientes de estas actividades. Uno de estos residuos por aprovechar es el albedo de naranja que por su volumen resulta atractivo para la producción industrial de enzimas pécticas, por ello, se propuso una investigación orientada a determinar a algunos parámetros cinéticos a nivel de laboratorio, para la producción de pectinasas por *Bacillus* spp., específicamente, el efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima, así como, seleccionar cultivos de *Bacillus* spp. productores de pectinasas y determinar el efecto del pH y temperatura óptimos que presentan la mayor actividad y estabilidad de la enzima en estudio. Se considera que a medida que se incrementa la temperatura y el pH, aumenta la actividad de la pectinasa hasta un punto donde ésta empieza a disminuir, del mismo modo, a medida que se incrementa la temperatura la estabilidad de la pectinasa disminuye en función del tiempo y del pH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Pectinasas producidas por *Bacillus* spp. aislados a partir de muestras de suelo agrícola de papa y naranja.

Obtención, inactivación y extracción de pectinas cítricas

Se empleó el albedo (mesocarpio) del fruto de naranja, residuo sólido producido por la venta artesanal del jugo de naranja; en estado fresco o congelado el mismo día de su colección con el fin de evitar el crecimiento de bacterias u otras formas vivientes que descompongan el producto. Se cortó en trozos pequeños lo que constituye la materia prima para aislar pectinas¹³. La inactivación se hizo colocando la materia prima en estufa a 98°C por 10 minutos¹⁴. Posteriormente, 100g de materia prima inactivada fueron suspendidos en 600mL de agua destilada y a ésta se le agregó HCl 1N hasta obtener un pH entre 1.5 y 3. Luego se calentó a 70°C por 70 minutos¹⁵. A continuación, se filtró la suspensión anterior y el filtrado obtenido fue enfriado a temperatura ambiente (25°C) y luego se precipitó con etanol al 60% (v/v), con respecto al volumen de dicho filtrado^{14,15}. Finalmente, el proceso de secado del extracto crudo de pectina se realizó a 70°C en estufa y luego fue pulverizado^{14,15}.

Aislamiento de *Bacillus* spp. productores de pectinasas.

Se colectaron muestras de suelo con un peso aproximado de 100 g procedentes de cultivos de papa del distrito de Otuzco y de cultivos de naranja del distrito Virú, las que fueron colocadas en bolsas plásticas de poliestireno (de primer uso)¹⁶. Se trasladaron al laboratorio de Tecnología enzimática y Productos naturales, Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal – Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

El aislamiento *Bacillus* spp productor de pectinasas se llevó a cabo en medio sólido Agar nutritivo. Para ello se realizó una suspensión de 1 g de tierra en 100 mL de agua destilada estéril (ADE), se agitó y se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁶ previo tratamiento térmico en baño maría a 85°C durante 10 minutos. Luego, se sembró en superficie (0,1mL de la dilución tratada). Se incubó a 28°C hasta 72 horas^{16,17,18}.

Las colonias con características morfológicas de *Bacillus* fueron repicadas en tubos con agar agar nutritivo¹⁹ y se incubaron durante 24 horas a 28°C para efectuar la prueba de la catalasa a fin de ubicarlas en el género *Bacillus*. Los aislamientos que resultasen positivos a la catalasa se conservaron en frascos de agar nutritivo inclinado a 4°C^{19,20}.

Medio para la producción de pectinasas

El medio conteniendo pectina como única fuente de carbono está caracterizado por (g/1000mL de agua destilada): pectina cítrica, 2; extracto de levadura, 1; agar, 15; KH₂PO₄, 0,2; CaCl₂, 0,05; (NH₄)₂SO₄, 1; MgSO₄·7H₂O, 0,8; MnSO₄, 0,05; pH = 6,8⁵. Se autoclavó a 15 lb/ 20 minutos. Se realizó control de esterilidad durante 24 horas².

Producción de Pectinasas

Se siguió el método de Fernandes-Salomao y col²¹, modificado por los autores; brevemente, en los medios anteriormente mencionados se sembraron por puntura los cultivos de *Bacillus* spp. aislados. Se incubó a 30°C por 18-24h. Luego se añadieron alícuotas de una solución de lugol y se observó la presencia o ausencia de halos de hidrólisis³. Se seleccionaron los cultivos que presentaron mayor halo de hidrólisis de la pectina es decir los cultivos que presentaron mayor relación diámetro de halo/ diámetro de colonia⁹.

Obtención de los extractos crudos enzimáticos

Se sembraron los cultivos seleccionados previamente (inóculo al 5%) en caldo YEPD modificado (g/100 mL buffer cítrico-citrato, pH 3,5): pectina, 2,0; Peptona de soja, 1,0; Peptona de carne, 1,0; Extracto de levadura, 1,0. Los cultivos se incubaron en agitación constante durante 24-48 horas a 30°C. Luego, se centrifugó a 5.000 rpm durante 15 min y el sobrenadante obtenido fue denominado extracto crudo de pectinasa (ECP)⁹.

Determinación de actividad enzimática en los ECP

Se determinó la actividad enzimática midiendo la cantidad de sustrato residual, para ello se utilizó 4,5 mL de solución de sustrato bufferado de pectina al 0,3% y 0,1 mL de ECP; se incubó a 31°C por 1 hora; luego se detuvo la reacción con 0,5 mL de solución de HCl 0,05N y 0,5 mL de solución Iodada. Se realizó la lectura después de 15 minutos de reposo a 530 nm de absorbancia en Spectronic 20. Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para variar 0,01 de absorbancia por minuto bajo las condiciones del ensayo, 31°C, pH 6,8^{9,11}.

Determinación del efecto del pH sobre la actividad del ECP

Se determinó el pH de máxima actividad del extracto crudo de la pectinasa realizando medidas de dicha actividad a diferentes pH (3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5 y 9,5) utilizando diferentes sistemas buffers de incubación^{9,22}.

Determinación de la estabilidad del ECP a diferentes pH en el tiempo

Para ello se colocaron alícuotas del ECP en tubos de ensayo y se sometieron a la acción de diferentes pH (4,5; 6,5 y 8,5) por 60 y 120 minutos. Luego se determinó la actividad residual del ECP^{9,22}.

Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad del ECP.

Se determinó la temperatura de máxima actividad realizando mediciones de la actividad del extracto crudo de la pectinasa a diferentes temperaturas: 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55 °C.⁹

Estabilidad del ECP a diferentes temperaturas en el tiempo

Para ello se colocaron alícuotas del ECP en tubos de ensayo y se incubaron a 50, 70 y 90 °C durante 60 y 120 minutos ⁹ y luego se determinó la actividad residual del ECP. Para garantizar los resultados y su reproducibilidad del presente trabajo, se realizaron cinco ensayos y cada uno por triplicado.

RESULTADOS

Se obtuvieron 15 cultivos primarios de *Bacillus* spp. aislados a partir de muestras de suelo de cultivos de papa (seis) y de naranja (nueve), los que presentaron halos de hidrólisis de pectina que van desde 2 mm hasta 17 mm de diámetro, siendo Bsn12, Bsn17, Bsn8 y Bsn7 los que presentaron mayor hidrólisis (17, 15, 13 y 12 mm) los cuales fueron seleccionados para realizar la selección secundaria en medio líquido (Tabla 1, Fig. 1).

Tabla 1. Selección primaria de cultivos de *Bacillus* spp. aislados a partir de muestras de suelo de cultivos de papa (Bsp) y de naranja (Bsn) con capacidad de hidrolizar la pectina (acción de pectinasa) expresado en milímetros (mm).

<i>Bacillus</i> aislado		Acción de pectinasa
N°	Código	Halo (mm)
1	Bsp1	4
2	Bsp2	7
3	Bsp3	2
4	Bsp4	4
5	Bsp5	8
6	Bsp6	2
7	Bsn7	12
8	Bsn8	13
9	Bsn9	10
10	Bsn10	5
11	Bsn11	2
12	Bsn12	17
13	Bsn13	2
14	Bsn14	14
15	Bsn15	15

La selección secundaria, en medio líquido, de los cultivos de *Bacillus* spp aislados y seleccionados por presentar mayor capacidad de hidrolizar la pectina en medio sólido, permitió determinar que el cultivo

Bsn15 presenta mayor hidrólisis de pectina (0,21 Absorbancia-Spectronic 20 a 530 nm); del sobrenadante “extracto crudo de pectinasa” de éste cultivo se realizaron los ensayos propuestos en este trabajo.

Se observó el efecto del pH sobre la actividad del extracto crudo de pectinasa de *Bacillus* spp aislado a partir de muestras de suelo de cultivos de naranja, notándose que describe un perfil clásico campaniforme con una máxima actividad entre los pH 6,5 y 8,5 decreciendo a medida que los pH son más distantes de estos valores (Fig. 2).

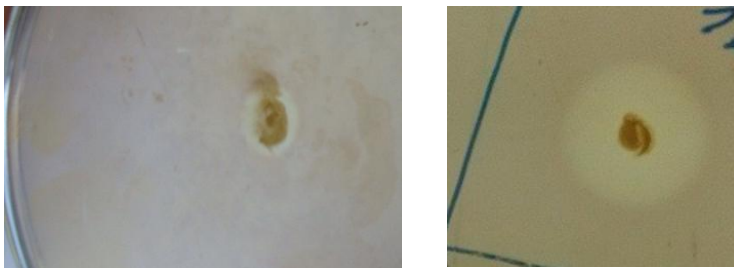


Fig. 1. Halos de hidrólisis de la pectina por cultivos de *Bacillus* spp. aislados a partir de muestras de suelo de tierra de cultivos de papa (izquierda) y naranja (derecha)

Tabla 2. Selección secundaria de cultivos de *Bacillus* spp. aislados a partir de muestras de suelo de cultivos de naranja con capacidad de hidrolizar la pectina (acción de pectinasa) expresado en unidades (cambio 0,01 de Absorbancia).

<i>Bacillus</i> aislado		Unidad de pectinasa / mL ECP
Nº	Código	Unidades (cambio 0,01 de Absorbancia)
1	Bsn7	20,0
2	Bsn8	20,8
3	Bsn12	26,6
4	Bsn15	36,6

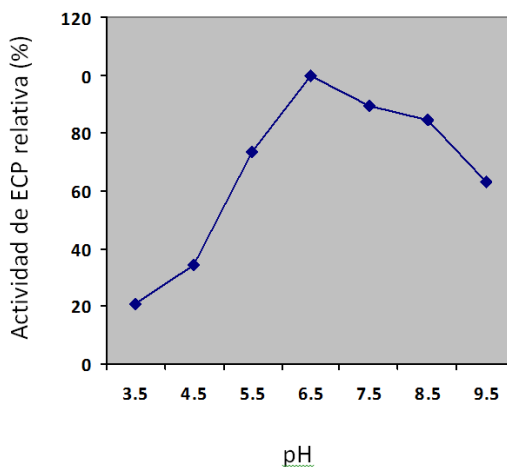


Fig. 2: Efecto del pH sobre la actividad del extracto crudo de pectinasa (ECP)

La estabilidad al pH del extracto crudo de la pectinasa de *Bacillus* spp aislado a partir de muestras de suelo de cultivos de papa y de naranja, donde se observa que el ECP es estable a pH 6,5 por 120 minutos y

a pH 8,5 es estable hasta los 60 minutos, ya que conserva una actividad residual relativa de 85,5% y luego disminuye a 76,0% cuando es expuesta hasta los 120 minutos (Fig. 3).

El efecto de la temperatura sobre la actividad del extracto crudo de pectinasa de *Bacillus* spp aislado a partir de muestras de suelo de cultivos de naranja, describe un perfil clásico campaniforme con una máxima actividad alrededor de los 35°C, decreciendo a medida que las temperaturas son más distantes de estos valores (Fig. 4).

Y la temperatura sobre la estabilidad térmica del extracto crudo de la pectinasa de *Bacillus* spp aislado a partir de muestras de suelo de cultivos de naranja, produce pérdida de la estabilidad térmica a partir de los 70°C a los 120 minutos de exposición y no es termoestable a los 90°C (Fig. 5).

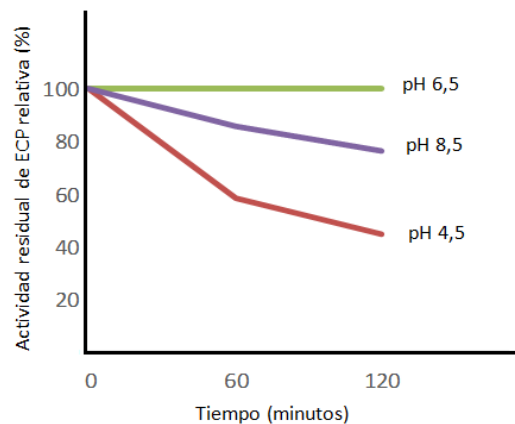


Fig. 3: Estabilidad del extracto crudo de pectinasa (ECP) sometida a diferentes pHs durante 60 y 120 minutos de exposición.

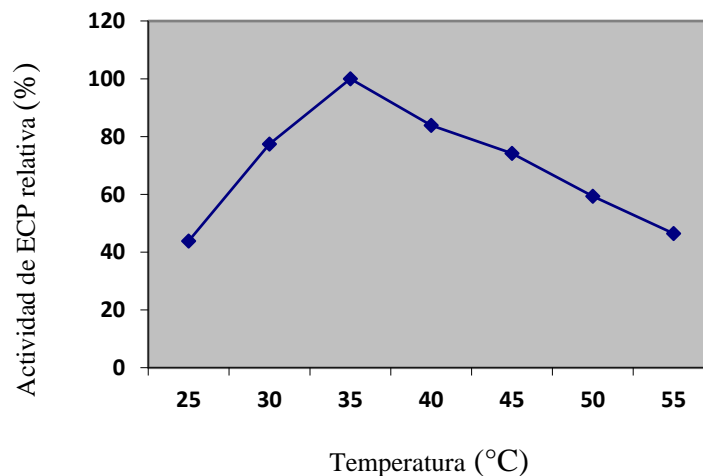


Fig. 4: Efecto de la temperatura sobre la actividad del extracto crudo de pectinasa (ECP)

DISCUSION

La importancia de las pectinasas se ha incrementado por su relevancia comercial en la industria. El crecimiento de *Bacillus* spp en agar y caldo nutritivo suplementado con sales y pectina al 2% evidenció a partir de las 48 horas un mayor desarrollo a pH 6,8 y a la temperatura de 31°C (Tablas 1 y 2). Los valores de pH, temperatura y tiempo de incubación utilizados en el presente trabajo de investigación, no fueron los adecuados, ya que se ha encontrado en la bibliografía revisada el pH oscila entre 5,0 y 9,0 pudiendo ser el óptimo 7,2²³.

Al mismo tiempo, cabe indicar que para la producción de pectinasa en medio líquido, la bibliografía reporta que para una mejor producción se necesita aireación y agitación, lo que permitiría un mayor crecimiento de especies de *Bacillus* (0.5 vvm para la aireación y de 300 rpm para la agitación)²⁴.

La producción de pectinasas por *Bacillus* en medio líquido (Tabla 2), se ha encontrado datos que la enzima alcanza su mayor rendimiento al final de la etapa logarítmica del crecimiento microbiano, lo cual estaría a partir de las 72 horas (3 días) de incubación, dependiendo de la especie, hasta los 5 ó 7 días de incubación²⁴, motivo por el cual se ha obtenido muy poca cantidad de pectinasa ya que éstas son enzimas inducidas lentamente por la presencia de sustancias pécticas.

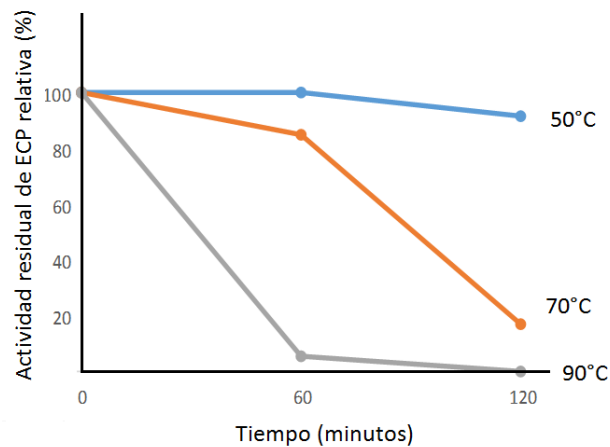


Fig. 5. Termoestabilidad del extracto crudo de pectinasa (ECP) sometida a diferentes temperaturas durante 60 y 120 minutos de exposición.

La disminución de la actividad de pectinasa, respecto al pH, podría atribuirse al pH de crecimiento del *Bacillus* y a su lenta capacidad de adaptación para la producción de la enzima en los diferentes valores de pH trabajados.

Respecto a la temperatura, se ha encontrado que la máxima temperatura de actividad de la pectinasa está alrededor de 35°C, lo que concuerda con algunos autores donde manifiestan que ésta oscila entre los 25 y 40°C²³. Se ha encontrado que la temperatura para la producción de pectinasa, depende de la especie de *Bacillus*. Por ejemplo, la temperatura óptima entre 50 y 60°C permite obtener la enzima de las especies *Bacillus* spp, con *B. stearothermophilus* muestra alta actividad a 60°C, mientras que *B. cereus* y *B. subtilis* presenta excelente actividad a 50°C.

Estudios respecto a la termoestabilidad de la pectinasa de ciertos *Bacillus*²⁵ coinciden con los obtenidos en el presente trabajo. Esta enzima es estable a 45°C durante 120 minutos (2 horas), se reduce un poco a 50°C y a los 60°C casi se ha reducido al 50% su actividad residual y a los 70 y 80 °C ha perdido toda su actividad residual. Es importante mencionar que la actividad de algunas pectinasas depende de la presencia del ión Ca²⁺: La enzima de cepas de *Bacillus* spp degradan el ácido de poligalacturónico presenta una actividad máxima alrededor del pH 10.5 y a una temperatura entre 50 y 55°C²⁴.

Por los resultados obtenidos en la presente investigación, cabe indicar la importancia de monitorear las condiciones de trabajo para producir más y mejor pectinasa a partir de los *Bacillus* spp aislados, ya que en medio sólido muestran buena producción de la enzima y cuando se pasa al medio líquido se presentan problemas que aún no se han podido solucionar del todo, por lo que sería de suma importancia mejorar y/o optimizar las condiciones de incubación (medio sumergido), el tipo y calidad de sustrato (carbono y nitrógeno), la presencia y cantidad de ciertos activadores, el pH, la temperatura, el tiempo de incubación para la máxima producción de la enzima y algunos inhibidores que podrían estar disminuyendo dicha producción de la enzima.

CONCLUSIONES

- Los *Bacillus* spp aislados de suelos de tierra de cultivo de papa y de naranja presentan diferentes grados de hidrólisis pectinolítica.
- El perfil de actividad de la pectinasa de *Bacillus* spp respecto al pH es campaniforme y la máxima actividad está alrededor de 6,5.
- La pectinasa de *Bacillus* spp es pH-estable a los pH 6,5 y 8,5 durante los 120 minutos de exposición.
- El perfil de actividad de la pectinasa de *Bacillus* spp, respecto a la temperatura es campaniforme y la máxima actividad está a 35°C.
- La pectinasa de *Bacillus* spp es termoestable hasta temperaturas menores e iguales a 50°C y a temperaturas superiores de 70°C pierde su termoestabilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Devia J. Proceso para producir pectinas cítricas. Rev. Univ. EAFIT. 2003; (129): 21-30.
2. Feoli M, Gómez Z, Muños A. Aislamiento y caracterización de microorganismos con actividad pectinolítica a partir de *Mangifera indica*. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. 1997; (26): 33-37.
3. Yegres S, Sánchez J, Belmar M, Riveros W, Belmar D. Producción de enzimas pécticas-ensayos preliminares. Rev. Univ. Or. 2001; 13(1): 55-59.
4. Beltrán A, Larrondo C, Ramirez M, Ruiza A, Salgado L. Producción de pectinasas por *Aspergillus niger* a partir de cáscaras de naranja y de toronja como fuente de carbono. 2011. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
5. Bayoumi R, Yassin H, Swelim M, Abdell-All E. Production of bacterial pectinase(s) from agro-industrial wastes under solid state fermentation conditions. J App Sci Research. 2008; 4(12): 1708-1721.
6. Silva D, Da Silva E, Da Silva R, Gomes E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by products. Brazilian Journal of Microbiology. 2002; (33): 318-324.
7. Nadaroglu H, Taskin E, Adigüzel A, Güllüce M, Demir N. Production of a novel pectin lyase from *Bacillus pumilus* (P9), purification and characterization and fruit juice application. Romanian Biotechnological Letters. 2010; 15(2): 5167-5175.
8. Kashyap D, Vohra P, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technology. 2001; 77: 215-227.
9. Arroyo G. Producción de enzimas pectinasas por actinomicetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja. [Tesis Msc.]. 2002. UNMSM. Perú.
10. Soriano M. Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. [Tesis Doctoral]. 2004. Universidad de Barcelona.
11. Cabeza M, Merín M, Martín M, Sabaté D, Audisio M, Morata V. Effect of a Pectinase-Surfactin Preparation on Extraction of Pigments and Total Polyphenol from Malbec Grape Skins. American Journal of Enology and Viticulture. 2009; 60(4): 477- 483.
12. Trejo M. Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. Micol. Neotrop. Apl. 1991; (4): 49-62.
13. Maldonado Y, Salazar S, Millones C, Torres E, Vásquez E. Extracción de pectina mediante el método de hidrólisis ácida en frutos de maushan (*Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo) provenientes del distrito de San Miguel de Soloco, región Amazonas. Rev. Aporte Santiaguino. 2010; 3(2): 177-184.
14. Chamorro M, Gutiérrez Chapoñán. Extracción de pectina a partir de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*), toronja (*Citrus paradisi*) y pomelo (*Citrus grandis*). 2010 Nov 18; Lima, Perú. Centro de investigación de tecnología de alimentos. Universidad Peruana Unión.
15. Guidi A, Arandía M. Obetnción de pectina a partir de la cáscara de maracuyá mediante hidrólisis ácida. J Boliviano de Ciencias. 2010; 67-71.
16. Calvo P, Zúñiga D. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*solanum tuberosum*). Ecología aplicada. 2010; 9(1).
17. Piñero J, Vidal L, Coello N. Aislamiento y caracterización de una cepa de *Bacillus spp* degradadora de plumas de aves de corral. Rev. Científica, FCV-LUZ. 2000; 10(2): 124-129.

18. Ramos E, Zúñiga D. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecol Apl.* 2005; 7(1,2): 123-130.
19. Reinoso Y, Casadesús L, García A, Gutiérrez J, Álvarez V. Aislamiento, selección y identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad.* 2006; 10(3): 187-191.
20. Cuervo J. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. *Microbiología agrícola y veterinaria.* [Tesis para optar título]. 2010. Universidad Javeriana. Bogotá D.C.
21. Fernandes-Salomão, T. M.; Rodrigues Amorim, A. C.; Chaves-Alves, V. M., Cavalcante Coelho, J. L; Olzany Silva, D; Fernandes de Araújo, E. (1996). Isolation of pectinase Hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. *Rev. Microbiol. São Paulo*, 27, 15-18.
22. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantization of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976; 72: 248-254.
23. Kashyap, D.R.; Chandra, S.; Kaul, A.; Tewari, R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 2000. 16: 277 - 282.
24. Torimiro N.; Okonji, R. E. A comparative study of pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology.* 2013. Vol. 12(46), 6498 – 6503.
25. Nadaroglu, H.; Taskin, E.; Adiguzel, A.; Gulluce, M.; Demir N. Production of a Novel Pectin Lyase from *Bacillus pumilus* (P9), Purification and Characterisation and Fruit Juice Application. *Romanian Biotechnological Letters*, 2010. 15, (2): 5167-5176.