

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PÉCTICAS ENSAYOS PRELIMINARES

SORANA YEGRES¹, JOSÉ SÁNCHEZ², MARIO BELMAR¹, WALLIS RIVEROS¹ Y DANIEL BELMAR³.

¹*Departamento de Bioanálisis. Escuela de Ciencias. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela*

²*Laboratorio de Fermentaciones. Dpto. de Biología. Facultad de Ciencias. ULA, Mérida, Venezuela.*

³*Laboratorio Clínico Universitario. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.*

RESUMEN

Las cáscaras de las mazorcas, son el subproducto más importante que se acumula en grandes cantidades durante el beneficio del cacao en los lugares donde son depuestas. Este desecho contiene pectina, un azúcar fácilmente aprovechable por los microorganismos. Por lo que se estudió la posibilidad de desarrollar un proceso fermentativo de bajo costo, para la producción de enzimas pécticas a expensas de la degradación del desecho. *Aspergillus niger* CH₄ fue seleccionado entre varios microorganismo como productor de enzimas pécticas, bajo condiciones de fermentación en medio sólido. Los parámetros experimentales para el crecimiento del hongo y la producción de pectinasa, en fermentadores de 500 ml con 30 gramos de cáscaras (peso húmedo), fueron: tamaño de partícula 16 mesh, 30°C, pH 4.8 y 70 % de humedad. Los extractos brutos recuperados a las 48 horas por prensado (6 toneladas/ cm²) del cultivo sólido (medio + micelio), contiene una actividad pectinasa de 0,19 U/mg de proteínas. Se concluye que las cáscaras de cacao constituyen, sin necesidad de añadirles nutrientes, un sustrato adecuado para formular medios de cultivo para el crecimiento de *A. niger* y la producción de pectinasas en un sistema de fermentación sólido.

PALABRAS CLAVES: Enzimas pécticas, pectinasa, pectina, cacao.

ABSTRACT

During cocoa processing, cocoa ear shells are the most important by-product that is accumulated in large quantities in the places where they are processed. This by-product contains pectin, a polysaccharide easily assimilated by microorganisms, which is why we studied the possibility of developing a low cost fermentation process to produce pectic enzymes through the degradation of this by-product. *Aspergillus niger* CH₄ was selected among several other microorganisms as pectic enzyme producer under solid medium fermentation conditions. The experimental parameters for fungal growth and pectinase production, in 500 ml fermentators with 30 grams cocoa shells (wet weight) were: 16 mesh particle size, 30 °C, pH 4.8 and 70 % humidity. The crude extracts, recovered after 48 hours by pressing (6 tons/ cm²) solid cultures (bagase + mycelium), contain a 0.19 unit per milligram protein pectinase activity. We conclude that cocoa shells constitute, without need for more nutrients, an adequate substrate for formulating culture media for *A. niger* growth and pectinase production in a solid fermentation system.

KEY WORDS: Pectic enzymes, pectinase, pectin, cocoa.

INTRODUCCION

Las sustancias pécticas se definen como un grupo heterogéneo de polisacáridos complejos de naturaleza ácida, constituidos principalmente por una mezcla de tres polisacáridos: el ácido poligalacturónico, la poligalactosa y la poliarabinosa. La presencia de estas sustancias pécticas (fundamentalmente pectinas) 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. Para evitar este problema, las industrias dedicadas al procesamiento de jugos de frutas utilizan enzimas pectinolíticas. Bajo esta denominación se incluyen todas las enzimas cuyos sustratos naturales son sustancias pécticas (Serra *et al.*, 1992). Hoy en día estas enzimas son empleadas en la clarificación del vino y, más recientemente, en la fermentación del café (Antier *et al.*, 1993).

Las enzimas pectinolíticas se encuentran de manera natural en frutas y vegetales, pero también son producidas por microorganismos. Entre ellos se encuentran diferentes géneros de bacterias, levaduras y hongos filamen-

tosos de los cuales estos últimos son los que han recibido mayor atención. El sistema convencional para la producción de pectinasas es el cultivo sumergido (Voragen & Visser, 1998). Aunque se han desarrollado estudios para la producción de enzimas pécticas mediante fermentaciones en medio sólido (Trejo *et al.*, 1991; Iiianes, 1998).

Como medios de cultivo se han utilizado diferentes materiales de origen agrícola. Nosotros hemos seleccionado para este trabajo las cáscaras de las mazorcas de cacao, un desecho agrícola abundante en la región central de Venezuela. Este desecho posee un alto contenido de azúcares fermentables entre los cuales se encuentra la pectina (Adomako, 1974). Por tratarse de un material muy fibroso y contener compuestos antinutricionales, como la caféina y la teobromina se ha restringido su empleo en la alimentación animal (De Alba, 1971). El objetivo de este trabajo es encontrarle utilidad a este desecho empleando hongos capaces de sintetizar y excretar exoenzimas, pectinasas, en respuesta a condiciones ambientales impuestas para crecer, a esos microorganismos, a expensas de la pectina existente en las cáscaras de cacao.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos e Inóculos

Se utilizaron varios microorganismos, a los que se les determinó la capacidad de crecer y producir enzimas pécticas, en un sistema de fermentación en medio sólido consistente en cáscaras de cacao estériles (121°C, 1.1 Bar de presión, 1 hora), con una humedad del 70 %. La incubación se realizó a 30°C durante una semana y la actividad enzimática fue medida cualitativamente en los sobrenadantes de los extractos brutos obtenidos por prensado de los cultivos.

Los inóculos, consistentes en micelio, fueron obtenidos en medio M-200 con pectina en fermentaciones sumergidas realizadas a 30°C y 250 rpm. Los pellets de micelio fueron separados del medio, respectivamente, por filtración o centrifugación.

Medios de cultivo

Las cáscaras de cacao recolectadas en la Hacienda Experimental de FONAIAP-Mérida, fueron secadas en una estufa a 70°C y molidas hasta un tamaño de partícula no mayor de 16 mesh (Molino Thomas Wiley Mill, modelo 4 provisto de un tamiz). Posteriormente se tamizó (Tamizador U.S. Standard Sieves Series) para obtener partículas de diferentes tamaños. Se estudió la composición química de las cáscaras de cacao.

Procesos Fermentativos

Se utilizaron fermentadores LABFER – 1 (Guerrero y Sánchez, 1994), consistentes en frascos de vidrio de 500 ml, con tapa de rosca en la cual se le instaló un dispositivo de bronce en forma de cuello de cisne que permitió el intercambio de gases y evitó la contaminación. Se dispuso de una serie de estos fermentadores estériles (121°C, 1.1 Bar de presión, durante 1 hora) y cada uno de ellos fue llenado con 30 gramos de cáscaras previamente inoculadas con el hongo

Se estudiaron bajo condiciones aeróbicas diferentes parámetros experimentales relacionados con la producción de enzimas pécticas: tamaño de partícula (< 24 pero >32 mesh y 16 mesh), concentración de micelio (1,2 y 3 gramos de micelio seco por cada 100 gramo de sustrato seco), concentración de esporas (10⁵, 10⁶, 10⁷ y 10⁸ esporas por cada gramo de sustrato seco), tipo de inóculo (esporas, micelio sin preadaptar y micelio preadaptado), temperatura (20, 30 y 37°C), porcentaje de humedad (65, 70 y 70 %) y la influencia de la adición de sales (KH₂PO₄, urea y (NH₄)₂SO₄).

Tratamiento de las Muestras

Para la obtención de cinéticas de crecimiento y de producción de enzimas, se retiró diariamente un fermentador (LABFER-1) de cada serie durante el transcurso de cada fermentación. 20 gramos del contenido de cada uno de los fermentadores fueron mezclados, en una proporción 1:1, con agua destilada con 0,01 % de Tween 80. La suspensión del material fermentado se colocó en una tela de nylon y se prensó (prensa marca Schultz 15 toneladas/ cm²) aplicando una presión de 6 toneladas/ cm² obteniéndose, así, un extracto bruto y un bagazo residual.

Al extracto bruto se le determinó el pH y se centrifugó (Centrifuga Sorvall RC – 5B) a 4 – 6°C y 10.000 g durante 6 minutos. El sobrenadante, libre de partículas en suspensión (que denominamos M-S), fue caracterizado para su contenido en enzimas pectinolíticas, proteínas solubles (Lowry, 1951) y azúcares reductores (Chaplin y Kennedy, 1987).

Medida de la Actividad Pectinasa

a.– Cuantitativa:

Se determinó mediante la valoración espectrofotométrica, según el método de Miller, de los extremos reductores generados en la hidrólisis enzimática (Ros *et*

al., 1992). Para el dosaje de la actividad se colocaron 0,5 ml del M-S con 0,34 ml de una solución de pectina cítrica (Sigma) al 0,5 % en buffer acetato de sodio/ácido acético 50 mM (pH 5,6). La incubación se realizó a 37 °C durante 20 minutos. De esta mezcla se tomaron 0,1 ml a los que se le añadieron 0,2 ml de agua destilada y 3 ml del reactivo de Miller y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. El color desarrollado por los azúcares liberados se detectó a 570 nm y se cuantificó su concentración mediante una curva estándar de ácido D-galacturónico monohidratado (Sigma) en un rango de 0,05 – 5 µg/µl.

Una unidad de actividad pectinasa fue definida como la cantidad de enzima que libera un micromol de extremo reductor (ácido D-galacturónico) por mililitro por minuto bajo las condiciones descritas. Para todos los efectos de este trabajo, consideramos que las actividades enzimáticas que medimos representan la producción de la o las enzimas pectinolíticas excretadas al medio por el hongo. La producción de las enzimas no fue determinadas directamente.

b.– Cualitativa:

Este método fue utilizado para seleccionar el microorganismo productor de enzimas pécticas. Se realizó por el método de Antier *et al.* (1993), con ciertas modificaciones. El medio en este caso contiene agua, pectina cítrica (Sigma) a una concentración de 2 g/l y agar.

En el agar de cada placa de Petri se abrieron pequeños pozos (tamaño estándar) donde se colocaron 30 µl de la muestra. En cada placa se colocó igual cantidad, para un control, de enzima poligalacturonidasa Sigma E.C. 3.2.1.15 proveniente de un extracto enzimático producido por el hongo *A. niger*. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 20 horas. Transcurrido este tiempo fueron inundadas con una solución acuosa al 1 % de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) y se observó la presencia o ausencia de halos de hidrólisis.

Se realizaron ensayos con este mismo método con los extractos inactivados para comprobar la efectividad del método de inactivación de las pectinasas en los extractos y/o sobrenadantes (M-S) necesarios para determinación de la actividad cuantitativa.

RESULTADOS Y DISCUSION

Selección del microorganismo

En la tabla 1 se muestran los resultados del estudio cualitativo relacionado con la capacidad de varios microorganismos para crecer y producir enzimas pécticas extracelulares. Todos fueron desarrollados sobre las cáscaras de cacao en un sistema de fermentación en medio sólido. Tanto *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 como *Aspergillus niger* CH₄ UAM-1 crecen abundantemente a los 15 y 2 días (respectivamente) y producen alta actividad pectinolítica. Se seleccionó *A. niger* CH₄ UAM-1, por obtener con este microorganismo resultados reproducibles y en el menor tiempo.

caras de cacao en un sistema de fermentación en medio sólido. Tanto *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 como *Aspergillus niger* CH₄ UAM-1 crecen abundantemente a los 15 y 2 días (respectivamente) y producen alta actividad pectinolítica. Se seleccionó *A. niger* CH₄ UAM-1, por obtener con este microorganismo resultados reproducibles y en el menor tiempo.

TABLA 1. Selección de microorganismos de crecer sobre cáscaras de cacao y producir enzimas pécticas en un sistema de FMS

MICROORGANISMO	CRECIMIENTO	HALO DE HIDROLISIS
Hongo color crema, sin identificar*	Bueno	+
Levadura color crema, sin identificar*	Sin crecimiento	-
Hongo verde, sin identificar*	Bueno	+
Hongo marrón, sin identificar*	Bueno	++
Levadura blanca, sin identificar*	Pobre	-
Hongo blanco, sin identificar*	Sin crecimiento	-
<i>Kluyveromyces fragilis</i> ATCC 8554■	Pobre	+
<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC 32783■	Bueno	+++
<i>Penicillium roquefortii</i> ATCC 6987■	Sin crecimiento	-
<i>Aspergillus niger</i> CH ₄ UAM-I■	Bueno	+++

* Microorganismos aislados de frutos de cacao fermentado naturalmente. Todo los ■microorganismos pertenecen al cepario del Laboratorio de Fermentaciones, Las cruces representan el diámetro de los halos de hidrólisis.

Composición Bioquímica de las Cáscaras

En la tabla 2 se muestran los componentes más representativos y su abundancia porcentual en el desecho. Concluimos que se trata de un material de elevada calidad nutricional para el desarrollo de microorganismos. Nuestros resultados son comparables con los reportados por Adomako (1974).

Tabla 2. Composición de las cáscaras de cacao.

COMPOSICIÓN	CONTENIDO (%)
Humedad	8.87
Materia seca	91.13
Proteína Cruda (N x 6.25)	6.90
Grasa Cruda	1.02
Fibra Cruda	27.83
Cenizas	8.55
Extracto libre de Nitrógeno.	47.01
Cafeína	0.013
Teobromina	0.32

Las cáscaras fueron previamente secadas. Las determinaciones se realizaron bajo las normas COVENIN y los resultados son el promedio de dos replicas.

Tabla 3. Parámetros experimentales para la producción de ectininas por *Aspergillus niger* CH₄ en su sistema de FMS sobre cáscaras de cacao.

PARÁMETROS	UNIDAD/AES	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
Tamaño de Partícula		
16 mesh	U/mg de proteínas.	0.05*
24 – 32 mesh	6 días	0.02
Humedad		
65 %	U/mg de proteínas.	
70 %	2 días	0.14
75 %		0.18*
		0.14
Concentración de micelio		
1 %	U/mg de proteínas.	0.03
2 %	2 días	0.075
3 %		0.17*
Concentración de esporas		
10 ⁵ esporas/g sustrato seco		0.05
10 ⁶ esporas/g sustrato seco	U/mg de proteínas.	0.17
10 ⁷ esporas/g sustrato seco	7 días	0.27*
10 ⁸ esporas/g sustrato seco		0.17
Temperatura		
20 °C	U/mg de proteínas.	0.01
30 °C	2 días	0.16*
37 °C		0.01
Sales		
		0.01
KH ₂ PO ₄	U/mg de proteínas.	0.05
Urea+ (NH ₄) ₂ SO ₄ + KH ₂ PO ₄	2 días	0.18*
Control sin sales		

*Condiciones experimentales óptimas

Efectos de los Diferentes Parámetros

En la tabla 3 se pueden observar los resultados del efecto de los diferentes parámetros sobre la Capacidad de *Aspergillus niger* para crecer y sintetizar pectinasas sobre cáscaras de cacao por fermentación en medio sólido.

a) Tamaño de Partícula: se seleccionaron 2 tamaños de partícula: <24 pero >32 mesh y 16 mesh. Con ambas se puede lograr el 70 % de humedad sin formar masas compactas que impidan la aireación y el crecimiento del hongo. Utilizando micelio, sin preadaptar, como inóculo al sexto día se obtiene la máxima actividad pectinasa. Para las partículas de 16 mesh fue de 0.051 U/mg de proteínas, mientras que para las <24 pero > 32 mesh fue de 0.026 U/mg de proteínas. Por ello utilizamos el tamaño de 16 mesh para las experiencias que siguen.

b) Porcentaje de humedad: con un 70 % de humedad la máxima actividad (0.18 U/mg de proteínas) se logra al segundo día de incubación y se mantiene durante 72 horas. Mientras que con el 65 y el 75 % de humedad la actividad es 20 veces menor en el mismo tiempo y los valores varían con el tiempo, por lo que decidimos seleccionar el 70 %.

c) Concentración de Micelio: la máxima actividad pectinasa para el cultivo con micelio sin adaptar (0.051 U/mg de proteínas) se obtuvo al sexto día, mientras que para el cultivo adaptado la máxima actividad (0.12 U/mg de proteínas) se logra al tercer día. Con 3 % de micelio se alcanza la producción máxima de actividad enzimática (0.18 U/mg de proteínas) a las 48 horas. Esta actividad se mantiene casi constante durante los primeros tres días y luego disminuye. Para concentraciones de 1 y 2 % de micelio, en el inóculo se obtiene la actividad enzimática máxima a las 120 y 72 horas, respectivamente. Estos ensayos se iniciaron con cierta actividad pectinolítica en las muestras retiradas inmediatamente después de la inoculación (tiempo cero). Esto se debe a que el inóculo consistió en micelio obtenido propagando el hongo en un medio sólido con pectina para disminuir el tiempo de adaptación sobre las cáscaras de cacao. Se seleccionó para futuras experiencias 3% como la concentración más adecuada para los inóculos.

d) Concentración de Esporas: en las fermentaciones en medio sólido (FMS) la inoculación con esporas se prefiere a la utilización de micelio, entre otras cosas por ser las esporas rígidas y resistentes en contraposición a la fragilidad del micelio. Decidimos así, estudiar la producción de pectinasas, en nuestro sistema de FMS con las cáscaras de cacao, inoculando con diferentes concentraciones de esporas entre 10⁵ y 10⁸ esporas/ml. La máxima actividad pectinasa (0,27 U/mg de proteínas) se obtuvo a las 168 horas de incubación con inóculos de 10⁷ esporas/ml. Es-

tos resultados coinciden con los reportados por algunos autores (Antier *et al*, 1993; Trejo *et al*, 1991; Voragen & Visser, 1998). para la producción de pectinasas con *A. niger* CH₄ en FMS utilizando como sustrato pulpa de café y bagacillo de caña. Como hemos visto, cuando se utiliza micelio preadaptado (3 % p/p), se alcanza el máximo de producción de la actividad pectinasa a las 48 horas pero la producción es 44 % menor que con esporas. No obstante, la diferencia en la cantidad de enzima producida con esporas no compensa el tiempo requerido para obtenerla. Decidimos, así utilizar 3 % (p/p) de micelio para futuras experiencias.

e) Temperatura: a 30°C y 48 horas se logra la temperatura óptima de producción de enzimas bajo nuestras condiciones. Para temperaturas de 32 y 37°C se retarda esa producción después de 96 horas. Seleccionamos, así, 30°C para futuras experiencias. Esta temperatura ha sido reportada como óptima para el crecimiento de este hongo en FMS sobre pulpa de café (Antier *et al*, 1993) y bagacillo de caña (Trejo *et al*, 1991).

f) Adición de Sales al Sustrato: algunos autores (Antier *et al*, 1993; Pericin *et al*, 1992; Trejo *et al*, 1991; Iianes, 1998) coinciden en afirmar que la producción de enzimas pécticas es favorecida por la adición de KH₂PO₄, urea, sulfato de amonio y una mezcla de las 3 sales. Nuestros resultados no muestran incrementos significativos en comparación con el control. Pareciera incluso que retardan la producción de las enzimas.

CONCLUSIONES

1. De varios microorganismos ensayados, *Aspergillus niger* CH₄ fue el microorganismo que mejor se desarrolló sobre bagazo de cáscaras de cacao y mostró mayor capacidad para degradar pectina, por lo cual fue seleccionado para las experiencias realizadas en este trabajo.
2. El bagazo de las cáscaras de cacao constituyen, sin necesidad de añadirles nutrientes, un sustrato adecuado para formular medios de cultivo donde crecer hongos en un sistema de fermentación en medio sólido.

3. En un sistema de fermentación en medio sólido a escala de laboratorio, las condiciones óptimas para el crecimiento de *Aspergillus niger* y la producción de la actividad pectinolítica, fueron las siguientes: pH inicial 4.8, temperatura 30°C, 3 gramos de micelio (peso seco) preadaptado/ 100 gramos de sustrato seco y 70 % de humedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ADOMAKO, D 1974. Chemical characterization of cocoa pectin. *Chemistry and Industry*, 2: 873 – 874.
- ANTIER, P. MUJARES, A., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M. Y VINIEGRA, G. 1993. Pectinase-hiperproducing mutant for solid-state fermentation of coffee. *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 254 – 260.
- De Alba, J. 1971. Alimentación del ganado en América Latina. De Fournier. México. 263 – 264 pp.
- GUERRERO, B. Y SÁNCHEZ C., J. 1994. Producción de biomasa de *Pleurotus ostreatus* en un Fermentador Modular Estático. *Acta Científica Venezolana* 45: 29 (abst.)
- IIIANES A. 1998. Biotecnología de enzimas. Ediciones Universitarias. Universidad Católica de Valparaíso.
- PERICIN, P., JARAK, M., VUJICIC, B Y KEVRESAN, S. 1992. Effect of inorganic phosphate on the secretion of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 14: 275 – 278.
- Ros, J. M.; Saura, D.; Coll, L. Y Lacina, J. 1992. Métodos analíticos avanzados para la determinación de sustancias pécticas y actividades enzimáticas pectinolíticas. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. 8:127–134.
- SERRA, J., ALKORTA, Y., LLAMA, M. 1992. Aplicación industrial de las enzimas pécticas. *Alimentación, Equipo y Tecnología*, 8: 127 – 134.
- TREJO, M. R.; ORIOL, E.; LÓPEZ, A.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA, G. Y RAIMBAULT, M. 1991. Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. *Micol. Neotrop. Apl.* 4: 49 – 62.
- VORAGEN, A. G. Y VISSER J. 1998. Pectines and pectinases progress in biotechnology. Hardcover Elsevier Science. Volumen 14