

RECYT

Año 21 / N° 32 / 2019 / 22–27

Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de una *Poligalacturonasa Microbiana*

Optimization of culture conditions for the production of a *Microbial Polygalacturonase*

Silvana A. Maidana^{1,*}; Alicia A. Mieres²; Emilce R. Zubreski¹; María A. Martos¹

1- Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552, (3300) Posadas, Misiones, Argentina.

2- Facultad de Ciencias y Tecnología. Universidad Nacional de Itapúa. María Auxiliadora, Encarnación, Paraguay.

* E-mail: silvana.a.maidana@gmail.com

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de una *Poligalacturonasa* (PGasa) por *Wickerhamomyces anomalus*. Las fermentaciones se realizaron en frascos agitados, en un medio sintético, variando las condiciones de cultivo (temperatura, pH y velocidad de agitación). Se aplicó inicialmente un diseño factorial 2³ y posteriormente la metodología de superficie de respuesta. Se evaluó la capacidad macerante del extracto enzimático sobre un tejido vegetal. El pH y la temperatura influyeron significativamente en la producción de la enzima PGasa, mientras que la influencia de la velocidad de agitación fue no significativa. Los mayores títulos se obtuvieron a 30° C y pH de 5,1; con un valor máximo de actividad PGasa de 18,84 UE/mL. El extracto enzimático fue capaz de macerar tejidos de pimiento morrón. Se obtuvieron extractos enzimáticos con elevada actividad PGasa, en las condiciones seleccionadas, de interés en tecnología de los alimentos.

Palabras clave: *Poligalacturonasa*; *Wickerhamomyces anomalus*; Diseño factorial; Diseño de Doehlert; Optimización.

Abstract

The objective of the present research was to evaluate the effect of the cultivation conditions on the production of a polygalacturonase (PGase) by *Wickerhamomyces anomalus*. Fermentations were carried out in agitated flasks, in a synthetic medium, varying culture conditions (temperature, pH and agitation). A 2³ factorial design was initially applied and then response surface methodology. The macerating capacity of the enzymatic extract on a vegetal tissue was evaluated. PH and temperature significantly influenced the production of PGase enzyme, while the influence of the stirring rate was not significant. The highest titles were obtained at 30°C and pH of 5.1; with a maximum PGase activity of 18.84 EU / mL. The enzymatic extract was able to macerate bell pepper tissues. Enzymatic extracts with high PGase activity were obtained, under selected conditions, of interest in food technology.

Keywords: *Polygalacturonase*; *Wickerhamomyces anomalus*; Factorial design; Doehlert desing, Optimization.

Introducción

Las enzimas son ampliamente utilizadas en la industria de alimentos ya que catalizan diversas reacciones que resultan en mayores rendimientos y mejor calidad del producto final. En la industria de procesamiento de frutas y vegetales las más importantes son las enzimas pécticas o pectinasas [1]. Estas enzimas son las responsables de la degradación de las sustancias pécticas presentes en la laminilla media y en la pared celular primaria de las plantas superiores. Según su modo de acción se clasifican en: poligalacturonasas (PGasas), pectinesterasas (PE), pectinliasas (PL) y pectatoliasas (PAL). Las PGasas pueden ser del tipo

endo-PGasas (EC 3.2.1.15) and exo-PGasas (EC 3.2.1.67), las cuales hidrolizan los enlaces glicosídicos α -(1,4) internos y externos de las moléculas de ácido galacturónico, respectivamente [2; 3].

Un tipo de PGasas, denominadas protopectinasas (PPasas), hidrolizan de forma restringida la protopectina presente en los tejidos vegetales, liberando pectina soluble, con la consiguiente separación de las células sin producir mayores daños, proceso denominado maceración [4]. En el proceso de maceración, los tejidos organizados de los vegetales, se transforman en una suspensión de células intactas, lo que les permite mantener sus propiedades nutritivas. El proceso de maceración es empleado en la

industria alimentaria para la obtención de néctares de fruta y vegetales, que se emplean en la alimentación de bebés y adultos mayores [5].

Las pectinasas utilizadas en la industria alimentaria son producidas comercialmente por *Aspergillus niger* [6]. La producción de enzimas a partir de las levaduras tienen ventajas comparadas con los hongos filamentosos, son unicelulares, su crecimiento es relativamente simple en medios de cultivo económicos, y además a muchas de ellas se las considera como microorganismos GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros). Otra ventaja de las levaduras es que sólo producen PGasas a diferencia de los hongos, que originan una compleja mezcla de enzimas pécticas [7].

La producción de enzimas microbianas, y los mecanismos que controlan su síntesis y secreción, están bajo la influencia de diversos factores, tales como el pH del medio, temperatura de incubación, velocidad de agitación, naturaleza y cantidad de la fuente de carbono y energía, etc. Estos factores deben ser estudiados a fin de optimizar el crecimiento adecuado del microorganismo y la producción de la enzima de interés [8]. Los diseños experimentales basados en estadísticas son aproximaciones muy eficientes que pueden llevarse a cabo con un gran número de variables simultáneamente y además, se puede estimar la interacción entre variables mejorando los rendimientos del proceso [9].

En Argentina y en Paraguay, la producción y utilización de enzimas en la industria de alimentos es una tarea pendiente, considerando que actualmente, la mayor parte de las enzimas utilizadas en la industria de alimentos son importadas. El presente trabajo podrá contribuir a incentivar la producción de enzimas microbianas para aplicarlas al sector alimentario [10].

Wickerhamomyces anomalus, es una levadura con actividad pectinolítica, autóctona de la provincia de Misiones, Argentina, aislada a partir de cáscaras de cítricos e identificada por métodos moleculares en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro Regional Mendoza, San Juan [11]. Esta levadura, al crecer en un medio compuesto por glucosa como fuente de carbono y energía y pectina de citrus como inductor, produce extractos enzimáticos con actividad, endo-PGasa, fundamentalmente. Esta enzima también posee actividad PPasa, capaz de macerar tejidos vegetales [12].

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de factores físicos y químicos sobre el proceso de producción de PGasa por *W. anomalus*, a escala frascos agitados, mediante diseños factoriales y luego optimizar la producción enzimática mediante la metodología de superficie de respuesta.

Materiales y Métodos

Microorganismo

W. anomalus, levadura aislada en la Facultad de Ciencias. Exactas Químicas y Naturales, UNaM (Wa cepa 110, cepario del Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Biotecnología “Dr. Fernando O. Benassi”, FCEQyN, UNaM) [11].

Medio de cultivos

a) *Medio de propagación* (g/L): extracto de levadura (Sigma), 5; Triptona (Difco), 5; Glucosa (Britania), 10; Agar (Britania), 15; pH 5,0.

b) *Medio de producción*: glucosa (Britania), 10 g/L; pectina (Parafarm), 5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L; KH_2PO_4 , 1 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L; CaCl_2 , 0,1 g/L; solución de vitaminas (1000 ×), 1 mL/L; solución de aminoácidos (100 ×), 10 mL/L; solución de microelementos (1000 ×), 1 mL/L; pH 5,0 [13].

Solución (1000 ×) *de vitaminas* (Sigma) ($\mu\text{g/L}$): biotina, 2; pantotenato de Ca, 400; ácido fólico, 2; inositol, 2000; niacina, 400; ácido *p*-aminobenzoico, 200; piridoxina, 400; riboflavina, 200; tiamina, 400.

Solución (100 ×) *de aminoácidos* (Sigma) (mg/L): histidina, 10; metionina, 20 y triptófano, 20.

Solución de microelementos 1000 × ($\mu\text{g/L}$): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 40; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 200; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 400; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400.

Todos los componentes del medio fueron autoclavados (121° C, 15 min), excepto las vitaminas que se esterilizaron por separado mediante filtración a través de un papel de filtro celulósico (0,22 μm , Sartorius).

Producción de la enzima poligalacturonasa (PG)

Inóculo: A partir de cultivos jóvenes (24 h) de la levadura desarrollada en estrías de medio de mantenimiento, se efectuaron diluciones en agua destilada hasta una DO_{620} de 0,96.

Fermentación: Se inocularon frascos Erlenmeyers de 500 mL que contenían 95 mL del medio de producción (MP) con 5 mL del inóculo. Los mismos se incubaron a 30° C en una incubadora con agitación orbital (MRC, TOU-50N 25 mm de excentricidad) a 180 rpm, durante 16 h. Finalizada la etapa de fermentación, el cultivo se centrifugó, para remover las células de levaduras y el sobrenadante libre de células, al que se le denominó extracto enzimático (EE), se mantuvo a -18° C, hasta su utilización.

Diseño factorial

Las fermentaciones se realizaron variando las condiciones de cultivo (temperatura, pH y agitación), mediante la aplicación de un diseño factorial 2^3 . Estos factores

se analizaron en dos niveles: alto (+1) y bajo (-1). Las variables codificadas y las respectivas variables reales, se presentan en la Tabla 1. Basado en el diseño factorial, se confeccionó una matriz con 8 experimentos (Tabla 2). Las experiencias se realizaron en un orden aleatorio, con tres repeticiones y los resultados se presentan como valores medios. El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo con el programa estadístico Statgraphics Centurión XV.

Los cultivos se llevaron a cabo según se describió anteriormente y se incubaron bajo las condiciones determinadas según el diseño experimental planteado, durante 16 h. Se midió la actividad PGasa de los sobrenadantes por determinación de los grupos reductores liberados con el método de Somogyi-Nelson, usando AG como referencia [4].

Tabla 1: Valores reales y codificados de los factores según el diseño factorial 23.

Factor	Código	Niveles del factor	
		Alto (+1)	Bajo (-1)
Temperatura (° C)	A	50	30
pH	B	6	3
Agitación (rpm)	C	250	150

Tabla 2: Diseño a niveles alto y bajo para cada factor.

tc	A	B	C	Exp
1	30	3	150	1
a	50	3	150	2
b	30	6	150	3
ab	50	6	150	4
c	30	3	250	5
ac	50	3	250	6
bc	30	6	250	7
abc	50	6	250	8

A: Temperatura (° C); B: pH; C: Agitación (rpm)

Diseño experimental de Doehlert

Se aplicó la metodología de superficie de respuesta, utilizando el diseño experimental de Doehlert, para optimizar las condiciones de cultivo para la producción de PGasa por Wa cepa 110 [14]. Se realizaron un total de nueve experiencias que estudiaron el efecto de dos variables independientes a cinco niveles cada una, con tres repeticiones en el punto central [15]. Los factores estudiados fueron temperatura (30° C- 50° C) y pH (3-6). Los valores reales y codificados de las variables independientes de acuerdo al diseño experimental, se presentan en la Tabla 3.

Las fermentaciones se realizaron según se describió anteriormente. Las experiencias se realizaron por triplicado y se tomaron para los cálculos valores promedios. Las curvas de superficie de respuesta se obtuvieron a través del programa estadístico Statgraphics Centurión XV.

Tabla 3: Valores codificados y reales utilizados en el diseño experimental de Doehlert.

Experiencia	Valores codificados		Valores reales	
	Temperatura	pH	Temperatura (° C)	pH
1	1	0	50	4,5
2	0,5	-0,866	45	3
3	-0,5	-0,866	35	3
4	-1	0	30	4,5
5	-0,5	0,866	35	6
6	0,5	0,866	45	6
7	0	0	40	4,5
8	0	0	40	4,5
9	0	0	40	4,5

Aplicación del extracto enzimático

Se evaluó la capacidad macerante del EE de Wa cepa 110 sobre tejidos vegetales de pimiento morrón (*Capsicum annuum L.*). Para ello los frutos de morrón fueron lavados y cortados en cubos de aproximadamente 5 mm de cada lado. El proceso de maceración se llevó a cabo en frascos Erlenmeyers de 125 mL, los que contenían 15mL del EE y 35 mL de buffer acetato de sodio/ácido acético (BAc., 0,2 M, pH 4,5). Los frascos se incubaron a 180 rpm, en una incubadora con agitación orbital, durante 3,5 h, a 40° C. Las experiencias se realizaron por triplicado. El pH y la temperatura seleccionados para el proceso de maceración se encuentran dentro del rango de estabilidad de la enzima [5]. Una vez cumplido el tiempo de maceración correspondiente, el contenido total de cada frasco se filtró a través de malla de 20 mesh. El filtrado se recolectó en tubos cónicos graduados de 10 mL. La suspensión de células simples liberadas fue sedimentada a 5° C, durante 4 h [12] y luego secadas en estufa a 45° C hasta peso constante. La pérdida de coherencia de los tejidos y el peso de las células libresse utilizaron como indicadores de la actividad macerante [16]. La observación de células libres se efectuó mediante un microscopio Olympus, modelo CH-2, con un aumento de 400 ×. Los blancos del proceso de maceración se realizaron con la enzima inactivada. El rendimiento del proceso de maceración se expresó como porcentaje de células simples liberadas respecto al peso seco del tejido original (% p/p).

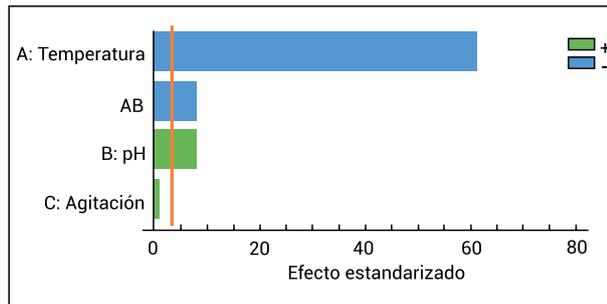
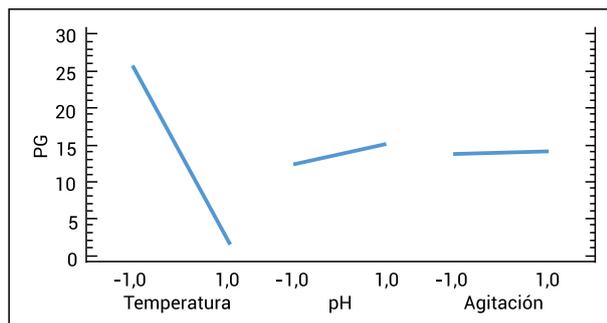
Resultados y Discusión

En la Tabla 4 se presenta el Análisis de Varianza para la producción de PGasa por Wa cepa 110 mediante el diseño factorial 2³.

Tabla 4: Análisis de Varianza para la producción de PG por Wa cepa 110 mediante el diseño factorial 2³.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	1139,08	1	1139,08	3722,3	0,0000
B:pH	18,7884	1	18,7884	61,40	0,0043
C:Agitación	0,26645	1	0,26645	0,87	0,4196
AB	19,7192	1	19,7192	64,44	0,0040
Error total	0,91805	3	0,30602		
Total (corr.)	1178,77	7			

En la Figura 1 se presenta el Diagrama de Pareto y en la Figura 2 el gráfico de los Efectos Principales.

**Figura 1:** Diagrama de Pareto para la producción de PG por Wa cepa 110.**Figura 2:** Gráfica de los efectos Principales para la producción de PG por Wa cepa 110

La Tabla de ANOVA (Tabla 4) muestra que la temperatura, el pH y la interacción entre éstos, influyeron significativamente en la producción de la enzima, siendo el valor de P menor a 0,05, para un nivel de confianza del 95,0%. El R² estadístico (99,92%) indicó que el modelo presentó un buen ajuste a los datos experimentales.

El pH influyó de manera positiva sobre la producción de la enzima, mientras que la temperatura lo hizo de manera negativa, al igual que la interacción entre ambos factores. La velocidad de agitación no influyó sobre la misma variable de respuesta (Fig. 1). El aumento de temperatura mostró una marcada disminución en la producción de la enzima (Fig. 2).

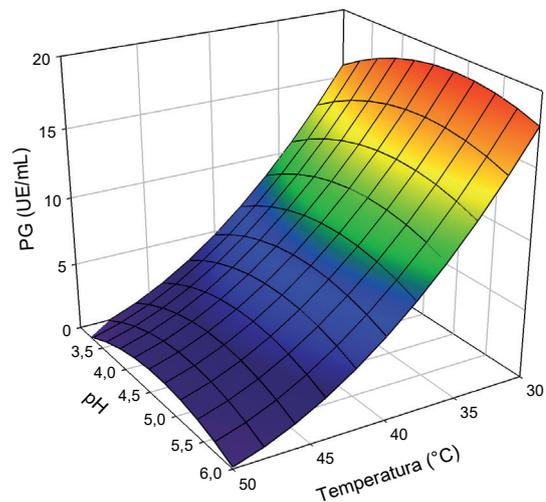
La producción de PGasa por Wa cepa 110 en las distintas experiencias realizadas según el diseño experimental de Doehlert (Tabla 3) se convirtieron en una ecuación polinomial de segundo orden que se presenta a continuación:

$$PGasa\left(\frac{UE}{ML}\right) = 7,363 - 8,525 * T + 0,759 * pH + 2,892 * T^2 - 2,645 * pH^2 \quad (1)$$

En dicha ecuación, la temperatura (T) y el pH, representan los valores codificados. La ecuación presentó un muy buen ajuste a los datos experimentales (R²= 0,99).

Según la ecuación 1, se puede puntualizar que las dos variables independientes tuvieron un efecto lineal significativo positivo (pH) y negativo (T). La temperatura fue la variable lineal más importante que afectó la producción de PG, ya que posee el mayor coeficiente de regresión. Ambos factores tuvieron efectos cuadráticos negativos (pH) y positivos (T), indicando la existencia de un máximo de producción para la temperatura y un mínimo para el pH.

En la Figura 3 se presenta la superficie de respuesta para la producción de PG en función de las dos variables independientes.

**Figura 3:** Superficie de respuesta mostrando el efecto de la temperatura y el pH sobre la producción de PG por *W. anomalus*.

La Figura 3 muestra que la mayor producción de la enzima se obtuvo a temperaturas bajas y pH en el rango de 5 a 6.

La ecuación 1 arrojó un valor máximo de producción de PG de 18,84 UE/mL a 30° C y pH 5,1. Esta temperatura de 30° C coincide con el valor más bajo ensayado, por lo tanto es posible suponer que la misma no se corresponde con la temperatura óptima para la producción de la enzima. Sin embargo se seleccionó esta temperatura mínima, a los efectos de evitar costos adicionales en el proceso, debido a la necesidad de refrigerar el cultivo en el biorreactor, en las épocas de elevadas temperaturas en la región.

Moyo y col. (2003) [17] determinaron que los efectos de la temperatura y el pH fueron los factores más significativos en la producción de enzimas con actividad pectinolítica de *Kluyveromyces wickerhamii*. Las condiciones óptimas estimadas fueron pH 5,0 y temperatura a 32° C. Otros autores informaron que la temperatura de fermentación ejerció un efecto significativo sobre la producción de PG por *Bacillus subtilis*, obteniéndose elevados rendimientos entre 30-35° C [18].

En la Figura 4 se muestra el tejido de pimiento morrón, luego del proceso de maceración con el EE de Wa cepa 110. En la Figura 5 se muestran microfotografías (400 ×) de las células liberadas del tejido vegetal, luego del tratamiento enzimático.

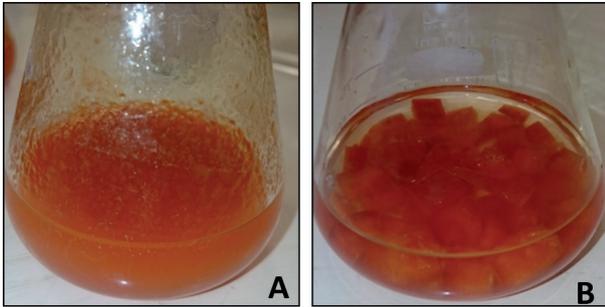


Figura 4: Tejidos de pimiento morrón macerados con el extracto enzimático (A). Blanco con la enzima inactivada (B).

Transcurridas 3,5 h de incubación se observó ablandamiento del tejido vegetal (Fig. 4 A). Los controles realizados con la enzima inactivada mostraron que el efecto de la maceración fue causado principalmente por la actividad PGasa presente en el extracto enzimático y no por efectos mecánicos producto de la agitación (shear) (Fig. 4 B).

El examen microscópico de los productos macerados mostró células simples liberadas y agregados celulares (Fig. 5 A) no se observó lisis de la pared celular. El rendimiento del proceso de maceración resultó del 98,02% (% p/p).

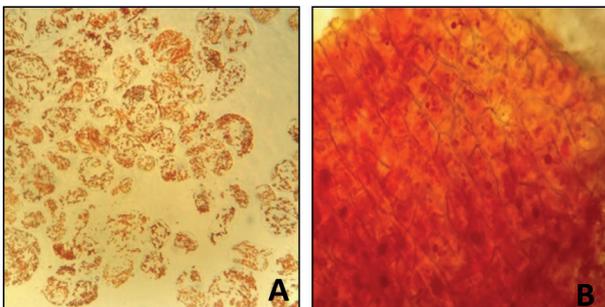


Figura 5: Microfotografías (400 ×) de células de tejidos de pimiento morrón macerados con el extracto enzimático de Wa cepa 110 (A), blanco con la enzima inactivada (B).

La actividad de la enzima producida por Wa cepa 110 se centra particularmente en la laminilla media (protopectina) que une entre sí a las células del tejido y no degrada celulosa, debido a lo cual, las células no se lisaron [11].

Conclusión

El pH y la temperatura influyeron significativamente en la producción de la enzima PGasa por Wa cepa 110, mientras que la influencia de la velocidad de agitación fue no significativa. Los mayores títulos se obtuvieron a 30° C y pH 5,1; con un valor máximo de producción de la enzima

(en el rango evaluado) de 18,84 UE/mL. Teniendo en cuenta las elevadas temperaturas imperantes en la región, durante los meses de verano, esta temperatura de 30° C permitiría realizar los cultivos a escala biorreactor sin la necesidad de refrigeración, evitando de esta manera costos adicionales al proceso.

El extracto enzimático de Wa cepa 110, fue capaz de macerar tejidos de morrón, observándose ablandamiento del tejido y células simple liberadas, sin evidenciarse ruptura celular, luego de 3,5 h de incubación.

Bibliografía

1. Tapre, A. R. y Jain, R. K. *Pectinases: Enzymes for fruit processing industry*. International Food Research Journal, 21(2): p. 447-453. 2014.
2. Tari, C.; Göğüs, N. y Tokatli, F. *Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by Aspergillus sojae ATCC 20235 using response surface methodology*. Enzyme and Microbial Technology, 40(5): p. 1108-1116. 2007.
3. Paudel, Y. P.; Lin, C.; Shen, Z. y Qin, W. *Characterization of pectin depolymerising exo polygalacturonase by Bacillus sp. HD2 isolated from the gut of Apis mellifera L.* Microbiology Discovery, 3 (2): 1–8. 2015.
4. Ferreyra, O. A.; Cavalitto, S. F.; Hours, R. A. y Ertola, R. J. *Influence of trace elements on enzyme production: Protopectinase expression by a Geotrichum klebahnii strain*. Enzyme and Microbial Technology, 31(4): p. 498-504. 2002.
5. Martos, M. A.; Butiuk, A. P.; Rojas, N. L. y Hours, R. A. *Purification and characterization of a polygalacturonase produced by Wickerhamomyces anomalus*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 57(4): p. 587-594. 2014b.
6. Malvessi, E. y Da Silveira, M. M. *Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by Aspergillus oryzae*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 47(5): p. 693-702. 2004.
7. Da Silva, G. E.; De Fátima Borges, M.; Medina, C.; Hilsdorf Piccoli, R. y Freitas Schwan, R. *Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits*. FEMS Yeast Research, 5(9): p. 859-865. 2005.
8. Barragán, J. C. A.; Zerpa, S. A. I.; Castillo, M. L. S.; Haro, M. R.; Alarcón, W. N. y Gasco, F. O. *Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de pectinasas producidas por Bacillus spp.* Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas. 34(1): p. 33-41. 2014.
9. Díaz, A.; Flórez, J. y Cotes, A. M. *Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura Pichia onychis (Lv027)*. Revista Colombiana de Biotecnología. VII(1): p. 51-58. 2005.
10. Yubero, F. *Relevamiento del uso de enzimas en la industria paraguaya y su aplicación en la producción de alimentos para animales*. Compendio de Ciencias

- Veterinarias, 6(1): p. 31-34. 2016
11. **Martos, M. A.; Zubreski, E. R.; Combina, M.; Garro, O. A. y Hours, R. A.** *Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots.* Food Science and Technology (Campinas), 33(2): p. 332-338. 2013a.
 12. **Martos, M. A.; Zubreski, E. R.; Garro, O. a. y Hours, R. A.** *Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast Wickerhamomyces anomalus Isolated from Citrus Fruits Peels.* Biotechnology research international, p. 1-7. 2013b.
 13. **Martos, M. A.; Butiuk, A. P.; Rojas, N. L. y Hours, R. A.** *Batch culture of Wickerhamomyces anomalus in a lab scale bioreactor for poligalacturonase production.* Revista Colombiana de Biotecnología, 16(2): p. 68-73. 2014^a.
 14. **Doehlert, D. H.** *Uniform Shell Designs.* Journal of the Royal Statistical Society.19(3): p. 231-239. 1970.
 15. **Butiuk, A. P.; Adachi, O. y Hours, R. A.** *Yerba mate as a novel inducer for fungal chlorogenate hydrolase production.* Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.4(3): p. 327-334. 2015.
 16. **Schwan, R. F.; Cooper, R. M. y Wheals, A. E.** *Endopolygalacturonase secretion by Kluyveromyces marxianus and other cocoa pulp-degrading yeasts.* Enzyme and Microbial Technology, 21(4): p. 234-244. 1997.
 17. **Moyo, S.; Gashe, B. A.; Collison, E. K. y Mpuchane, S.** *Optimizing growth conditions for the pectinolytic activity of Kluyveromyces wickerhamii by using response surface methodology.* International Journal of Food Microbiology, 85(1-2): p. 87-100. 2003.
 18. **Uzuner, S. y Cekmecioglu, D.** *Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of Bacillus subtilis growing on hazelnut shell hydrolyzate.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 113: p. 62-67. 2015.

Recibido: 08/01/2018.

Aprobado: 14/02/2019.