

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 9 / Nº 9 / 2007 / 26-31

SELECCIÓN DE CEPAS DE LEVADURAS PRODUCTORAS DE ENZIMAS PÉCTICAS

¹María A. Martos; ¹Emilce R. Zubreski; ¹Gabriela S. Velázquez; ¹Francisco Martínez Vázquez;

¹Fernando O. Benassi. (†); ²Roque A. Hours.

¹Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552, (3300), Posadas, Misiones, Argentina, Fax.: +054-3752-425414. (biotecno@fceqyn.unam.edu.ar).

²Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Calle 47 y 115, (1900), La Plata, Argentina. (hours@biotec.org.ar).

(†) Fallecido 12-01-2005.

SCREENING OF YEAST STRAINS WITH PECTINOLYTIC ACTIVITY

ABSTRACT

The present study was undertaken to find yeast strains with high pectinolytic activity. Yeast strains isolated from citrus fruits, were screened for pectinase production. The species with the best pectinase activity was selected to evaluate their ability to produce pectic enzymes by submerged fermentation processes. The effect of different carbon sources on polygalacturonase (PGase) production was studied. Different vegetable tissues were used for tests of maceration with the crude enzyme extract.

Among 154 yeast strains isolated, yeast Nº 111 was positive for pectinase activity and was identified as *Geotrichum sp.* Maximum PGase production obtained was 90.7 EU/ml when this yeast grown in shake flasks under the presence of glucose and citrus pectin as carbon sources. All tissues studied were macerated by the enzyme extract, microscopic examination showed a suspension of loose single cells. Lysis of cells was not observed.

KEYWORDS: *Geotrichum sp.*, screening of yeasts, polygalacturonase, maceration.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el aislamiento de cepas de levaduras con buena actividad pectinolítica. Las levaduras aisladas a partir de frutas cítricas fueron seleccionadas en base a sus actividades pectinolíticas. Se evaluó la capacidad de producción de enzimas pécticas por fermentación en medio líquido de la levadura con mayor actividad pectinolítica. Se estudió la influencia de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de poligalacturonasa (PGasa) y la capacidad macerante de los extractos enzimáticos sobre tejidos vegetales.

De 154 levaduras aisladas, la cepa Nº 111 mostró actividad pectinolítica y fue identificada como *Geotrichum sp.* La máxima producción de PGasa obtenida fue de 90,7 EU/ml, cuando esta levadura creció en medio líquido con glucosa y pectina de citrus como fuentes de carbono. Los tejidos vegetales estudiados fueron macerados por el extracto enzimático. El examen microscópico mostró células simples liberadas, no observándose lisis por destrucción de la pared celular.

PALABRAS CLAVE: *Geotrichum sp.*, selección de levaduras, poligalacturonasa, maceración.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas pécticas microbianas son de interés comercial, algunas tienen la capacidad de liberar sustancias pécticas cementantes de la pared celular de las plantas, produciendo la maceración de tejidos vegetales [12]. En el proceso de maceración, la pectina insoluble presente en la laminilla media es degradada, con la consiguiente liberación de células individuales y agregados celulares. Para tal propósito, únicamente el material cementante intercelular y parte de la pared celular primaria de las plantas deben ser degradados, sin dañar la pared celular secundaria, a los efectos de evitar la lisis celular [1, 13, 8]. Este método presenta ventajas sobre la disgregación mecánica ya que conserva intactos el flavor, los pigmentos y los componentes celulares, propiedades sumamente importantes en la producción de néctares de frutas, en la elaboración de purés vegetales (papa, zanahoria, etc.) y de alimentos infantiles en general [2, 6, 8].

La producción de enzimas pécticas ha sido ampliamente estudiada en bacterias y hongos filamentosos. En cambio, su producción a partir de levaduras ha recibido menos atención y se ha encontrado que muy pocas especies de levaduras producen estas enzimas [3, 6, 10].

La producción de pectinasas es una capacidad constitutiva en la mayoría de las levaduras porque no se requieren pectina, ácido poligalacturónico o ácido galacturónico para inducir la síntesis de dichas enzimas. Sin embargo, se ha descrito que la capacidad pectolítica de unas pocas especies es inducible, tales como *Cryptococcus albidus*, *Geotrichum lactis* y *Kluyveromyces fragilis*. En tanto que la poligalacturonasa de *Saccharomyces fragilis* es parcialmente constitutiva [3].

El objetivo del presente trabajo fue el aislamiento de cepas de levaduras con buena actividad pectinolítica. A tal fin se aislaron cepas de levaduras a partir de frutas cítricas. Se estudió la producción de poligalacturonasa en erlenmeyers, utilizando como fuente de carbono glucosa o galactosa y un inductor de la actividad enzimática constituido por ácido galacturónico, ácido poligalacturónico o pectina de citrus. Se investigó la capacidad macerante de los extractos enzimáticos con actividad pectinolítica en diferentes tejidos vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo

Caldo de enriquecimiento: extracto de levadura, 5 g/l; triptona, 5 g/l; glucosa, 10 g/l; propionato de calcio, 1,3 g/l; oxitetraciclina (Pfizer), 100 mg/l; pH: 5,0.

Medio de aislamiento: extracto de levadura 1 g/l; triptona, 5 g/l; pectina de citrus¹ (Parafarm) 10 g/l; propionato de calcio 1,3 g/l; oxitetraciclina (Pfizer) 100 mg/l; agar-agar 15 g/l, pH: 5,0.

Medio de mantenimiento: extracto de levadura, 5 g/l; triptona, 5 g/L; glucosa, 10 g/l; agar, 18 g/l, pH: 5,0.

Agar pectina: extracto de levadura, 1 g/l; triptona, 5 g/l; pectina de citrus¹ (Parafarm), 10 g/l; agar-agar, 15 g/l, pH: 5,0.

Medio de fermentación: se prepararon diferentes medios de cultivos, cada uno de ellos contenía el medio base compuesto por Nitrogen Base, YNB, (Difco), 6,7 g/l, una fuente de carbono formada por glucosa (Anedra), 5,0 g/l o galactosa (Sigma), 5,0 g/l y un inductor de la actividad pectinolítica constituido por ácido galacturónico (Sigma), ácido poligalacturónico (Fluka), o pectina de citrus (Sigma), cuyas concentraciones variaron de 0,1g/l, 2,0 g/l o 5,0 g/l, según el medio de cultivo correspondiente [4]. Todos los componentes del medio fueron esterilizados a vapor fluente 30 minutos, excepto en el caso de la solución de YNB, la que se esterilizó en forma separada por filtración a través de un filtro de celulosa de 0,45 µm.

Enriquecimiento

Se suspendieron 10 gramos de frutas cítricas en 90 ml de agua de peptona al 0,1%, las mismas se licuaron durante 2 minutos. Se agregó 1ml de la suspensión en tubos que contenían 10 ml de caldo de enriquecimiento. Los tubos se incubaron a 30°C, durante 48 hs.

Aislamiento

Los microorganismos desarrollados en los tubos con caldo de enriquecimiento fueron sembrados en cajas de Petri con medio de aislamiento. Las placas se incubaron a 30°C, durante 24 a 48 hs. A los efectos de obtener cultivos puros, las colonias presuntivas de levaduras fueron suspendidas en solución fisiológica, efectuándose un segundo aislamiento en placas conteniendo agar pectina. Las placas se incubaron a 30°C, durante 24 hs. Las colonias bien separadas fueron repicadas a tubos estrías con medio de mantenimiento, e incubadas a 30°C por 24 hs; las que posteriormente fueron conservadas en heladera a 5°C.

Preselección de cepas con actividad pectinolítica

A partir de cultivos jóvenes (24 hs) de las levaduras, se sembraron placas que contenían YNB 6,7 g/l y ácido poligalacturónico 10 g/l, pH 5,0. Las placas se incubaron

1- La pectina fue lavada con etanol al 70% en HCL 0,05 N, para eliminar los restos de azúcares que normalmente contienen las pectinas comerciales como excipiente.

a 30°C por 6 días, luego se inundaron con HCl 5 N. Las cepas con actividad pectinolítica se reconocieron por la presencia de un halo de hidrólisis alrededor de las colonias [10].

Identificación

Las cepas preseleccionadas fueron identificadas utilizando el sistema API de identificación de levaduras "ID 32 C", que detecta la capacidad de asimilación de 30 fuentes de carbono.

Estudios de producción de enzimas pécticas en erlenmeyers

Preparación del inóculo: a partir de cultivos jóvenes (24 horas) de la levadura desarrollada en estrías de medio de mantenimiento, se realizaron suspensiones en tubos que contenían 10 ml de una solución de Tween 80 al 0,05%. A partir del mismo se efectuaron diluciones decimales para ajustar la concentración celular a una Densidad Óptica de 0,96, medidos en un espectrofotómetro a 620 nm.

-Fermentación: se inocularon erlenmeyers de 125 ml que contenían 25 ml del medio de fermentación con 1 ml de inóculo. Los mismos se incubaron a 30°C en baño termostático rotatorio a 150 rpm [3]. Luego de 4 días, el cultivo fue centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos, a 5°C para remover las células de levadura. El sobrenadante se conservó a -18°C hasta su utilización. Todas las experiencias se realizaron por triplicado.

Técnicas analíticas

Recuento del número de células: se determinó mediante recuento en cámara de Neubauer.

Determinación de la actividad poligalacturonasa por el método del hoyo (cup plate assay): se realizaron hoyos de 5 x 4 mm, en placas que contenían ácido poligalacturónico (Fluka), 10 g/l en buffer acetato-ácido acético 0,2 M, pH: 5,0 y agar 18 g/l. A cada hoyo se le agregó 45 µl del filtrado enzimático. Las cajas se incubaron a 35°C hasta 4 días y se inundaron con HCl 5 N. Se midió el diámetro de los halos de hidrólisis formados [15].

Medida de la actividad poligalacturonasa (PGasa): la actividad PGasa se determinó mezclando 2,8 ml de una solución de ácido poligalacturónico (Sigma) al 0,5% en buffer acetato-ácido acético 0,2 M, pH 4,5, con 0,2 ml del filtrado enzimático. Las muestras, por duplicado, se incubaron a 37°C durante 60 minutos y se determinaron los grupos reductores liberados por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), usando ácido galacturónico como referencia [11]. Una unidad enzimática (UE) de PGasa se define como la cantidad de enzima que libera

1 µmol de ácido galacturónico por minuto en las condiciones de ensayo.

Determinación de la capacidad macerante: se cortaron cilindros de papa, zanahoria y pepino que median 3 mm de diámetro y 4 mm de espesor. Se colocaron 5 cilindros en cajas Petri chicas, a cada una de las cuales se le agregó 5 ml de la solución de enzima. Las placas se incubaron a 30°C, durante 2 hs. Los blancos se realizaron con la enzima inactivada (5 minutos a baño María). El ablandamiento de los tejidos vegetales y la presencia de células libres se utilizaron como indicadores de la actividad macerante [14]. Las observaciones de las células libres se efectuó mediante un microscopio Olympus, modelo CH-2, utilizando un ocular 10X y un objetivo 40X.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron 154 cepas de levaduras. Los ensayos semicuantitativos realizados en medios agarizados conteniendo ácido poligalacturónico como fuente de carbono, revelaron que únicamente la colonia de la levadura N° 111 mostró tener actividad poligalacturonasa, evidenciada por la formación de halos de hidrólisis (25 mm de diámetro) alrededor de su colonia (Figura 1).

La levadura N° 111, fue identificada como *Geotrichum* sp. aplicando el sistema computarizado para levaduras, API ID 32C.

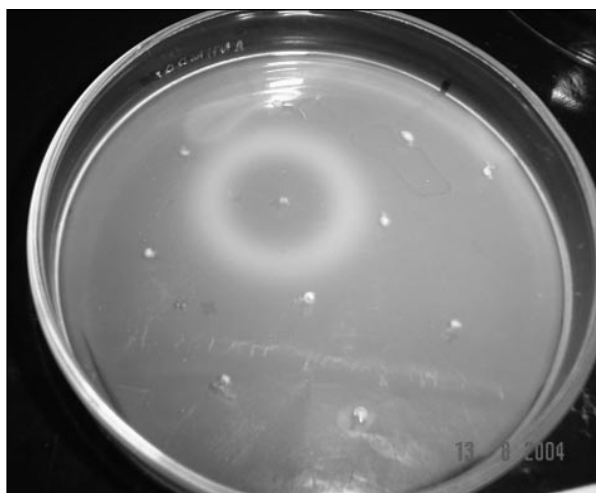


FIGURA 1. Halo de hidrólisis sobre ácido poligalacturónico, producido por la colonia de la levadura N° 111.

La capacidad de la levadura N° 111 de producir enzimas pécticas en diferentes medios líquidos se evaluó mediante el método del hoyo (Figura 2). El diámetro de los halos de hidrólisis formados en cada caso se presentan en la Tabla 1. Los extractos enzimáticos que presentaron actividad pectinolítica (halos de hidrólisis) fueron utilizados

para cuantificar la actividad PGasa (Tabla 1). En la Tabla 1 se presenta, además, el número de células producidas al finalizar cada una de las fermentaciones.

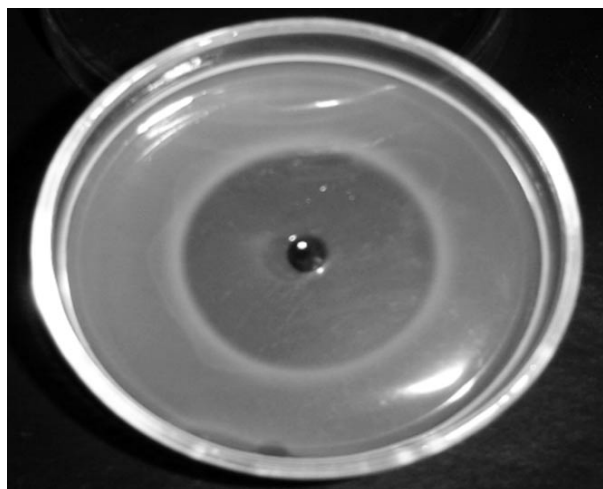


FIGURA 2. Halo de hidrólisis sobre ácido poligalacturónico, producido por el extracto enzimático de la levadura N° 111.

Como se observa en la Tabla 1, la actividad enzimática y el crecimiento celular fueron despreciables en todos los cultivos realizados en medios que contenían galactosa como fuente de carbono fácilmente asimilable, aún en los casos en que fue adicionada de ácido poligalacturónico o ácido galacturónico.

Cuando los cultivos se realizaron en medios que contenían glucosa con el agregado de ácido galacturónico, ácido poligalacturónico o pectina de citrus, se observó buen crecimiento y actividad PGasa. Los mayores halos de hidrólisis, de hasta 4 cm de diámetro a los 2 días, se obtuvieron con los filtrados enzimáticos provenientes de los cultivos realizados en los medios que contenían glucosa, 5,0 g/l, adicionados con ácido poligalacturónico

o pectina de citrus, 5,0 g/l. En este último medio la actividad PGasa fue de 90,7 UE/ml (Tabla 1). En el medio con glucosa únicamente la actividad enzimática fue despreciable. Esto indicaría que tanto ácido galacturónico, ácido poligalacturónico o pectina de citrus actúan como inductores de la producción de PGasa, y que la glucosa no tiene efecto represor sobre la misma.

Tabla 1: Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento y la producción de poligalacturonasa (PGasa) por la levadura N° 111.

Fuentes de carbono (g/l)					Crecimiento (cél./ml) x 10 ⁷	pH final	Ø (cm)	PGasa (UE/ml)
GAL	GLU	AG	APG	PEC				
5,0	-	-	-	-	0	5,1	ND	ND
5,0	-	-	0,1	-	0	5,1	ND	ND
5,0	-	-	2,0	-	0	5,1	ND	ND
5,0	-	0,1	-	-	0	5,1	ND	ND
5,0	-	2,0	-	-	0	5,1	ND	ND
-	5,0	-	-	-	0,37	3,0	ND	ND
-	5,0	0,1	-	-	4,4	3,0	ND	ND
-	5,0	2,0	-	-	7,12	3,0	Transparente Ø=2,5 (3 d)	73,4
-	5,0	5,0	-	-	8,0	3,3	Transparente Ø=2,8 (3 d)	74,3
-	5,0	-	0,1	-	3,86	3,0	Opalescente Ø=1,0 (2 d)	ND
-	5,0	-	2,0	-	6,80	2,8	Transparente Ø=1,0 (2 d)	70,2
-	5,0	-	5,0	-	6,27	3,3	Transparente Ø=4,0 (2 d)	78,3
-	5,0	-	-	5,0	7,32	2,7	Transparente Ø=4,0 (2 d)	90,7

GAL: galactosa; GLU: glucosa; AG: ácido galacturónico; APG: ácido poligalacturónico; PEC: pectina; ND: no detectado; Ø: diámetro del halo de hidrólisis.

Blanco, P. et al. [2], informaron que la expresión de una endo-PGasa de *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1389 fue mayor cuando se utilizó 5,0 g/l de galactosa como fuente de carbono y energía en lugar de glucosa. La

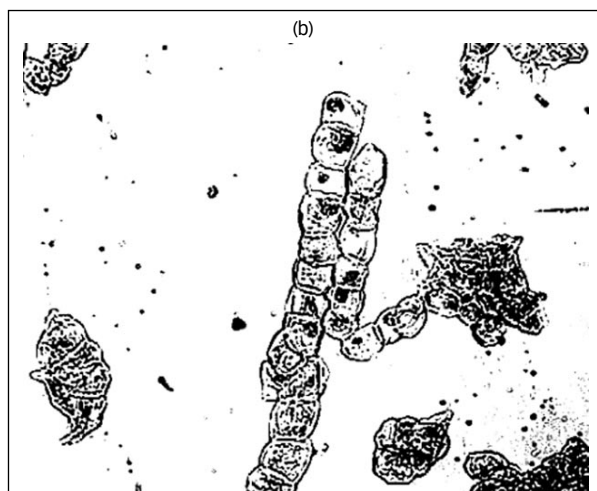
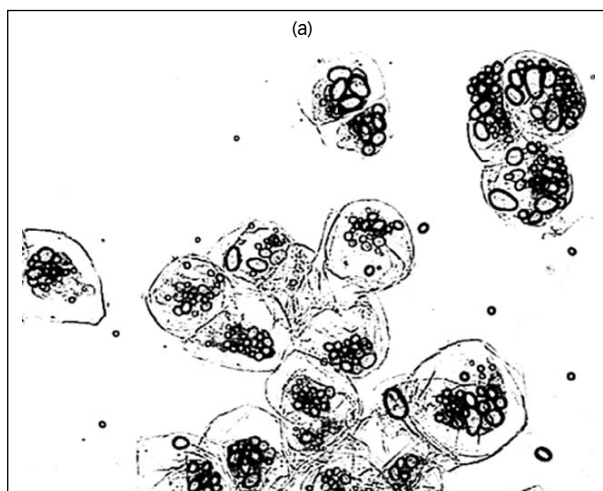


FIGURA 3. Microfotografías. a) Células del tejido de papa macerado, b) Células del tejido de zanahoria macerado.

producción de pectinasas es generalmente una capacidad constitutiva en las levaduras [4]. Schwan, R.F. *et al.* [14], informaron que la síntesis de poligalacturonasa por *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* y *Candida rugopelliculosa* no aumentó con el agregado de pectina o ácido poligalacturónico al medio de cultivo que contenía glucosa. Sin embargo, la capacidad pectinolítica de algunas especies de levaduras, tales como *Cryptococcus albidus* [11] y *Geotrichum lactis* [3] han sido consideradas como inducibles. Este último parecería ser el caso de la levadura N° 111, aislada en nuestro laboratorio.

La Figura 3 muestra las microfotografías de distintos vegetales macerados con los extractos enzimáticos que presentaron actividad pectinolítica.

Todos los tejidos vegetales sometidos a pruebas de maceración, con extractos enzimáticos de la levadura 111, dieron resultados positivos. El examen microscópico de los productos macerados mostró células simples liberadas y agregados celulares (Figura 3).

CONCLUSIONES

De 154 levaduras aisladas a partir de frutos cítricos, únicamente la levadura N° 111 mostró actividad pectinolítica; la que fue identificada como *Geotrichum* sp.

Al estudiar la producción de enzimas pécticas de la levadura aislada (*Geotrichum* sp.) en diferentes medios de cultivos, se infiere que la actividad pectinolítica no es reprimida por glucosa y es inducida por ácido poligalacturónico y por pectina cítrica. Se obtuvieron buenos niveles de actividad PGasa, considerando que se trata de sobrenadantes de cultivos sin purificar y concentrar. La máxima producción de PGasa obtenida fue de 90,7 EU/ml, cuando esta levadura creció en medio líquido con glucosa y pectina de citrus como fuentes de carbono.

Los extractos enzimáticos obtenidos durante la fermentación en medio líquido de la levadura N° 111 provocaron la maceración de los tejidos vegetales estudiados (papa, zanahoria y pepino). El examen microscópico de los vegetales macerados mostró células simples liberadas, no observándose lisis por destrucción de la pared celular, lo que presenta interés, desde el punto de vista industrial, en la producción de néctares de frutas y alimentos infantiles en general.

REFERENCIAS

1. Biekman, E. S. A.

“Enzymatic maceration of potatoes for the production of

instant dried mashed potato: Modeling of the disintegration process”. *Food Biotechnol.* 6: p.19-33. 1992.

2. Blanco, P.; Sieiro, C.; Diaz, A.; Villa, T. G.

“Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*”. *Can. J. Microbiol.* 40: p.974-977. 1994.

3. Blanco, P.; Sieiro, C.; Diaz, A.; Villa, T. G.

“Differences between pectic enzymes produced by laboratory and wild-type strains of *Saccharomyces cerevisiae*”. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13: p.711-712. 1997.

4. Blanco, P.; Sieiro, C.; Villa, T. G.

“Production of pectic enzymes in yeasts”. *MiniReview. FEMS Microbiol. Lett.* 175: p.1-9. 1999.

5. Call, H. P.; Harding, M.; Emeis, C. C.

“Screening for pectinolytic *Candida* yeasts: optimization and characterization of the enzymes”. *J. Food Biochem.* 9: p.193-210. 1985.

6. Call, H. P.; Walter, J.; Emeis, C. C.

“Maceration activity of an endopolygalacturonase form *Candida mecedoniensis*”. *J. Food Biochem.* 9: p.325-348. 1985.

7. Federici, F.

“Production, purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*”. *Antonie van Leeuwenhoek.* 51: p.139-150. 1985.

8. Ishii, S.; Yokotsuka, T.

“Maceration of plant tissues by pectin transeliminase”. *Agric. Biol. Chem.* 35: p.1157-1159. 1971.

9. Ishii, S.

“Enzymatic maceration of plant tissues by endo-pectin lyase and endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*”. *Phytopathology.* 66: P. 281-289. 1976.

10. McKay, A. M.

“Degradation of polygalacturonic acid by *S. cerevisiae*”. *Letters in Applied Microbiology.* 11: p.41-44. 1990.

11. Miller, G.L.

“Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”. *Anal. Chem.* 31: p.426-428. 1959.

12. Nakamura, T.; Hours, R. A.; Sakai, T.

“Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases”. *J. Food Sci.* 60: p.468-472. 1995.

13. Sakai, T.; Sakamoto, T.; Hallaert, J.; Vandamme, E.J.

“Pectin, pectinase, and protopectinase: Production, properties, and applications”. *Adv. Appl. Microbiol.* 39: p.213-294. 1993.

14. Schwan, R. F.; Cooper, R. M.; Wheals, A. E.

“Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts”. *Enz. Microb. Technol.* 21: p. 234-244. 1997.

15. Souza, J. V. B.; Silva, E. S.; Maia, M. L. S.; Texeira, M. F. "Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces claviformis* 2 A. UMIDA.1". Proc. Biochem. 39: p. 455-458. 2003.

Recibido: 16/09/05.

Aprobado: 04/10/06.

• María Alicia Martos

Ingeniero Químico. Magister en Tecnología de los Alimentos. Docente de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la UNAM en las cátedras Química Orgánica y Biotecnología: Docente de la Maestría en Tecnología de los Alimentos, participando del dictado del módulo "Hidratos de Carbono y del módulo "Enzimas" del Curso "Química de los Alimentos". Categoría IV del Programa de Incentivos. Participante de 5 Proyectos de Investigación acreditados por el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDET) - U.Na.M. Autora de 5 trabajos científicos en revistas nacionales y extranjeras.

• Emilce Roxana Zubresky

Bioquímica. Lab. Qco. Industrial. Docente del Instituto San Basilio Magno de Posadas, EGB1- EGB2. Además es Auxiliar Docente desde 01/07/91 en Cátedras de Microbiología General (Ingeniería Química) y Microbiología Industrial (Lab.Qco.Ind.) de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales- UNaM. Investigador Sin Categoría Participante de 4 Proyectos de Investigación acreditados por el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (Cidet) y de 3 Proyectos de Investigación pertenecientes al Programa de Incentivos del Ministerio de Educación de la Nación.

• Francisco Martínez Vazquez

Ingeniero Químico. Magister en Tecnología de los Alimentos. Docente de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la UNAM. Categoría Investigador: III – Fue Co-Director del Programa de Investigación "Enterobacterias y otros microorganismos indicadores de contaminación en la Cuenca del Alto Paraná". Co-Director del Proyecto de Investigación "Aislamiento y caracterización de cepas de Levaduras con actividad macerante de tejidos vegetales".

• Fernando Olivio Benassi (Fallecido)

Licenciado en Química. Doctor en Química. Fue Profesor Titular de Química Inorgánica y Microbiología

General e Industrial; Docente de la Maestría en Tecnología de Alimentos (Departamentos de Ciencia y tecnología de Alimentos y de Química); Integrante Investigador Categoría II (Programa Nacional Incentivos-1998); Dirigió Proyectos sobre Microbiología en Alimentos y Aguas.

• Roque Alberto Hours

Licenciado en Ciencias Bioquímicas. Dr. en Ciencias Bioquímicas. Profesor Titular Ordinario Dedicación Simple. Asignatura: Biotecnología. Facultad de Ciencias de la Alimentación (UNER). Becario de Iniciación (1981/3), Perfeccionamiento (1983/6) y Formación Superior (1986/9) del CONICET. Becario de la Japan Society for the Promotion of Science, 1993/4, Univ. of Osaka Pref., Japan. Investigador Asistente (1989/1996), Adjunto (1997/2002) e Independiente (2002-actual) del CONICET. Programa de Incentivos. Categoría 2.