

Variación del Complejo Pectinolítico del Sistema Inmovilizado de *Aspergillus* HL por Efecto del pH y Temperatura

Nohemí Reyes¹, Ignacio Islas², Rosa Domínguez³, Gerardo Rivera³ y Sara Solís^{3*}

¹CIATEJ Unidad Sureste. C.30, N.151. García Ginerés, C.P. 97070,

²Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. C.43, N.130. Chuburná. C.P. 97200.

³Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yuc. México. C.P. 97118

Tel/Fax: +52 999 9448479 .

E-mail: ssolis@itmerida.mx

RESUMEN

El pH y la temperatura modificaron los perfiles de producción de pectinasas por *Aspergillus* HL inmovilizado en gel de alginato de calcio. Se detectó alta estimulación de la actividad endopectinasa (endoP) cuando las condiciones de cultivo se ajustaron a 39°C y pH inicial 2.8 y la síntesis de pectina liasa (PL) se estimuló a pH 3.5 y 39°C. La actividad pectina esterasa (PE) pudo ser incrementada a menor temperatura 31°C y pH 3.5. Los zimogramas en geles de poliacrilamida mostraron bandas de actividad endoP y PL con masa molecular aparente de 45 kDa y 60 kDa respectivamente. Los resultados mostraron diferente respuesta en la actividad producida por el sistema libre y el inmovilizado y la viabilidad de las esferas de gel se comprobó por su reuso durante 23 días. Las células fúngicas atrapadas incrementaron la productividad pectinolítica hasta 17 veces con respecto a las células libres demostrando su potencial para futuras aplicaciones comerciales.

Palabras clave: *Pectinasas, células inmovilizadas, pH y temperatura*

ABSTRACT

Temperature and pH greatly influenced the composition of pectinases produced by *Aspergillus* HL immobilized in beads of Ca-alginate. A higher endopectinase (endoP) activity in cell free was detected when cultivation conditions were adjusted to 39 °C and pH 2.8. However, the synthesis of pectin lyase (PL) was stimulated when pH was changed to 3.5 and 39 °C. Pectin esterase activity (PE) could be improved at a lower temperature 31°C and pH 3.5. Zymograms on polyacrylamide gels showed endoP and PL bands with apparent molecular mass of 45 kDa and 60 kDa respectively. The long-term viability of the fungal cells was tested by reusing the immobilized system 23 days. The entrapped fungal cells increased endoP, PL

and PE productivities up to 17 times with respect to free cells demonstrating the potential of this system for commercial applications.

Keywords: *Pectinases, immobilized cells, pH and temperature*

INTRODUCCION

Las pectinasas son biocatalizadores ampliamente usados en la industria alimentaria. Estas enzimas facilitan el procesamiento de frutas y vegetales, de bebidas alcohólicas y la extracción de aceites, saborizantes y pigmentos a partir de plantas (Kashyap *et al.*, 2001). Se han descrito nuevas aplicaciones de las pectinasas como la obtención de oligogalacturónidos a partir de la pectina que son utilizados en la producción de alimentos funcionales (Manderson *et al.*, 2005) y en la industria farmacéutica como fuertes estimuladores del sistema inmune (Bedouet *et al.*, 2005). Dependiendo de su especificidad y el tipo de reacción que catalizan, las pectinasas se clasifican en pectina esterasas, poligalacturonasas y pectina liasas. Las pectina esterasas (EC 3.1.1.11) catalizan la desesterificación de la pectina en ácido péctico y metanol. Las poligalacturonasas (EC 3.2.1.15) y las pectina liasas (EC 4.2.2.10) catalizan el rompimiento del enlace glicosídico por hidrólisis y transeliminación respectivamente, generando mono y oligómeros de pectina como producto (Jayani *et al.*, 2005).

Las industrias procesadoras de alimentos requieren diferentes preparaciones enzimáticas para llevar a cabo la degradación completa o limitada de la pectina dependiendo del proceso (Jacob

& Prema, 2006). Por ejemplo, preparaciones con alta actividad PE y endoP son necesarias en los procesos de clarificación de jugos de frutas y vinos para reducir la viscosidad y mejorar la eficiencia de la filtración. Por otro lado, se requieren extractos ricos en PL y PE para la extrusión de la fruta (Phutela *et al.*, 2005). Las preparaciones pectinolíticas provenientes de hongos del género *Aspergillus* son ampliamente utilizadas en la práctica (Botella *et al.*, 2007) y los niveles de producción varían dependiendo del sustrato, el tipo de cultivo, la presencia de inhibidores o activadores y las condiciones físicoquímicas (Favela-Torres *et al.*, 2006). Por ejemplo, el ambiente de pH y la temperatura son parámetros clave que tienen gran influencia en las funciones fisiológicas como el crecimiento del hongo y la expresión de enzimas. Mediante la modificación del pH solo o interactuando con otras variables se han logrado modificar los perfiles pectinolíticos en cultivos de *Aspergillus niger*, lo que podría ser útil en la obtención de preparaciones con diferentes propósitos industriales (Taragano & Pilosof, 1999). Se ha detectado en cultivos de *Penicillium griseoroseum* que a pH 4.5 se estimula la actividad PG y PE y a pH 5-7 la actividad PL (Piccoli-Valle *et al.*, 2001).

Durante la agitación de los cultivos, las células fungales son sensibles a daño

mecánico, el cual es un factor que decrece la producción de enzimas, incrementa los costos de producción y dificulta la recuperación de las enzimas. En este sentido, la inmovilización de células de hongos pectinolíticos representa una estrategia cuyos beneficios industriales incluyen el incremento en la producción de enzimas, la integridad de las células y la posibilidad de reciclar la biomasa celular para producir nuevos ciclos de fermentación (Sadhana *et al.*, 2006). Sin embargo, este sistema ha sido poco explorado en hongos.

En este estudio se usó el hongo *Aspergillus* HL que previamente se inmovilizó en alginato de calcio. Debido al amplio potencial de estas enzimas es necesario estudiar varios aspectos relacionados con la producción de pectinasas en este sistema para obtener altos títulos de enzimas. El propósito de este trabajo está centrado en evaluar la influencia del pH y la temperatura en la producción de pectinasas y el reuso del sistema inmovilizado.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

Se utilizó el híbrido pectinolítico *Aspergillus* HL de la colección de cultivos del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Solís *et al.*, 2009).

Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer con 200 ml del siguiente medio:

pectina 2%, K_2HPO_4 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%. El pH se ajustó en un rango de 2.5-5.0 y la temperatura entre 27°C y 39°C. Los medios se inocularon con una suspensión de 4×10^6 esporas/ml. Para la inmovilización se adicionó 1 ml de inóculo a 5 ml de alginato de sodio (2%) en las condiciones descritas previamente (Reyes *et al.*, 2006). Los matraces se mantuvieron en agitación a 200 rpm y las esferas se recuperaron por filtración a las 72 h de cultivo.

Cultivo semicontinuo

La estabilidad operacional y reuso del hongo inmovilizado se determinó en cultivos batch consecutivos de 72 h a pH 3 y 39°C. Después de cada cultivo, las esferas se obtuvieron por filtración, se lavaron con una solución de $CaCl_2$ 0.05 M y se transfirieron a un medio fresco.

Biomasa

La biomasa atrapada se recuperó por filtración después de incubar las esferas en buffer citratos 0.2 M (pH 5) a 30°C y 200 rpm por 48 h, se secó a 60°C y se determinó el peso seco. La biomasa liberada se obtuvo mediante la filtración del cado de cultivo y se midió el peso seco. El porcentaje de biomasa liberada se calculó con respecto a la biomasa total.

Determinación de la actividad endoP

La actividad se midió por el método reportado por Larios *et al.* (1998). La mezcla de reacción fue la siguiente: 500 µl de muestra en 10 ml de pectina 1% en

buffer acetatos (pH 4.2). La reducción de la viscosidad se monitoreó a 30°C en un viscosímetro Ostwald. Una unidad de actividad endoP (U) se definió como la cantidad de enzima que reduce 50% la viscosidad de la solución de pectina por minuto en las condiciones de ensayo.

Determinación de la actividad PL

Se empleó el método reportado por Delgado *et al.* (1992), el cual se basa en el incremento de la absorbancia a 230 nm ocasionado por la formación de productos insaturados de la pectina. La mezcla de reacción consistió en 0.5 ml del extracto enzimático, 1 ml de pectina cítrica (1%) y 1 ml de buffer Tris-HCl 0.05 M (pH 8.8). Las muestras se incubaron 2 h a 45°C y después se transfirió 1 ml a 4 ml de HCl 0.01 M frío. Una unidad (U) se definió como la cantidad de enzima que produce el incremento de 0.1 en absorbancia en las condiciones de ensayo.

Determinación de la actividad PE

Se midió por la disminución del pH a través de la titulación de los grupos carboxílicos liberados de la pectina de acuerdo a Kertesz (1937). Se usó una solución de pectina 1% en NaCl 0.1 M y un ml de extracto crudo enzimático, manteniendo el pH a 7.5 con una solución de NaOH 0.004 M durante 30 min a 30°C. Una unidad de actividad (U) es la cantidad de enzima que libera un microequivalente de grupos carboxílicos/ml/min en las condiciones de ensayo.

El rendimiento de las enzimas se expresó como productividad específica (U/mg de biomasa/h) y productividad volumétrica (U/l/h).

Electroforesis de proteínas y zimogramas

Se usaron geles de acrilamida 10%, bisacrilamida 2.7% y pectina 0.1%. Se adicionó 20 µg de proteína desnaturalizada y se corrieron los geles de acuerdo Aguilar *et al.* (1991). Se usaron los siguientes marcadores moleculares (kDa): albúmina sérica bovina 66, ovoalbúmina 45, y anhidrasa carbónica 29. Las proteínas presentes en el gel se renaturalizaron en buffer Tris-HCl 0.01 M (pH 7.6). Para identificar la actividad endoP y PE, los geles se incubaron en buffer acetatos 0.17 M (pH 5) a temperatura ambiente y después se tiñó el gel con una solución rojo de rutenio 0.05%. Para identificar la actividad PL, se incubó otro gel en una solución de CaCl₂ 0.01 M a 4°C y posteriormente se transfirió a buffer Tris-HCl (pH 8.8) con CaCl₂ 0.01M. Las bandas de actividad se detectaron por tinción con una solución de rojo de rutenio 0.03% (Mwenje & Ride, 1996).

Análisis estadístico

Todos los datos representan el valor promedio de dos experimentos por duplicado, a partir de los cuales se determinó la desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del pH y la temperatura

Artículos

Durante el cultivo del hongo inmovilizado se determinó que la temperatura modificó la producción de las pectinasas en un rango de temperatura de 27 a 39°C. En los extractos crudos obtenidos a las 72 h de cultivo se detectó la máxima producción endoP y PL a 39°C, mientras que a 31°C se incrementó la

actividad PE (Fig. 1). La variación en la productividad de las enzimas no se relacionó con el crecimiento, ni con el cambio de pH durante el cultivo, lo que sugiere que a alta temperatura tiene un efecto inductor de la síntesis y/o secreción particularmente de las enzimas despolimerizantes.

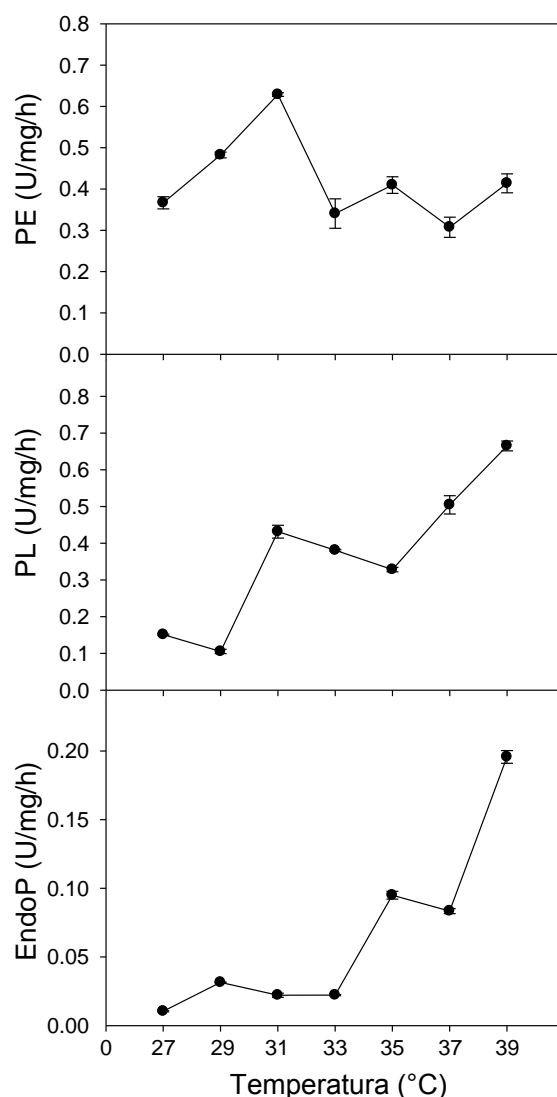


Fig. 1. Efecto de la temperatura en la productividad específica de pectinasas de *Aspergillus* HL atrapado en alginato de calcio a las 72 h de cultivo.

Artículos

El efecto del pH en la actividad pectinolítica se evaluó en un rango de 2.5-5.0 (Fig. 2). A pH 3.5 se estimuló la

producción de PL y PE y a pH muy ácido la actividad endoP.

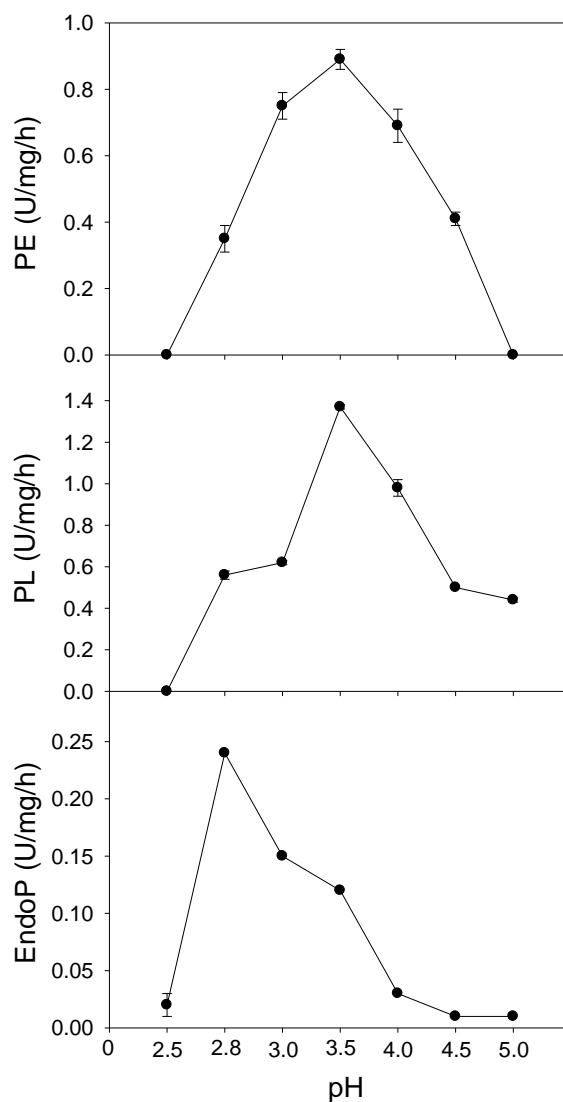


Fig. 2. Efecto del pH inicial sobre la productividad específica de pectinasas de *Aspergillus* HL atrapado en alginato de calcio a las 72 h de cultivo.

Para corroborar la respuesta diferente en la síntesis de pectinasas por pH, se corrieron geles de electroforesis en condiciones desnaturizantes. El patrón de proteínas cambió con la variación del pH

(Fig. 3), a pH 3.5-5 se detectaron patrones complejos de proteínas, mientras que a pH 2.5-3 se observaron pocas bandas. Este efecto ha sido asociado con la represión causada por el estrés ácido (Aguilar *et al.*,

1991). Los zimogramas muestran a pH 2.8-3.5 una banda intensa que corresponde a la actividad endoP con masa molecular aparente de 45 kDa. En el mismo gel está presente una banda muy oscura de 32 kDa característica de la actividad PE (Downie *et al.*, 1998) que se intensificó a pH 3.5. La actividad "in situ" PL se observó a pH 3.5-5 y se estimó una masa molecular aparente de 60 kDa. Los mecanismos que regulan la respuesta al estrés ácido han sido poco estudiados y entre éstos, algunos autores han demostrado que la regulación ocurre a nivel

transcripcional. Por ejemplo, Cotton *et al.* (2003) demostraron que la acidificación progresiva del medio ambiente por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* representa la principal estrategia para la expresión secuencial de enzimas poligalacturonasas como factores de patogenicidad. También se ha identificado que la regulación por pH en *Collethotricum acutatum* es mediada por el factor transcripcional PacC (dedos de zinc), que activa la expresión de genes en condiciones alcalinas y los reprime en condiciones ácidas (Peñalva & Arst, 2004; You & Chung, 2007).

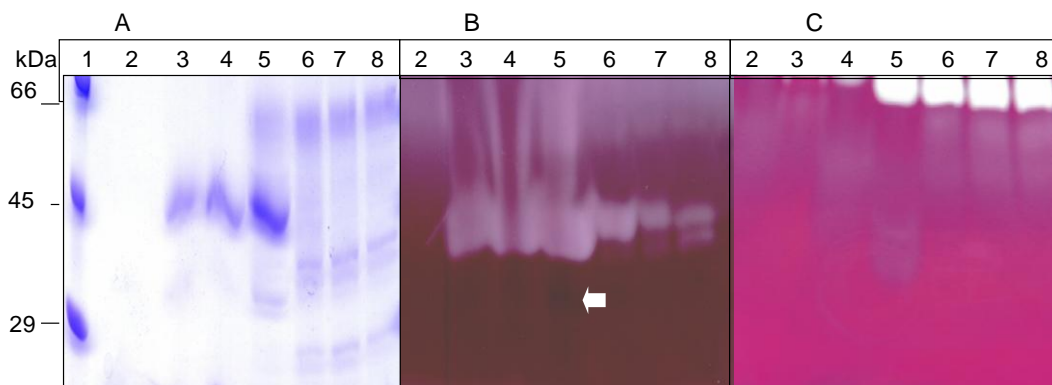


Fig. 3. Geles de electrophoresis SDS-PAGE con extractos producidos por células inmovilizadas de *Aspergillus* HL a diferente pH inicial. Perfiles de proteína (A). Zimogramas de endoP (B) y PL (C). Marcadores de masa molecular (línea 1), pH 2.5 (línea 2), 2.8 (Línea 3), 3 (Línea 4), 3.5 (Línea 5), 4 (línea 6), 4.5 (línea 7), 5 (línea 8).

Cinéticas de producción de pectinasas

El análisis de las cinéticas de producción de pectinasas (39°C y pH 3.0) mostró variación en la respuesta de las células libres y las inmovilizadas. Las células atrapadas aumentaron 8 veces la producción PE y PL con respecto al sistema libre, a las 24 h y 36 h respectivamente (Fig. 4) y una respuesta tardía en la producción de endoP (72 h)

(Reyes *et al.* 2006). Aunque no se ha encontrado un efecto sinérgico entre las enzimas pectinolíticas, el orden de aparición sugiere un efecto cooperativo para degradar la pectina. El crecimiento celular se incrementó notablemente en las células atrapadas en las esferas de alginato de calcio con respecto a las libres. Las esferas mostraron una densa capa de micelio en el exterior, lo cual representó

Artículos

una mayor área superficial que pudo favorecer el consumo de oxígeno e intercambio de nutrientes y la excreción de enzimas. Los resultados de este trabajo son diferentes con los reportados por Federici *et al.* (1990), quienes detectaron alta producción de glucoamilasas en *Aureobasidium pullulans* a pesar del bajo crecimiento del hongo inmovilizado en

alginato de calcio y lo relacionaron a una mayor estabilización de las glucoamilasas mediante interacciones físico-químicas con el calcio. También, Domínguez-Espinosa & Webb, 2003 atribuyeron el aumento en la producción de enzimas durante el cultivo de células inmovilizadas al incremento en la actividad metabólica y la protección a daño mecánico.

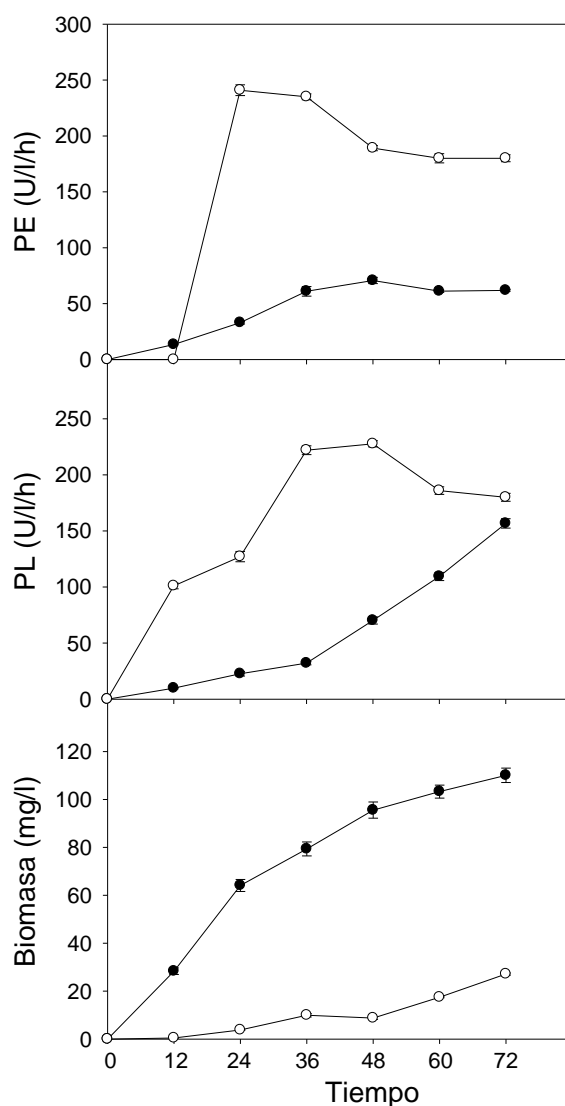


Fig. 4. Curvas de producción de pectinasas y biomasa por células inmovilizadas (●) y células libres (○) a pH 3 y 39°C.

Artículos

Una ventaja de las células inmovilizadas con respecto a los cultivos convencionales libres es la capacidad de reuso. Recientemente Gattás *et al.* (2009) inmovilizaron esporas de *Aspergillus* sp. en alginato de calcio que aumentaron la actividad PG y lograron reutilizar el sistema

6 veces. En este estudio, la eficiencia en el reuso del sistema inmovilizado de *Aspergillus* HL fue satisfactorio a lo largo de 23 días, debido a que la productividad volumétrica de endoP, PL y PE aumentó 6, 17 y 17 veces respectivamente, con respecto a las células libres (Tabla 1).

Tabla 1. Reúso de células inmovilizadas de *Aspergillus* HL

Ciclos	Productividad volumétrica (U/l/h)			Biomasa liberada (%)
	endoP	PL	PE	
1	100	152	60	5.7
2	220	1309	270	7.1
3	501	1470	879	7.7
4	739	1551	481	15.9
5	960	1482	480	15.8
6	1530	1478	680	23.7
7	780	490	972	27.7
8	430	0	928	20.7
Total	5260	8040	4760	
CL	870	470	280	

Los extractos enzimáticos de las células libres (CL) se obtuvieron a 39°C y pH 3 a las 144 h y los ciclos de reuso fueron de 72 h.

Durante el cultivo semicontinuo (552 h), solo se liberó 27% del micelio al medio de cultivo, lo que indica que las esferas mantuvieron la integridad macánica durante los ciclos de fermentación. Estos resultados contrastan con los descritos en *Aspergillus* 26, en el cual se liberó 40% de la biomasa durante el reuso (Angelova *et al.*, 1998). Se ha propuesto que el atrapamiento en alginato de calcio y el uso repetido, favorece la extensión de las fases de crecimiento exponencial y estacionaria, lo que en consecuencia incrementa la

eficiencia catalítica del biocatalizador (Pashova *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demostraron que el pH y la temperatura modificaron el perfil de producción de pectinasas de *Aspergillus* HL inmovilizado en alginato de calcio. La alta productividad pectinolítica y la estabilidad mecánica exhibida por las esferas, le confiere a este sistema un potencial para la producción y

aplicación de pectinasas en procesos biotecnológicos.

REFERENCIAS

- Aguilar G, Trejo B, García J & Huitron C (1991) Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH -Y- 1043. *Can. J. Microbiol.* 37: 912-917.
- Angelova M, Sheremetska P & Lekov M (1998) Enhanced polymethylgalacturonase production from *Aspergillus niger* 26 by calcium alginate immobilization. *Process Biochem.* 33: 299-305.
- Botella C, Diaz A, Ory I, Webb C & Blandino A (2007) Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *J. Process Biochem.* 42: 98-101.
- Bedouet I, Courtois B & Courtois J (2005) Methods for obtaining neutral and acid oligosaccharides from flax pectins. *Biotechnol. Lett.* 27: 33-40.
- Cotton P, Kasza Z, Bruel C, Rasclé C & Fevre M (2003) Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol.* 227: 163-169.
- Delgado L, Trejo, Huitron C & Aguilar G (1992) Pectin lyase from *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:515-519.
- Downie B, Dirk J, KHadfield KT, Wilkins A, Bennett L & Bradford K (1998) A gel diffusion assay for quantification of pectin methylesterase activity. *Anal. Biochem.* 264 (1998) 149–157.
- Dominguez Espinosa R & Webb C (2003) Production of *Monascus* pigments in wheat based substrates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 329-336.
- Favela-Torres E, Volke-Sepúlveda T & Viniegra-González G (2006) Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 221–227.
- Federici F, Petruccioli M & Mille MW (1990) Enhancement and stabilization of the production of glucoamylase by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* in a fluidized-bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 407-409.
- Gattás AL, Bueno RM & Ribeiro HL (2009) Stimulation of polygalacturonase production in an immobilized system by *Aspergillus* sp: effect of pectin and glucose. *Eur. Food Res. Technol.* 229: 923-928.
- Jacob N & Prema P (2006) Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 263–267.
- Jayani RS, Saxena S & Gupta R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 42: 98-101.
- Kashyap DR, Vohora PK, Chopra S & Tewari R (2001) Applications of pectinases in the commercial sector. A review. *Biores. Technol.* 77: 215-227.

- Kertesz ZI (1937) Pectic enzymes. The determination of pectin methoxylase activity. *J. Biol. Chem.* 121: 589-598.
- Larios G, García J & Huitron C (1989) Endopolygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Biotechnol. Lett.* 11: 729-734.
- Manderson K, Pinart M, Tuohy KM, Grace WE, Hotchkiss AT, Widmer W, Yadhav MP, Gibson GR & Rastall RA (2005) *In vitro* determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Appl. Environ. Microbiol.* 7: 8383-8389.
- Mwenje E & Ride JP (1996) Morphological and biochemical characterization of *Armillaria* isolates from Zimbabwe. *Plant Pathol.* 45:1036-1051.
- Olsson L, Christensen TMI, Hanson PK & Palmquist AE (2003) Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *T. reesei* RUT C-30. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 612-619.
- Pashova S, Slokoska L, Sheremetska P, Krumova E., Vasileva L & Angelova M (1999) Physiological aspects of immobilised *Aspergillus niger* cells producing polymethylgalacturonase. *Process Biochem.* 35: 15-19.
- Peñalva M & Arst J (2004) Recent advances in the characterization of ambient of pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 424-451.
- Phutela U, Dhuna V, Sandhu S & Chadha BS (2005) Pectins and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Braz. J. Microbiol.* 36: 63-69.
- Piccoli-Valle RH, Silva DO, Passos VT & Passos LMF (2001). Production of Pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. *Braz. J. Microbiol.* 32 doi:10.1590/S1517-83822001000200013.
- Reyes N, Rivas-Ruiz I, Domínguez-Espinosa R &, Solís S (2006) Influence of immobilization parameters on endopolygalacturonase productivity and gel bead mechanical resistance by hybrid *Aspergillus* HL entrapped in calcium alginate. *Biochem. Eng. J.* 32: 43-48.
- Sadhana N, Yashdeep P, Divya S, Anand N & Anil K (2006) Production polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inductor. *Process Biochem.* 41: 1136-1140.
- Solís S, Loeza J, Segura G, Tello J, Reyes N, Lappe P, Gutiérrez L & Huitrón C (2009) Hydrolysis of orange peel by a pectin lyase overproducing hybrid obtained by protoplast fusion between mutant pectinolytic *Aspergillus flavipes* and *Aspergillus niveus* CH-Y-1043. *Enzyme Microb. Technol.* 44: 123-128.
- Taragano VM & Pilosof MR (1999) Application of Doehlert designs for water activity, pH and fermentation

Artículos

time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 411-419.

You B & Chung K (2007) Phenotypic characterization of mutants of the citrus pathogen *Colletotrichum acutatum* defective in a PacC-mediated pH regulatory pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* 277:107–114.