

Producción de enzimas pectinolíticas por fermentación: Eficacia del método de producción y *downstream*

Production of pectinolytic enzymes by fermentation: Effectiveness of the production method and downstream

María Carolina Martín^{1,2}, Vilma Inés Morata de Ambrosini^{1,2}.

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO. 2. CONICET.

mcmartin@fcai.uncu.edu.ar

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el método de producción enzimática y *downstream* a partir de *Bacillus* sp. CH15 pectinolítico, para la obtención de una preparación enzimática con potencial aplicación en la industria vitivinícola. Los métodos de producción incluyeron: i) cultivos estáticos, utilizando frascos de 1 L de capacidad incubados en condiciones controladas, y ii) biorreactor semiautomático de laboratorio. Los mejores resultados fueron obtenidos para el cultivo desarrollado en el biorreactor, alcanzándose una biomasa significativamente mayor y una rápida producción de enzimas pectinolíticas. La concentración enzimática se llevó a cabo con un evaporador rotativo a presión reducida, y como parte del proceso de *downstream* se utilizó la ultrafiltración, a través de un filtro tangencial con membranas de *cut-off* de 10 KDa. En este sentido, la ultrafiltración no permitió alcanzar una adecuada purificación de las enzimas de interés, debido a que se observaron grandes pérdidas de la actividad enzimática durante el proceso. Sin embargo, mediante la concentración se obtuvo un producto con un 40% más de actividad enzimática respecto a la inicial, el cual resultaría apropiado para su potencial aplicación en la maceración y clarificación de mostos y vinos.

Palabras clave: Producción Enzimática, Pectinasas, "Fermentación Sumergida", Purificación.

Abstract

The aim of this work was to evaluate enzymatic production and downstream methods from *Bacillus* sp. CH15 pectinolytic, for the enzyme preparation with potential application in winemaking. The production methods included: i) static cultures, using flasks of 1 L capacity incubated under controlled conditions; ii) semi-automatic laboratory bioreactor. The best results were obtained for the bioreactor culture, reaching a significantly higher biomass and rapid production of pectinolytic enzymes. Enzymatic concentration was carried out with a rotary evaporator under reduced pressure, and ultrafiltration was used as part of the downstream process, through a tangential filter with 10 KDa cut-off membranes. In this sense, ultrafiltration did not achieve suitable purification of the enzymes of interest, because large losses of enzymatic activity were observed during the process. Nevertheless, a product with 40% more enzymatic activity than the initial one was obtained by concentration, which would be appropriate for its potential application in the maceration and clarification of musts and wines.

Keywords: Enzymatic Production, Pectinases, "Submerged Fermentation", Purification.

1. Introducción

Las enzimas pectinolíticas o pectinasas son polisacaridasas que degradan la pectina presente en la lamela media y pared celular primaria de las células vegetales. Esta capacidad es ampliamente utilizada en la elaboración de vinos ya que las pectinasas pueden ayudar a mejorar la clarificación y filtrabilidad de los vinos, y aumentar el rendimiento en mosto así como la extracción de compuestos polifenólicos y de color atrapados en los hollejos (Martín y Morata de Ambrosini, 2014).

En enología, las preparaciones enzimáticas son producidas por algunas cepas de microorganismos, principalmente hongos, no modificados genéticamente, y contienen numerosas actividades enzimáticas, predominando una de ellas. Las cepas normalmente utilizadas son *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum*, debido a la facilidad para

obtener pectinasas y glucanasas, respectivamente, de estos hongos. Estas cepas son reconocidas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) y su uso está aceptado por la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino).

La producción de pectinasas, a partir de cepas fúngicas o bacterianas, puede llevarse a cabo tanto por fermentación sumergida (FSum), como por fermentación en sustrato sólido (FSS) (Pedroni *et al.*, 2009). Un proceso industrial típico de producción enzimática es la FSum, la cual implica un cultivo líquido del microorganismo productor de la enzima, normalmente en condiciones aeróbicas, desarrollado en un biorreactor agitado. Por su parte, en la FSS se hace uso de un medio simple, consistiendo normalmente en un producto de la agricultura no refinado, el cual le provee al microorganismo un medio soporte para inmovilizarlo y todos los nutrientes necesarios para

el crecimiento microbiano. Los sustratos más empleados son los subproductos agro industriales, tales como bagazo de caña de azúcar, salvado de trigo, bagazo de manzana y cítricos, pulpa de café, orujo de uva agotado, etc. Éstos, generalmente, se utilizan en combinación y/o complementados con fuentes de carbono y energía fácilmente metabolizables (melazas, maltodextrinas, polisacáridos, etc.) y otros nutrientes (sales de calcio, urea, fosfatos, etc.). Sin embargo, la recuperación de las enzimas y purificación en este método resulta más difícil y costosa, además de requerir mayores tiempos de fermentación (Uzuner y Cekmecelioglu, 2015). Por otro lado, la Fsum es más fácil de controlar a mayor escala y ha sido exitosamente usada para la producción de distintos metabolitos desde la década del 40. Particularmente, la producción de pectinasas a partir de distintas especies de *Bacillus* por FSum ha sido reportado exitosamente por muchos autores (Sharma y Satyanarayana, 2006; Ahlawat *et al.*, 2009; Joshi *et al.*, 2013).

La Figura 1 muestra el *flowchart* del proceso de fermentación (Fsum) y *downstream* de una preparación enzimática de origen microbiano. El proceso de *downstream* comprende los pasos de aislamiento de la enzima y de purificación y formulación de la preparación enzimática. Este es un paso muy importante en biotecnología debido a los costos de recuperación, concentración y purificación del producto final. Una alta concentración de la enzima en el sobrenadante o dentro de la célula y una eficiente purificación son aspectos relevantes en la manufactura de enzimas para uso industrial (Werner *et al.*, 2002). Para lograr una purificación completa de las enzimas se utilizan técnicas analíticas como la filtración en gel o cromatografía de exclusión en gel, en la cual las enzimas, y otras macromoléculas, se pueden separar por su tamaño. A partir de las enzimas purificadas, se puede realizar un estudio profundo de caracterización enzimática, como los mecanismos de degradación del sustrato, condiciones de actividad óptimas y mecanismos de regulación de síntesis de la enzima (Pedroni *et al.*, 2009).

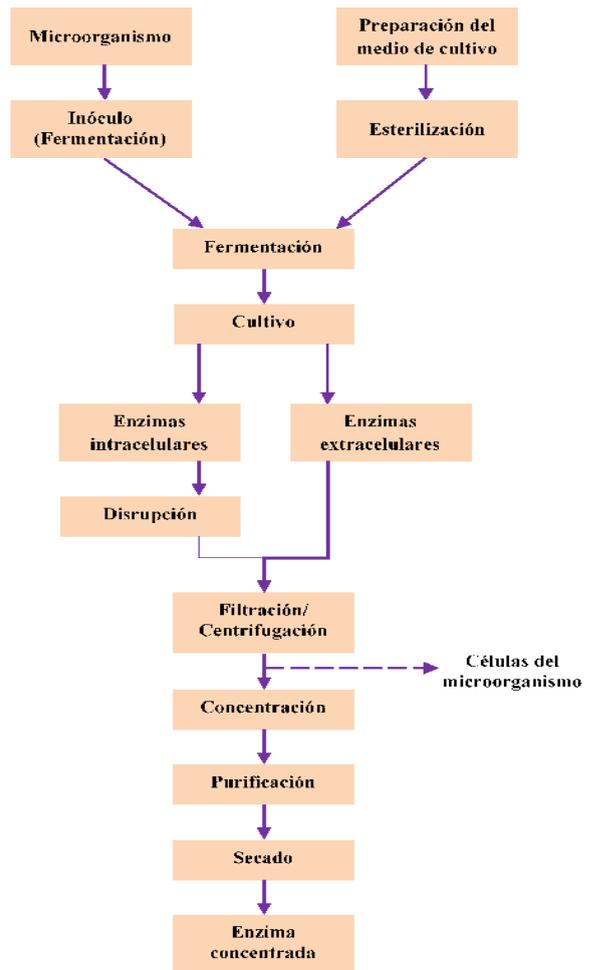


Figura 1. Flowchart del proceso de fermentación y downstream de una preparación enzimática.

Fuente: Modificado de *Collection of Information on Enzymes* (Werner *et al.*, 2002).

El grado de pureza de las enzimas comerciales varía desde muy poco purificadas (extractos enzimáticos crudos) a enzimas altamente purificadas, y depende de su aplicación industrial. Con frecuencia, algunas enzimas pueden ser purificadas cientos de veces pero el rendimiento de la producción enzimática puede ser muy pobre, hasta un 10% de la actividad del material de partida. Por el contrario, a nivel industrial, las enzimas deben ser purificadas lo menos posible, solamente otras enzimas o compuestos interferentes en la actividad catalítica de la enzima en estudio deben ser removidos. Debe evitarse una purificación innecesaria ya que etapas adicionales son costosas en términos de equipamiento, manufactura y, en especial, pérdida de actividad enzimática. Como resultado, algunas preparaciones de enzimas comerciales consisten esencialmente del caldo de fermentación concentrado, acompañado de aditivos que garantizan la estabilización y actividad catalítica de la enzima. Sin embargo, el contenido de la enzima requerida en una preparación debe ser lo más alto posible (por ej.

un 10% p/p de las proteínas) para facilitar los pasos del proceso de *downstream*. Esto puede alcanzarse optimizando las condiciones de cultivo de la cepa, o a menudo drásticamente, por ingeniería genética, sobreexpresando la actividad enzimática en cuestión.

El **objetivo** del presente trabajo fue evaluar diferentes métodos de producción enzimática y procesos de *downstream* o purificación parcial, a partir de cultivos de una cepa bacteriana productora de enzimas pectinolíticas, para la obtención de una preparación enzimática a escala piloto o industrial con potencial uso en la industria vitivinícola.

2. Materiales y métodos

2.1. Microorganismo:

Como microorganismo productor de enzimas pectinolíticas (pectinasas) se utilizó la cepa *Bacillus* sp. CH15, la cual fue previamente aislada desde la superficie de uvas para vinificación provenientes de la región vitivinícola San Rafael, Mendoza, Argentina (Cabeza *et al.*, 2011). Dicha cepa fue estudiada y seleccionada por su capacidad de producir pectinasas extracelulares ácidas y “activas en frío (Martín y Morata de Ambrosini, 2013). Además, el efecto de dicha preparación enzimática sobre la extracción y evolución del color de vinos Malbec fue oportunamente estudiado, mediante ensayos de microvinificaciones llevados a cabo a bajas temperaturas de maceración (Martín y Morata de Ambrosini, 2014).

2.2. Producción enzimática:

Para la producción de las enzimas pectinolíticas, así como también primeramente para la producción del inóculo, se utilizó el medio de cultivo líquido diseñado y optimizado por Kobayashi *et al.* (2001), con algunas modificaciones, conteniendo pectina cítrica (60% de metilación) como principal fuente de carbono. La composición del mismo se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Kobayashi *et al.* (2001) parcialmente modificado.

Componentes	Composición (g/L)
Pectina cítrica (60% metilación)	5
Peptona de carne	2,5
Peptona de soja	2,5
Extracto de levadura	5
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ ·6H ₂ O	0,05
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,05
Aqua (c.s.p.)	1L
Agar pH = 5	15

La fermentación se llevó a cabo en dos sistemas de producción diferentes: a) en frascos de cultivos de 1 L de capacidad conteniendo 800 mL de caldo, incubados a 30°C por un período de 72 h, sin agitación (lotes 1 y 2), y b) en un biorreactor SGI SET002M (Setric Genie Industriel, Toulouse, Francia) conteniendo 1 L de caldo de cultivo, con control automático de temperatura a 30°C, mantenido durante 24 h con aireación intermedia (lote 3) (Figura 2). El inóculo fue al 2%, tratándose de un cultivo activo con DO (560 nm) no menor de 0,600.

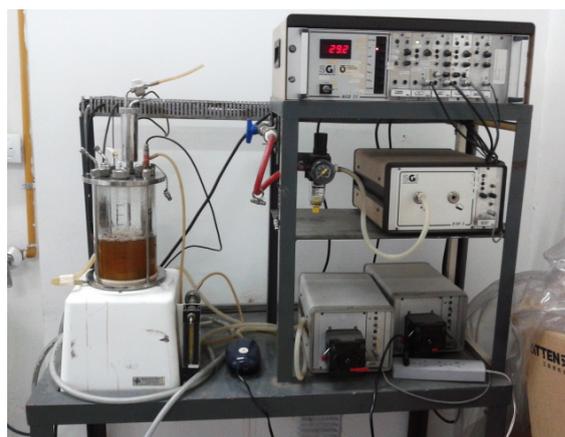


Figura 2. Biorreactor SGI SET002M (Setric Genie Industriel, Toulouse, Francia)

2.3. Recuperación de la enzima en estudio:

A partir de los cultivos celulares se procedió a la recuperación de las enzimas de interés. Por tratarse de enzimas extracelulares, directamente se procedió a eliminar los microorganismos y recuperar el sobrenadante libre de células (SLC), al cual se lo llamó SLC crudo. Las células fueron removidas, en primer lugar, por centrifugación (15 min a 3000 x g), y seguidamente por filtración, utilizando un filtro vertical a vacío con membranas de poro de 0,45 µm.

2.4. Purificación parcial y concentración:

Los SLC crudos fueron sometidos, por un lado, directamente a concentración (lote 1), y por otro, a purificación parcial y concentración por ultrafiltración (lotes 2 y 3). Para la concentración directa se utilizó un evaporador rotativo a presión reducida (Rotavapor Fbr® Decalab S.R.L., MERCOSUR) bajo las siguientes condiciones: 40±2 °C, vacío de 90 KPa, baja agitación (4-8 rpm), 180 min (Figura 3). Mientras que para la ultrafiltración se utilizó el equipo piloto de filtración tangencial HI-FLOW (Setric Genie Industriel, Toulouse, Francia), acoplado con módulos de filtración de *cut-off* de 10 KDa (SGI 30 UFIB1/S18/10KD)

(Figura 4). Dicha filtración se llevó a cabo en condiciones de refrigeración, con una presión de 0,5 bar, durante 30-40 min.



Figura 3. Evaporador rotativo a presión reducida (Rotavapor Fbr® Decalab S.R.L., MERCOSUR).

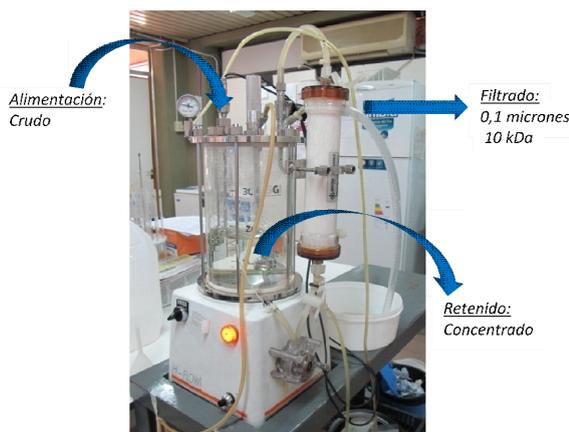


Figura 4. Sistema piloto de ultrafiltración tangencial HI-FLOW (Setric Genie Industriel, Toulouse, Francia).

2.5. Ensayo de actividad enzimática

La actividad pectinolítica se cuantificó mediante la liberación de azúcares reductores desde una dispersión de pectina (0,25% de pectina en buffer acético/acetato 50 mM, pH 4,0) usando el reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) y ácido galacturónico como estándar. La relación enzima:sustrato fue 1:10 (v/v) y las condiciones de reacción enzimática 20°C, pH 4,0 y 15 min. Una unidad enzimática (UE) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de grupos reductores (expresados como ácido monogalacturónico) por minuto bajo las condiciones del ensayo.

La actividad enzimática específica (UE/mg) se evaluó determinando la concentración de proteínas, de acuerdo al método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina como estándar para la reacción.

3. Resultados y Discusión

La cepa *Bacillus* sp. CH15 fue cultivada por fermentación sumergida para la producción de enzimas pectinolíticas. Dicha producción enzimática fue diferente en los distintos sistemas de producción utilizados. Mientras que dos lotes fueron producidos por fermentación en frascos de cultivos estáticos (lotes 1 y 2), un único lote fue obtenido por fermentación en el biorreactor (lote 3).

La recolección de las células y obtención del extracto enzimático se realiza, normalmente, en la etapa final de crecimiento exponencial, cuando la secreción enzimática es máxima, de acuerdo a experiencias previas. Sin embargo, los cultivos fueron procesados según se mencionó en la sección anterior, a tiempos de crecimiento definidos. Así, los cultivos de los lotes 1 y 2 alcanzaron una densidad óptica (DO) de solamente 0,200 unidades en 72 h, mientras que el lote 3 alcanzó una DO de 1,015 en tan solo 24 h. Con respecto a los dos primeros casos, la DO alcanzada es significativamente baja, lo cual indicaría que los cultivos se encuentran en etapas tempranas de fase exponencial. El tiempo de cultivo (72 h) fue definido en base a experiencias previas de cultivos estáticos, llevadas a cabo en iguales condiciones, excepto por el volumen del material de partida (100-250 mL, *datos no mostrados*). Probablemente esta última variable (volumen de medio de cultivo) esté relacionada con los cambios observados en el crecimiento celular.

Seguidamente, los SLC crudos fueron sometidos, por un lado, directamente a concentración en rotavapor a presión reducida (lote 1), y por otro, a purificación parcial y concentración por ultrafiltración (lotes 2 y 3). La actividad pectinolítica de las diferentes preparaciones enzimáticas se muestra en la Figura 5.

Por un lado, se puede observar que la fermentación en el biorreactor (SLC-3) fue la que alcanzó la mayor actividad enzimática en el extracto crudo en muy corto período de tiempo ($0,148 \pm 0,008$ UE/mL). Mientras que los cultivos producidos en frascos en condiciones estáticas (SLC-1 y SLC-2) mostraron valores de $0,080 \pm 0,021$ y $0,099 \pm 0,016$ UE/mL. Estos últimos son un 54 y 67% de la actividad alcanzada en el biorreactor, a pesar de la baja DO alcanzada por los cultivos.

Por otra parte, la actividad pectinolítica de la preparación enzimática concentrada en el rotavapor (Concentrado-1) aumentó un 40%, respecto al

material de partida (SLC-1). Sin embargo, se constató una pérdida de actividad pectinolítica neta, lo cual llevó a obtener una recuperación de las pectinasas en el concentrado de un 67%. Cabe mencionar que la concentración total, en las condiciones dadas, fue de 2,1 veces (v/v).

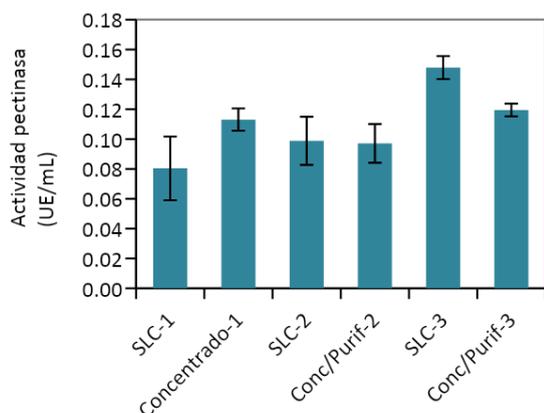


Figura 5. Actividad pectinolítica de las preparaciones enzimáticas. SLC: Sobrenadante libre de células “crudo” (lotes 1, 2 y 3); Concentrado-1: SLC concentrado en rotavapor (lote 1); Conc/Purif: SLC concentrados por ultrafiltración (lotes 2 y 3). Los barras son el promedio de tres determinaciones y los segmentos verticales corresponden a las desviaciones estándar.

En cuanto a los concentrados obtenidos por ultrafiltración (Conc/Purif) puede observarse que la actividad en dichos concentrados fue prácticamente la misma o incluso menor que la actividad del SLC de partida. Por lo que un efecto nulo o levemente negativo se obtuvo en cuanto a concentración de la actividad enzimática. Solamente una significativa reducción de volumen y desalado parcial pudo alcanzarse, lo cual resultaría importante para la producción de enzimas de uso industrial.

Cabe mencionar que los SLC filtrados por membrana de corte de 10 KDa (fracción no concentrada) retuvieron enzimas con actividad pectinolítica, con valores de actividades de $0,063 \pm 0,007$ y $0,075 \pm 0,005$ UE/mL en los lotes 2 y 3, respectivamente (actividades no mostradas en la Figura 5). Esto indicaría, preliminarmente, la presencia de enzimas de pesos moleculares

relativamente bajas (menores de 10 KDa) con este tipo de actividad. La presencia de pectinasas en esta fracción no sería conveniente en vista de la producción de una preparación enzimática parcialmente purificada y concentrada, porque si bien la actividad mostrada no es demasiado alta, sí lo es el volumen de dichos extractos, conllevando esto a una importante pérdida de actividad enzimática en la fracción concentrada.

En general, el peso molecular de las enzimas pectinolíticas depende del tipo de enzima que se trate, tomando valores muy variables, comprendido en un rango de entre 35 y 140 KDa (Kashyap *et al.*, 2001). Con respecto a las pectinasas reportadas para el género *Bacillus*, la mayoría de las enzimas identificadas hasta el momento en este género son pectato liasas, siendo las liasas de la familia PL1 las más numerosas, con pesos moleculares entre 30 y 50 kDa. La familia PL3 contiene pectato liasas de un menor tamaño molecular, entre 20 y 25 kDa, mientras que la familia PL9 contiene pectato liasas con un tamaño molecular superior a 72 kDa.

Por otra parte, el rendimiento del proceso de purificación por ultrafiltración en los lotes de producción 2 y 3 se muestra la Tabla 2. En este sentido, en ambos lotes se observó una significativa pérdida de actividad enzimática al pasar por el módulo de filtración de 10 KDa, siendo más drástica en el lote 3. Esto conllevó a que la producción sea muy baja en las fracciones concentradas, aproximadamente un 20 y 30% en los lotes 2 y 3. Con respecto a la concentración de proteínas totales, hubo una recuperación adecuada en las fracciones concentrada y filtrada, respecto a la de partida. Sin embargo, en las fracciones de mayor interés, es decir los concentrados (Conc/Purif), las actividades específicas son muy bajas e inferiores a las de partida, por lo que no pudo lograrse una correcta purificación enzimática. Por su parte, en las fracciones filtradas, se constata la actividad de enzimas pectinolíticas en las mismas, siendo particularmente en el lote 2 considerablemente mayor la producción debido al gran volumen de dicha fracción.

Tabla 2. Evaluación de los procesos de purificación enzimática por ultrafiltración en dos lotes de producción

Muestras	Actividad enzimática (UE/mL)	Volumen de muestra (L)	Proteínas (mg)	Actividad pectinásica neta (UE)	Actividad específica (UE/mg)	Fold purification	Producción (%)
SLC-2	0,099	1,550	43,70	153,21	3,51	-	-
Conc/Purif 10KD-2	0,097	0,315	23,68	30,58	1,29	0,37	19,96
Filtrado10KD-2	0,063	1,150	25,22	71,96	2,85	0,81	46,97
SLC-3	0,148	0,650	29,52	96,14	3,26	-	-
Conc/Purif 10KD -3	0,119	0,240	16,91	28,67	1,70	0,52	29,82

Filtrado10KD-3	0,075	0,280	5,70	21,11	3,70	1,14	21,95
----------------	-------	-------	------	-------	------	------	-------

Los resultados precedentes están en concordancia con lo reportado para la producción de preparaciones de enzimas comerciales, en el sentido de minimizar pasos de purificación que resultarían innecesarios, debido a la potencial pérdida de estabilidad y de la actividad catalítica de las enzimas cuando se modifica el medio en el que se encuentran activas, además del correspondiente aumento en los costos de producción.

4. Conclusiones

De acuerdo a los sistemas de producción enzimática evaluados en el presente trabajo, se puede observar que el método más conveniente es la fermentación en el biorreactor, ya que con éste se alcanzó una alta densidad celular en muy corto período de tiempo y la mayor actividad enzimática en el extracto crudo. Esto puede ser atribuido especialmente a las condiciones de aireación constante del cultivo, teniendo en cuenta que se trata de un microorganismo aeróbico. Otros métodos de cultivos no estáticos, como la fermentación en estufas o baños termostáticos agitados sería una alternativa interesante de estudiar.

Con respecto al proceso de *downstream* realizado por ultrafiltración tangencial, con membranas de *cut-off* de 10 KDa, este no resultó un método adecuado para lograr una correcta purificación de las enzimas de interés, debido a que se observaron grandes pérdidas de la actividad enzimática. Sin embargo, una concentración en volumen fue lograda, a expensas de un mantenimiento en los niveles de actividad enzimática respecto a los SLC de partida, obteniéndose un producto final apto para su potencial aplicación industrial.

5. Referencias

Aberer Werner y otros 6 autores, (2002). *Collection of Information on Enzymes*. Final Report. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.

Ahlawat, S.; Dhiman, S.S.; Battan, B.; Mandhan, R.P.; Sharma, J. (2009). *Pectinase production by Bacillus subtilis and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric*, Process Biochemistry 44(5), 521-526.

Bradford M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Cabeza M.S.; Baca F.L.; Muñoz Puntos E.; Loto F.; Baigori M.D.; Morata V.I. (2011). *Selection of*

psychrotolerant microorganisms producing cold-active pectinases for biotechnological processes at low temperature, Food Technology and Biotechnology 49(2), 187-195.

Joshi, M.; Nerurkar, M.; Adivarekar, R. (2013). *Use of citrus limetta peels for pectinase production by marine Bacillus subtilis*. Innovative Romanian Food Biotechnology 12, 75-83.

Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001). *Applications of pectinases in the commercial sector: a review*, Bioresource Technology 77, 215-227.

Kobayashi, T. y otros 6 autores, (2001). *Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of Bacillus*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 65, 842-847.

Martín, M.C.; Morata de Ambrosini, V.I. (2013). *Cold-active acidic pectinolytic system from psychrotolerant Bacillus. Application in pigment extraction from red grapes*. American Journal of Enology and Viticulture 64(4), 495-504.

Martín, M.C.; Morata de Ambrosini, V.I. (2014). *Effect of a cold-active pectinolytic system on colour development of Malbec red wines elaborated at low temperature*, International Journal of Food Science & Technology 49(8), 1893-1901.

Miller, G.L. (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, Analytical Chemistry 31, 426-428.

Pedrolli, D.B.; Monteiro, A.C.; Gomes, E.; Carmona, E.C. (2009). *Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes*, Open Biotechnology Journal, 9-18.

Sharma, D.C.; Satyanarayana, T. (2006). *A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by Bacillus pumilus dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods*, Bioresource Technology 97(5), 727-733.

Uzuner, S., & Cekmecelioglu, D. (2015). *Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of Bacillus subtilis growing on hazelnut shell hydrolyzate*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 113, 62-67.