

PRODUCCIÓN DE PECTINASAS Y AMILASAS DE *BACILLUS* SC-H EN FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO Y SUMERGIDA

Cabeza, M. S.^{1,2} y Morata, V. I.^{1,2}

¹ Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, UNCuyo – Bernardo de Irigoyen 375 – San Rafael (Mendoza) – Tel./Fax: 02627-430673 – mscabeza@fcai.uncu.edu.ar

² CONICET

1 – Resumen

Para lograr incrementar la producción de enzimas exocelulares de un microorganismo existen diferentes estrategias. Dentro de ellas, las más simples, consisten en aplicar diferentes sistemas de cultivo que incluso permitan emplear como soporte a materiales de desecho industrial. Se trabajó con un microorganismo aislado en experiencias previas, productor de pectinasas y amilasas activas a bajas temperaturas, *Bacillus* SC-H. En el presente estudio, se evaluó la factibilidad de producir pectinasas y amilasas a partir de dicho *Bacillus* en Fermentación en Sustrato Sólido (FSS) empleando orujo de uvas. La producción enzimática se vio afectada por la temperatura de incubación. La máxima producción de pectinasa fue 0,725 UE/g sustrato sólido y 2,033 UE/g sustrato sólido para α -amilasa, obtenidas en orujo suplementado con almidón, pectina y glucosa, además de sales y sustancias nitrogenadas, después de 8 y 3 días de incubación a 30°C, respectivamente. Se observó una mayor producción enzimática para la FSS en comparación con los resultados de la Fermentación Sumergida (FSM).

2 – Introducción

Se define fermentación en sustrato sólido (FSS) a aquella que involucra sólidos en ausencia (o próxima a la ausencia) de agua libre; sin embargo, el sustrato debe poseer suficiente humedad para soportar el crecimiento y metabolismo del microorganismo (Pandey, 1992). En los últimos años ha habido un renovado interés en los procesos de producción de compuestos bioactivos mediante FSS. Se ha explorado la posibilidad de usar cepas bacterianas en sistemas FSS (Pandey y col., 2000). Hay pocos reportes de producción en FSS de amilasas (Babu y Satyanarayana, 1995; Krishna y Chandrasekaran, 1996; Sodhi y col., 2005) y pectinasas (Kapoor y col., 2000; Kashyap y col., 2003) usando bacterias. Las ventajas del uso de FSS son una producción más barata de enzimas que tienen mejores propiedades fisicoquímicas, menores requerimientos de energía y que es una tecnología amigable con el medio ambiente ya que reutiliza residuos agrícolas (Pandey, 2003). Además, estos procesos dan productos altamente concentrados (Suryanarayan, 2003).

El sustrato sólido elegido en el presente trabajo es orujo de uvas (formado por hollejos, semillas y trocitos de escobajo), que es el principal residuo de la industria vitivinícola. El orujo constituye un 16% del fruto original. El componente principal de la fibra es lignina, luego hemicelulosas, celulosa y pectina. Este subproducto, con escasa rentabilidad económica y contaminante, puede reducirse usando FSS, pudiendo obtenerse productos con valor agregado (como lo son las enzimas) usando una tecnología económica (Díaz y col., 2007).

3 – Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue mejorar la producción de enzimas (pectinasas y amilasas) ensayando la modalidad de FSS, usando como sustrato orujo de uvas tintas, y realizando la incubación a dos niveles de temperatura, 12° y 30°C. Además, se compararán las actividades logradas con las obtenidas en FSm.

4 – Metodología

Microorganismo: *Bacillus* SC-H, aislado en el laboratorio de Biotecnología a partir de uvas de la región vitivinícola San Rafael (Cabeza y col., 2005).

Proteínas: determinadas por el método de Bradford (1977).

Actividades enzimáticas: α -amilasa y pectinasa se midieron cuantificando azúcares reductores liberados con el método del ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS) de Miller (1959), a partir de almidón o pectina, respectivamente. La actividad enzimática se expresa como UE/g de sustrato sólido ó UE/ml de extracto enzimático, definiéndose a UE (unidad enzimática) como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa ó ácido galacturónico por minuto bajo las condiciones de ensayo.

F_{Sm}: Medio de cultivo (g/L): Pectina, 2; Extracto de levadura, 1; Peptona de carne, 10; Peptona de soja, 10; KH₂PO₄, 0,2; CaCl₂, 0,05; (NH₄)₂SO₄, 3; MgSO₄, 0,8; MnSO₄.6H₂O, 0,05; FeSO₄.7H₂O, 0,015; pH 5,0. La incubación se efectuó en condiciones estáticas a 35°C, durante 6 días (máxima actividad enzimática). Los ensayos se realizan con el extracto filtrado (0,22 μ m).

F_{SS}: La fermentación se llevó a cabo en frascos roscados de 500 ml, los cuales contenían 5 g de sólido esterilizado (orujo de uva tinta secado hasta peso constante en horno), cuya humedad fue ajustada al 85% con un medio esterilizado cuya composición se detalla (g/L): Extracto de levadura, 1; Peptona de carne, 10; Peptona de soja, 10; KH₂PO₄, 0,2; CaCl₂, 0,05; (NH₄)₂SO₄, 3; MgSO₄, 0,8; MnSO₄.6H₂O, 0,05; FeSO₄.7H₂O, 0,015; Almidón, 1; Pectina, 1; Glucosa, 0,4; pH = 5. Cada frasco se inoculó con 2 ml de cultivo de *Bacillus* SC-H de 3 días. La incubación se efectuó en condiciones estáticas a 12°C ó 30°C, durante 8 días. Se realizaron 2 extracciones sucesivas con 12,5 ml de buffer acetato pH 5,0, agitando (130 rpm) durante 10' respectivamente. Los ensayos se realizan con el extracto filtrado (0,22 μ m). La actividad acuosa (aw) se midió utilizando un equipo HygroPalm AW1.

5 – Resultados

Las proteínas contenidas en el extracto enzimático obtenido en la F_{Sm} eran 0,066 mg/ml.

TABLA 1. Actividades enzimáticas, expresadas por ml o mg de proteína, correspondientes a la F_{Sm}.

	α -amilasa		Pectinasa	
15°C	0,226 UE/ml	3,424 UE/mg prot.	0,013 UE/ml	0,197 UE/mg prot.
30°C	0,286 UE/ml	4,333 UE/mg prot.	0,038 UE/ml	0,576 UE/mg prot.

La máxima producción en FSS, en general, de α -amilasa se alcanza a los 3 días de incubación y para pectinasa, alrededor del 4º día (Fig. 1 y 2). Las máximas producciones se alcanzaron cuando la incubación se realizó a 30°C y la hidrólisis se observó a 15°C, siendo 2,033 UE/g (0,407 UE/ml) para α -amilasa y 0,725 UE/g (0,145 UE/ml) para pectinasa.

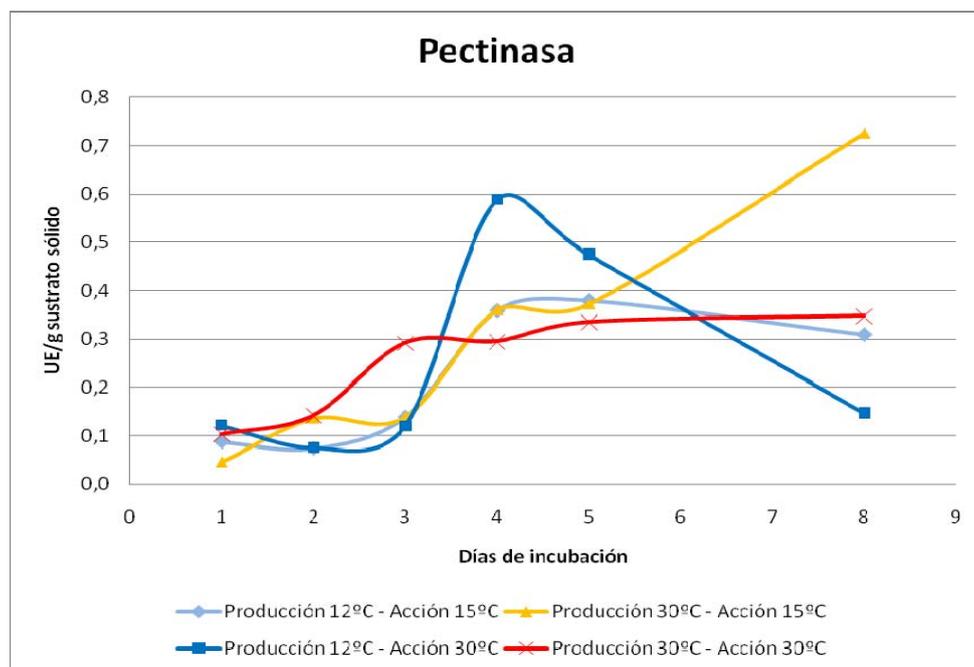


FIGURA 1. Seguimiento de producción de pectinasas en FSS por *Bacillus* SC-H

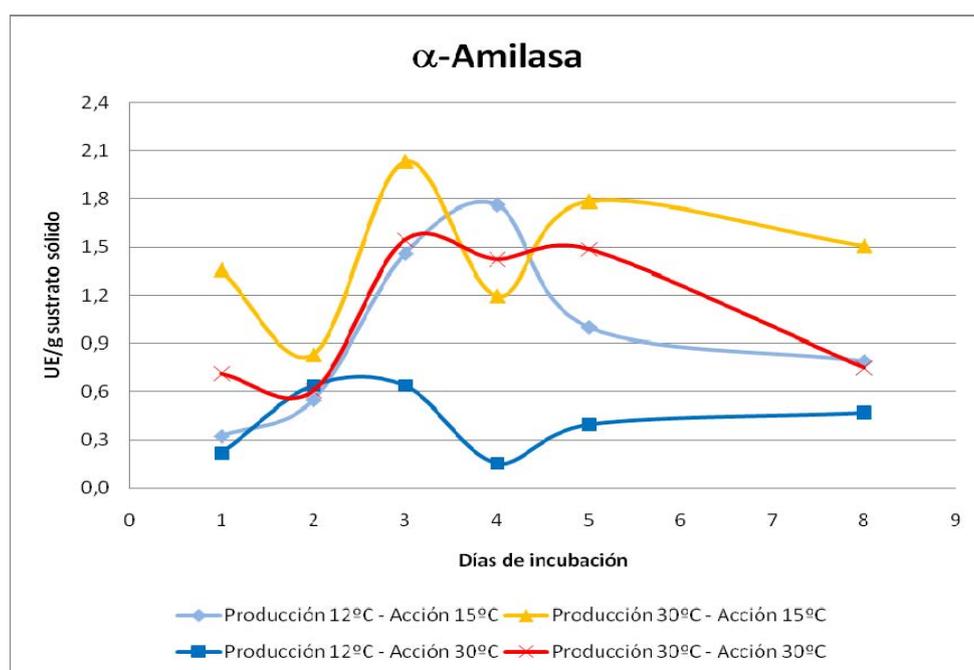


FIGURA 2. Seguimiento de producción de α -amilasas en FSS por *Bacillus* SC-H

Al comparar las actividades obtenidas a las dos temperaturas de producción cuando se realizó la hidrólisis a 15°C, se confirman valores superiores en la incubación a 30°C. No se logró inducir enzimas más activas a bajas temperaturas cuando se incubó a temperaturas inferiores.

La aw mínima requerida para el crecimiento de bacterias es 0,9. En este ensayo, la aw medida se mantuvo siempre por encima de 0,91 (Fig. 3). Es interesante analizar que ésta fue aumentando a medida que se continuaba la incubación. Esto podría explicarse por el hecho de que la capacidad de retención de agua de los polímeros del medio de suplementación se ve disminuida a medida que éstos son hidrolizados por las enzimas producidas por el microorganismo durante su crecimiento.

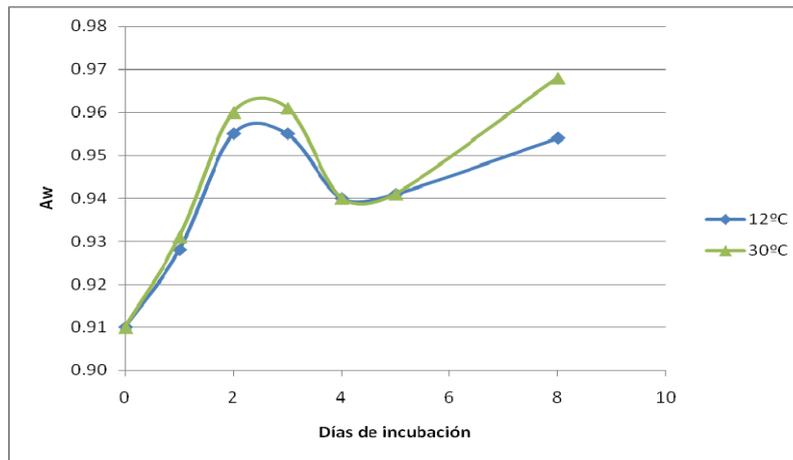


FIGURA 3. Seguimiento de aw en FSS por *Bacillus* SC-H

Las proteínas en FSS rondaron los 0,065 mg/ml, la disminución observada podría deberse a presencia de enzimas proteolíticas. Se evidencia un leve aumento cuando la incubación se realizó a 30°C (Fig. 4).

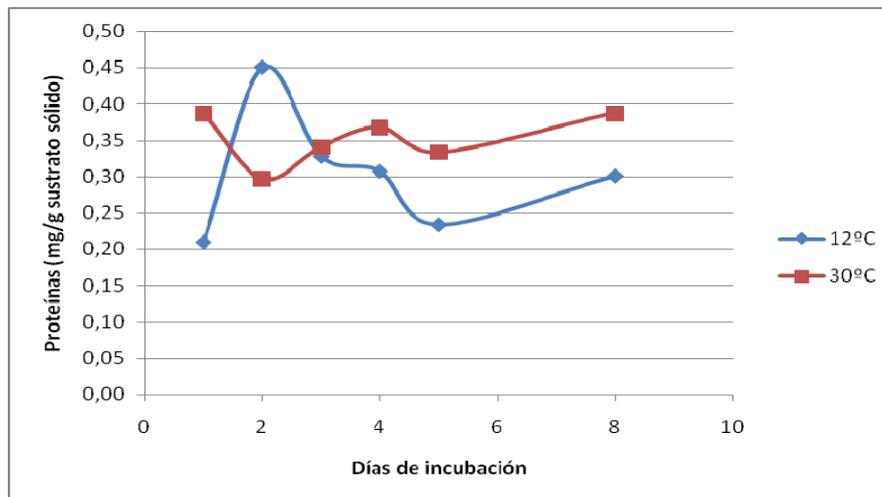


FIGURA 4. Seguimiento de producción de proteínas en FSS por *Bacillus* SC-H

Las actividades específicas en FSS correspondientes a las máximas actividades fueron: 5,959 UE/mg proteína para α -amilasa y 1,868 UE/mg proteína para pectinasa. Como se puede observar, las actividades enzimáticas alcanzadas en el proceso de FSS superan a las observadas en FSm (Tabla 2), siendo este aumento en algunos casos muy significativo (11,2 veces mayor la actividad pectinolítica).

TABLA 2. Incremento de las actividades enzimáticas en FSS con respecto a las de FSm a dos niveles de temperatura.

	α -amilasa	Pectinasa
15°C	1,8	11,2
30°C	1,1	3,1

La producción de las enzimas estudiadas fue mayor usando el proceso de FSS en vez de FSm, al igual que lo mostrado por Kashyap y col. (2000). Esto se ve reflejado en las actividades específicas más altas. La mayor producción de enzimas en FSS podría deberse a que el sustrato sólido no sólo provee el nutriente al cultivo microbiano, sino también a que le sirve como anclaje para las células (Pandey y col., 2000), permitiéndoles utilizar el sustrato con mayor efectividad. Se hace necesario suplementar nutrientes que se encuentren en condiciones subóptimas, para que se encuentren disponibles.

Otra estrategia ensayada para incrementar la producción de enzimas fue optimizar la FSm mediante el método de Box-Benhen en cuanto a cantidad de carbohidratos disponibles para el microorganismo (almidón, pectina y glucosa), siendo los máximos valores observados para α -amilasa y pectinasa de 1,157 UE/ml y 0,461 UE/ml, respectivamente. Estas actividades superan las logradas en FSS, donde no se ha optimizado el medio de cultivo. Sería muy conveniente realizar una optimización de la FSS a fines de obtener actividades enzimáticas mayores en este sistema de cultivo.

6 – Conclusiones

De los resultados mostrados anteriormente, se puede concluir que la producción de enzimas hidrolíticas (amilasas y pectinasas) en FSS usando *Bacillus* SC-H es una mejor opción que la FSm. En el caso de pectinasa, la producción en FSS fue 11,2 veces superior a la de FSm. El orujo es un desecho de la industria vitivinícola, barato y fácilmente disponible, por lo que podría utilizarse para la producción a escala industrial. Otra ventaja es que no se requiere de temperaturas de incubación bajas para obtener enzimas activas a bajas temperaturas.

7 – Bibliografía

Bradford, M. M. (1977) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.

Cabeza, M. S.; Baca de Giménez, F. L.; Muñoz Puentes, E.; Morata de Ambrosini, V. I. (2005) Microorganismos productores de pectinasas activas a bajas temperaturas para vinificación. CIBIA V, Libro de Art. en Extenso, Tomo III, Art. 6, Puerto Vallarta, Jalisco, México.

Díaz, A. B.; Caro, I.; de Ory, I.; Blandino, A. (2007) Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 302-306.

Kapoor, M.; Beg, Q. K.; Bhushan, B.; Dadhich, K. S.; Hoondal, G. S. (2000) Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Process Biochemistry*, 36, 467-473.

Kashyap, D. R.; Chandra, S.; Kaul, A.; Tewari, R. (2000) Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 277-282.

Kashyap, D. R.; Soni, S. K.; Tewari, R. (2003) Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation. *Bioresource Technology*, 88, 251-254.

Krishna, C.; Chandrasekaran, M. (1996) Banana waste as substrate for α -amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid-state fermentation. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 46, 106-111.

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

Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 27 (2), 109-117.

Pandey, A.; Soccol, C.R.; Mitchell, D. (2000) New developments in solid state fermentation. I. Bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35, 1153-1169.

Pandey, A. (2003) Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13 (2-3), 81-84.

Sodhi, H. K.; Sharma, K.; Gupta, J. K.; Soni, S. K. (2005) Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry*, 40, 525-534.

Suryanarayan, S. (2003) Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 189-195.