

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PÉCTICAS A ESCALA PILOTO

SORANA YEGRES*, JOSÉ SÁNCHEZ**, MARIO BELMAR*, WALLIS RIVEROS* Y DANIEL BELMAR***.

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

Laboratorio de Fermentaciones. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. *Laboratorio Clínico Universitario. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.

RESUMEN: *Aspergillus niger* CH₄ ha sido utilizado como un microorganismo productor de enzimas pectinolíticas, en fermentadores de 500 ml con 30 gramos (peso húmedo) de cáscaras de cacao, lográndose optimizar los parámetros experimentales para el crecimiento del hongo y la producción de las enzimas a expensas de la degradación del material. Se estudió la posibilidad de incrementar la escala del proceso, empleando un Fermentador Modular Estático de Columna, con 500 gramos (peso húmedo) de cáscaras de cacao. En este fermentador simultáneamente se logró oxigenar al sustrato, regular la temperatura y mantener constante la humedad, mediante la inyección forzada de aire humedecido. Una vez terminada la fermentación, el cultivo (medio + micelio) fue prensado (6 toneladas/ cm²), obteniéndose un extracto al cual se le determinó la actividad enzimática, contenido de proteínas y de azúcares reductores. Los extractos brutos recuperados a las 24 horas, del Fermentador Modular Estático, contenían una actividad pectinasa de 0,20 unidades por miligramo de proteínas. Esta actividad es similar a la obtenida en los Fermentadores de 500 ml a las 48 horas, por lo que se concluye que los parámetros optimizados a menor escala se extrapolaron con éxito y que en el proceso de escalamiento se logró mejorar la productividad.

PALABRAS CLAVES: Enzimas Pécticas, Pectinasa, Pectina.

ABSTRACT: The microorganism *Aspergillus niger* CH₄, has been used as a producer of pectinolytic enzymes in 500 ml fermenters with 30 grams (wet weight) of cocoa shells, and it was possible to improve the experimental parameters for fungal growth and enzyme production at the cost of a degradation of the material. We studied the possibility of increasing the scale of the process, using a Modular Static Column Fermentator with 500 grams of cocoa shells (wet weight). In this fermentator, we also oxygenated the substrate, regulated the temperature and maintained constant humidity through forced injection of humid air. Once fermentation was completed, the culture (medium + mycelium) was pressed (6 tons/ cm²), and we obtained an extract in which we determined the enzymatic activity and the contents of proteins and reducing sugars. The raw extracts, recuperated from the Modular Static Column Fermentator after 24 hours, contained a pectinase activity of 0.20 units per milligram of protein, similar to the activity obtained in 500 ml fermenters after 48 hours. We therefore conclude that the improved parameters were successfully extrapolated on a higher scale, with a consequent improvement in productivity.

KEY WORDS: Pectic Enzymes, Pectinase, Pectin.

INTRODUCCION

Hoy en día, ya han sido desarrolladas tecnologías conducentes a lograr el aprovechamiento y degradación de desechos agrícolas mediante procesos fermentativos de bajo costo y alto rendimiento, que generen productos como las pectinasas, de amplia aplicación en la industria nacional (Yegres y Sánchez, 1995; Trejo *et al.*, 1991).

De los microorganismos que han sido ensayados en sistemas de fermentación en medio sólido (FMS) sobre las cáscaras de cacao, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* CH₄ fueron los mejores productores de enzimas pécticas. *A. niger* CH₄ ha mostrado mejor crecimiento sobre las cáscaras de cacao, por lo que ha sido preferido. En un sistema de FMS a escala de laboratorio, las condiciones óptimas para el crecimiento de este hongo y la producción de la

actividad pectinolítica, fueron las siguientes: pH inicial 4.8, temperatura 30 °C, 9 gramos de cáscaras de cacao molidas hasta un tamaño de partícula de 16 mesh y humedecidas hasta un 70 % e inoculadas con 3 gramos de micelio preadaptado por cada 100 gramos de sustrato seco (Yegres y Sánchez, 1995).

El propósito de este trabajo fue comprobar si sería factible llevar uno de estos procesos a una escala mayor para poder ser aplicado por la industria, en caso de que esta se interese en abastecer su propia demanda.

MATERIALES Y METODOS

Para las fermentaciones se utilizarán inóculos de micelio obtenido al crecer el hongo en un medio líquido con pectina como fuente única de carbono (micelio preadaptado). Se realizaron dos fermentaciones (ambas por duplicado) a diferentes escalas

Recibido: Julio 1999. aprobado: Abril 2000.

Para la escala de laboratorio (nivel de mesón) 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 permite el intercambio de gases y evitó la contaminación. En general, se dispuso de una serie de estos fermentadores y cada uno de ellos fue llenado con 30 gramos de cáscaras previamente inoculadas.

Para la escala piloto se utilizó un Fermentador Modular Estático de Columnas, FMEC (Guerrero y Sánchez, 1995). Este consiste en varios módulos de plástico en forma tubular de 16 cm de diámetro por 18 cm de altura. La base de cada módulo está constituida por una malla de plástico que permite sostener el sustrato y facilitar el paso del aire húmedo a través del bagazo a fermentar. Los módulos se disponen verticalmente uno sobre otro y cada tres de ellos conforman un sistema aislado conectado a un dispositivo de entrada de aire por la parte inferior. En cada módulo se colocaron aproximadamente 500 gramos de cáscaras de cacao molidas (16 mesh) con una humedad de 70 % previamente inoculadas con 3 gramos (peso seco) de inóculo del hongo por cada 100 gramos de cáscaras de cacao seco.

En ambas fermentaciones la temperatura fue 30 °C y en el caso de la FMS a escala piloto el flujo de aire fue de 1 litro por minuto por kilogramo de material húmedo.

Tratamiento de las Muestras.

Para la obtención de cinéticas de crecimiento y de producción de enzimas, se retiró diariamente un fermentador de cada serie (LABFER-1 y FMEC) durante el transcurso de cada fermentación. Del contenido de cada uno de los fermentadores, se tomo una muestra, 20 y 300 gramos, respectivamente, las cuales fueron mezcladas, en una proporción 1:1, con agua destilada conteniendo 0,01 % de Tween 80. En ambos casos la suspensión del material fermentado se colocó en una tela de nylon y se prensó aplicando una presión de 6 toneladas/ cm² obteniéndose, de esta forma un extracto bruto y un bagazo residual.

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

Medida de la Actividad Pectinasa.

Se determinó espectrofotométricamente por los extremos reductores generados en la hidrólisis enzimática, mediante el método de Miller (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 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 tomó una alícuota de 0,1 ml a la cual se le añadió 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 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 determinada directamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Fermentación a Escala de Laboratorio.

Este ensayo muestra el comportamiento de *A. niger* CH₄ en la producción de las enzimas pécicas, en el sistema de fermentación de frascos de 500 ml. La fermentación fue seguida durante 6 días, tomando muestras cada 12 horas (hasta las 96 horas). En la figura 1 se observa que la máxima producción enzimática, de 0,19 U/ mg de proteínas, se alcanza a las 48 horas de iniciado el proceso y, posteriormente, disminuye

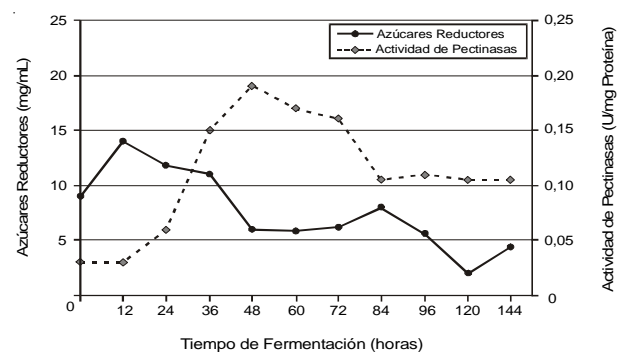


Figura 1. Mediciones periódicas de la actividad de pectinasa y de azúcares reductores en los Fermentadores LABFER-1.

Una vez obtenido el máximo de producción de las enzimas, los azúcares experimentan un leve aumento a las 84 horas y disminuyen nuevamente al final del proceso (Figura 1). De estos resultados podrían considerarse dos aspectos importantes. Por una parte, el comportamiento

observado sería la consecuencia de un efecto diáxico, donde el hongo primero consume los azúcares solubles que se encuentran en el medio y, una vez que comienzan a agotarse, se activa la maquinaria enzimática para producir así enzimas pécticas. Estas hidrolizarían los polisacáridos a azúcares más pequeños (mono y disacáridos) de fácil asimilación.

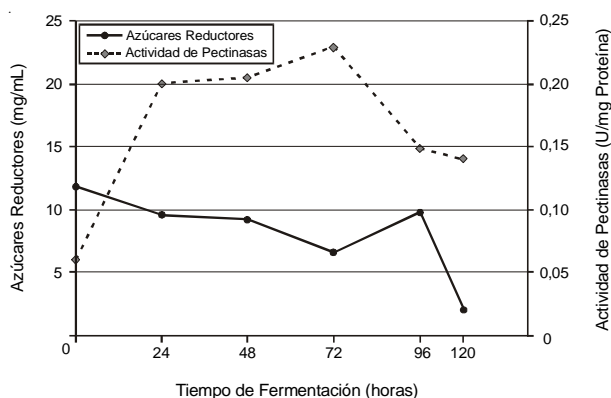


Figura 2. Mediciones periódicas de la actividad de pectinasa y de azúcares reductores en los fermentadores modulares estáticos de columna.

La actividad pectinasa aparece aproximadamente a las 24 horas y continúa en aumento hasta las 48 horas. Este tiempo corresponde a la desaparición progresiva de los azúcares reductores en el medio. A partir de las 48 horas el contenido de enzimas disminuye probablemente debido a que la degradación de los polisacáridos ejerce un efecto de represión catabólica sobre la biosíntesis de las enzimas. Este fenómeno también ha sido reportado por Trejo *et al.* (1991) al estudiar el efecto de la relación pectina/sacarosa en el medio de cultivo para la producción de pectinasas con *A. niger* crecido sobre bagacillo de caña. El contenido de proteínas en el extracto se mantuvo relativamente constante.

Fermentación a Escala Piloto.

La máxima producción de actividad pectinasa 0,23 U/mg de proteínas se obtuvo a las 72 horas de iniciado el cultivo (Figura 2), disminuyendo luego en las horas siguientes hasta el final del proceso. Este comportamiento también fue observado en la FMS a escala de laboratorio.

Pareciera que al escalar el proceso el tiempo de máxima producción de las enzimas se ve afectado. No obstante, se observa a las 48 horas, tiempo de máxima producción en el ensayo a escala de laboratorio (Figura 1), se obtiene una actividad enzimática de 0,19 U/mg de proteínas y en este ensayo a las 24 horas se logra una producción similar (0,20 U/mg de proteínas).

Por lo tanto, se puede concluir que en el proceso de escalamiento se logró mejorar la productividad y los parámetros utilizados a menor escala se extrapolaron con éxito.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CHAPLIN, M.F. & KENNEDY, J.F. 1987. Carbohydrate analysis. IRL Press, England. 45pp.
- GUERRERO, B. & SÁNCHEZ C., J. 1994. Producción de biomasa de *Pleurotus ostreatus* en un Fermentador Modular Estático. Acta Científica Venezolana 45: 29 (abst.)
- . 1995. Un nuevo Fermentador Modular Estático de Columnas para la fermentación en medio sólido. Acta Científica Venezolana 46: 42 (abst.)
- LOWRY, O.H.; RESEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265–275.
- ROS, J. M.; SAURA, D.; COLL, L. & LAENCINA, J. 1992. Métodos analíticos avanzado para la determinación de sustancias pécticas y actividades enzimáticas pectinolíticas. Alimentación, Equipos y Tecnología. 8:127–134.
- TREJO, M. R.; ORIOL, E.; LÓPEZ, A.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA, G. & RIMBAULT, M. 1991. Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. Micol. Neotrop. Apl. 4: 49–62.
- YEGRES, S. & SÁNCHEZ, J. 1995. Producción de enzimas pécticas y enriquecimiento proteico de las cáscaras de cacao por fermentación en medio sólido. Acta Científica Venezolana. 46:42 (abst.)