

# Endopoligalacturonasa y pectinesterasa de *Aspergillus Niger*

## Endopolygalacturonase and pectinesterase from *Aspergillus Niger*

Adriana Lozano\*, Elizabeth López\*\*

### RESUMEN

La endopolimetilgalacturonasa (Endo PMG) EC 3.2.1.41 fue producida por fermentación en cultivo sumergido en erlenmeyers, empleando como inóculo esporas de una cepa nativa de *Aspergillus niger* ( $1 \times 10^5$  esporas/ml), y como única fuente de carbono pectina cítrica comercial. La purificación parcial de la enzima se llevó a cabo por precipitación con sulfato de amonio (20%) y cromatografía en columna con Sephadex G-75 y DEAE-Sephadex A-50. Se observó la presencia de dos isoenzimas. La producción de pectinesterasa (PE) EC 3.1.1.11 fue baja en las condiciones de fermentación utilizadas. El extracto crudo de la fermentación presentó dos valores de pH con máxima actividad para endo-PMG a 4.5 y 6.3, temperatura óptima entre 40 y 45°C, estabilidad en un rango de pH de 2.0 a 10.0 y en un rango de temperatura de 20 a 65°C. La enzima se inactiva completamente a 70 °C. Los iones sodio en concentraciones superiores a 0.1M mostraron efecto inhibitorio para endo-PMG.

Palabras clave: pectinasas, poligalacturonasa polimetilgalacturonasa, enzimas pectolíticas, enzimas pécticas, *Aspergillus niger*.

### ABSTRACT

Endo-polymethylgalacturonase (endo-PMG) EC 3.2.1.41 was produced by submerged fermentation using a local *Aspergillus niger* strain's *Aspergillus niger* spores ( $1 \times 10^5$  spores/ml medium) as inoculum. The only carbon source present in the fermentation medium was commercial citrus pectin. The enzyme was partially purified by precipitation with 20% ammonium sulphate, followed by chromatography in Sephadex G-75 and DEAE Sephadex A-50 columns. Pectinesterase yield was low in those fermentation conditions used. Fermentation crude extract presented two pH values (endo-PMG optimum pH 4.5 and 6.3). The enzymes were stable at pH values between 2.0 and 10.0. Optimum temperature was in the 40°C-45°C range. Enzymes became totally inactive at 70°C. It was also found that sodium ion concentrations greater than 0.1M inhibited endo-PMG.

Key words: Pectinases, Polygalacturonase, Polymethylgalacturonase, Pectolytic enzymes, Pectic enzymes, *Aspergillus niger*.

### INTRODUCCIÓN

Las pectinasas son un complejo enzimático cuyo sustrato son las sustancias pécticas; son producidas por plantas y microorganismos entre los cuales se encuentran bacterias como *Bacillus* y *Clostridium*, las levaduras Sac-

*charomyces* y *Rhodoturulla* y hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Verticillium* (Reed, 1975).

La pectinesterasa (PE) hidroliza los enlaces estermetílicos de la pectina de alto metoxilo, y en unión con la poligalacturonasa hidroliza

\*Química, con maestría en Bioquímica de la Universidad Nacional de Colombia. E-mail: adriana.lozano@utadeo.edu.co

\*\*Química, profesora asociada, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

eficientemente las sustancias pécticas produciendo metanol y pectato. Es una enzima altamente específica, remueve los grupos metoxilo al azar y no desesterifica completamente la pectina; su acción se detiene a cierto porcentaje de metoxilo (0,7-1,6%). (Pilnik, Voragen, 1993);

La endo-polimetilgalacturonasa (endo-PMG) hidroliza los enlaces glicosídicos de la pectina desde el interior de la cadena produciendo una rápida disminución de la viscosidad. En las frutas desempeña un papel importante en el proceso de maduración; también se ha encontrado en el tracto digestivo de algunos insectos parásitos cuya función es descomponer la pectina en los espacios intercelulares de la madera. En los microorganismos, la producción está influida por las condiciones medioambientales y la composición del medio de crecimiento. Algunos organismos producen la enzima en forma constitutiva, pero en otros, la producción depende de la presencia de sustancias pécticas inductoras en el medio de crecimiento. (Reed, 1975; Sucklig, 1990; Velásquez, 1992; Wingard, 1979).

Las enzimas pécticas se utilizan en la industria de alimentos, ya que la degradación de la pectina disminuye la viscosidad de los jugos, facilitando así procesos como clarificación, filtración y concentración de los extractos de frutas y vegetales. Numerosas compañías producen comercialmente enzimas pécticas a partir de hongos, en especial del género *Aspergillus*, mediante fermentación en sustrato sumergido o en sustrato sólido (Maldonado y Callieri, 1989; Mill y Tutobello, 1961).

Las características y especificidades de estos complejos son variables, al igual que su capacidad de acción sobre la pectina de frutas exóticas como las que se producen en países del trópico.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el potencial de una cepa nativa de *Aspergillus niger* para producir enzimas pécticas; purificar y caracterizar las actividades enzimáticas obtenidas, como paso previo a su eventual aplicación en el procesamiento de frutas tropicales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo y condiciones de fermentación

Se utilizó una cepa de *Aspergillus niger* seleccionada por su capacidad para crecer sobre pectina de guayaba, la cual fue suministrada por la doctora Graciela Chalela de la Universidad Industrial de Santander. La cepa se mantuvo en un medio sólido de pectina, minerales y agar a 4°C, con repiques cada quince días.

La fermentación se llevó a cabo en 12 erlenmeyers de 250ml cada uno con 100 ml del medio de cultivo inoculados con una suspensión de esporas, e incubados a 30°C, con agitación horizontal (amplitud 3 mm; 4,5 desplazamientos /s)

El medio para la fermentación contenía: NaNO<sub>3</sub> 3 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L; MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/L; KCl 0,5 g/L; pectina cítrica (% metoxilo 3,3%) 15 g/L y pH 5,5.

Cada seis horas se retiró un erlenmeyer; el micelio se separó del caldo de fermentación filtrando sobre varias capas de gasa y se determinó la biomasa como peso seco. En el medio de fermentación se determinó el perfil de producción de proteína como OD 280 nm, se midieron pH y actividades enzimáticas.

### Actividad de pectinesterasa

Se determinó espectrofotométricamente midiendo el cambio de absorbancia de un indicador ácido-base a 620 nm por un período de diez minutos a temperatura ambiente. El cambio es causado por la liberación de grupos ácidos. La mezcla de reacción (5,15 ml) contenía 2 ml solución de pectina cítrica 0,5% a pH 4,5, 150 µL de verde de bromocresol, 1 ml agua destilada a pH 4,5 y 2 ml de la solución enzimática a pH 4,5.

La unidad de actividad (U-PE) se definió como la cantidad de enzima que libera una micromol de ácido galacturónico por minuto en las condiciones del ensayo, y que corresponde a un delta de absorbancia de 0,22/ min (Hagerman, 1986). Los valores se determinaron sobre una curva patrón con ácido galacturónico (Sigma).

### Actividad de endo-Polimetilgalacturonasa

Se determinó midiendo la reducción de viscosidad de una solución de pectina en un viscosímetro de vidrio Cannon para líquidos opacos. La mezcla de reacción contenía 10 ml solución pectina al 2%, 2 ml buffer acetato pH 4,5 y 5 ml de caldo de cultivo. Se incubó a 35°C por 30 min, y a continuación la enzima se inactivó en un baño a ebullición por 5 minutos, se dejó enfriar y se determinó el tiempo de flujo en el viscosímetro.

El porcentaje de cambio de viscosidad se calculó de acuerdo con la ecuación de Roboz (*Mili y Tutobello, 1961; Skai y Yooshitake, 1984*).

$$\%CV = (V_o - V_m) / (V_o - V_s) \times 100$$

$V_o$  = tiempo de flujo del blanco de reactivos en segundos.

$V_m$  = tiempo de flujo de la mezcla de reacción en segundos.

$V_s$  = tiempo de flujo del blanco de enzima en segundos.

La unidad de actividad enzimática (U-PMG) se definió como la cantidad de enzima capaz de reducir en un 50% la viscosidad bajo las condiciones del ensayo.

### Purificación

Cuatro litros de caldo de fermentación se concentraron en un rotaevaporador hasta un volumen de 500 ml; la proteína se precipitó con sulfato de amonio al 20% de saturación. El precipitado se disolvió en 50 ml de agua y se desalinizó en una columna de Sephadex G-25 (1 cm x 20 cm). La proteína desalinizada se liofilizó y se redisolvió en 20 ml de buffer acetato 0.05M y pH 4,5. Se aplicaron 3 ml de la solución anterior (6 mg proteína/ml) a una columna de Sephadex G-75 (1 cm x 70 cm) equilibrada con el mismo buffer; la columna se eluyó con un flujo de 8 ml/h y se recolectaron 100 fracciones de 1 ml. Aquellas fracciones que presentaron actividad para endo-PMG se reunieron, liofilizaron y redisolviéron en 1 ml de buffer Me Ivaine pH 7; luego se aplicó sobre una columna de DEAE Sephadex A-50 (1 cm x 20 cm) equilibrada con el mismo buffer. La columna se eluyó con un gradiente lineal de pH de buffer Me Ivaine 0,075M (100 ml pH 7 y 100 ml pH 2,6) y se recolectaron 150 fracciones de 1 ml a una tasa de flujo de 15 ml/h.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la concentración del inoculo

Con el fin de establecer la concentración de inoculo más conveniente para la producción de pectinasas se emplearon esporas de *Aspergillus niger* suspendidas en agua, se ensayaron cuatro concentraciones escogidas dentro del rango de concentración de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  esporas/ml. Se realizaron tres repeticiones de cada una de las fermentaciones, y en la tabla 1 se reporta el promedio de los datos obtenidos. Se observó una relación inversa entre la actividad de endo-PMG y la concentración del inoculo.

Al utilizar un inoculo con una alta concentración de esporas se observó que el hongo creció como una masa densa que dificultó la transferencia de oxígeno y de nutrientes, lo cual explicaría la poca producción de pectinasas. A bajas concentraciones de esporas en inoculo, el hongo se desarrolló en forma de "pellets", con lo cual mejoró la producción de la enzima. Barrios y Martínez (1989), reportaron para el mismo hongo que concentraciones mayores a  $1 \times 10^6$  esporas/ml causaron inhibición en la germinación de las esporas.

En el trabajo de Maldonado y Callieri (1989) también se observó el cambio en la morfología del hongo en la producción de poligalacturonasa de *Aspergillus niger*. Cuando utilizaron concentraciones de pectina superiores a 15 g/l, se obtuvo mayor biomasa pero la producción de la enzima disminuyó; se produjeron "pellets" con estructura menos compacta y un alto crecimiento de hifas. Cuando la concentración de pectina fue de 5 g/l, se produjo la menor biomasa y la mayor actividad enzimática.

### Producción de endo-PMG y PE

Como se observa en la figura 1, la producción de endo-PMG al utilizar como inoculo una concentración de esporas de  $1 \times 10^5$  esporas/ml, se inició a las 26 horas de fermentación; la actividad se incrementó gradualmente hasta las 50 horas, coincidiendo con la fase logarítmica de crecimiento celular; disminuyó un poco y se mantuvo más o menos constante hasta las 110 horas, luego se observó un ligero aumento hasta las 135 horas y decayó finalmente después de las 140 horas.

**Tabla 1.** Efecto de la concentración del inóculo en la producción de endo-PMG y PE.

Esporas/ml	U/ml PMG	U/ml PE*
1x10 <sup>5</sup>	0,29 ± 0,02	< 0,05
5x10 <sup>5</sup>	0,25 ± 0,01	< 0,05
3x10 <sup>5</sup>	0,33 ± 0,007	< 0,05
1x10 <sup>5</sup>	0,48 ± 0,09	< 0,05

\*El método detecta mínimo 0,1 μmol de ácido galacturónico, con un delta de absorbancia de 0,035.

El pH del medio de cultivo varió durante la fermentación. Al inicio de ésta se observó un descenso del pH desde 5,5 a 4,0; a partir de las 80 horas y hasta el final de la fermentación se incrementó paulatinamente hasta alcanzar un valor de 7,0. La enzima se produjo cuando el pH estaba en el rango de 4,0-4,5.

Aguilar, Trejo *et al.* (1991) reportaron que el pH inicial de la fermentación influye en la producción de endo y exo pectinasas de *Aspergillus*; los valores de pH favorables estaban entre 2,5 y 3,5.

La máxima actividad de endo-PMG obtenida fue de 0,48 U/ml; ésta es baja en comparación con las reportadas por otros autores; Acuña, Gutiérrez *et al.* (1995) obtuvieron 150 U/ml utilizando *A. niger* en fermentación con sustrato sumergido, y 230 U/ml en fermentación con sustrato sólido. Galiotou, Kapantai *et al.* (1997) con *Aspergillus sp.* obtuvieron una actividad de 17 U/ml utilizando como fuente de carbono pectina cítrica, y de 40 U/ml utilizando remolacha. No detectaron actividad de pectinesterasa.

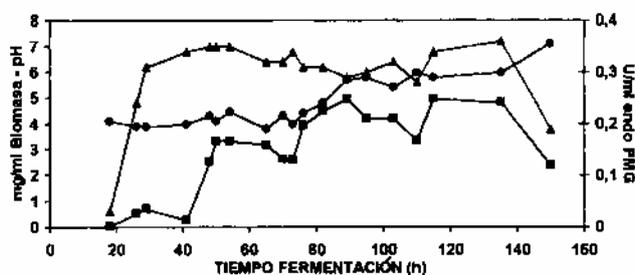
En las condiciones de fermentación empleadas en el presente estudio, la producción de pectinesterasa fue muy baja, posiblemente porque se empleó como sustrato una pectina de bajo metoxilo (% metoxilo 3,33).

Fonseca y Said (1995) reportaron que la composición del complejo pectinolítico producido por el *Penicillium frequentans*, dependía de la sustancia péctica utilizada como fuente de carbono (inductor).

## Purificación

El perfil de elución de la columna de Sephadex G-75 mostró dos fracciones bien definidas (fracción A y B), las cuales presentaron actividad para endo-PMG (figura 2). No se detectó actividad para PE. Las fracciones A y B se colocaron en una columna de DEAE Sephadex A-50. La fracción A (figura 3) se desdobló en cinco nuevas fracciones (P1 a P5) con actividad endo-PMG en la fracción P3.

La fracción B (figura 4) se desdobló en cuatro nuevas fracciones (P6 a P9) con actividad endo-PMG en la fracción P8.



**Figura 1.** Producción de Endo-PMG en función del tiempo de fermentación. Inoculo 1x10<sup>5</sup> esporas/ml. (■) pH; (▲) Biomasa mg/ml; (●) U/ml endo-PMG. Temperatura 30°C, agitación horizontal.

Los datos obtenidos (figura 2) mostraron que el *Aspergillus niger*, en las condiciones de la fermentación, produjo al menos dos isoenzimas de endo-PMG, puesto que se pudieron separar dos fracciones con esta actividad enzimática.

En otros trabajos se ha encontrado un comportamiento similar en cuanto a la producción de isoenzimas, no sólo para *Aspergillus niger* (Suckling, 1990, Jacques, Benechary *et al.*, 1999) sino también para otros microorganismos como *Aureobasidium pullulans* que presentó dos isoenzimas (Dzurova, Heinrichova *et al.*, 1997); *Aspergillus alliaceus* que presentó tres isoenzimas, (Mikhailova, Sapunova *et al.*, 1995); *Penicillium pinophilum* que presentó tres isoenzimas (Shanley, Van den Broek *et al.*, 1993) y *Penicillium frequentans* que presentó cuatro isoenzimas (Fonseca y Said, 1995).

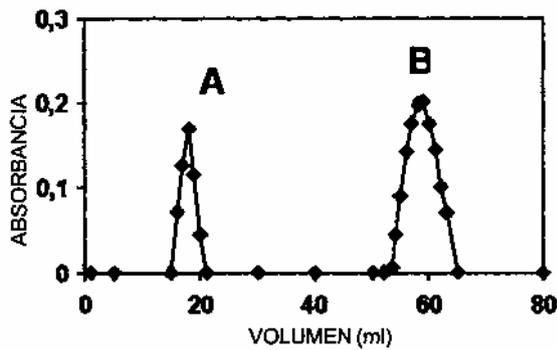


Figura 2. Diagrama de elución de proteínas del medio de fermentación en Sephadex G-75. (♦) OD 280 nm. Actividad endo-PMG en las fracciones A y B.

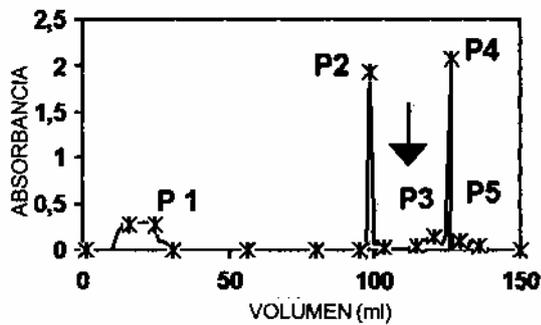


Figura 3. Diagrama de elución de la fracción A en DEAE Sephadex A-50. (X) OD 280 nm. Actividad endo-PMG en la fracción P3.

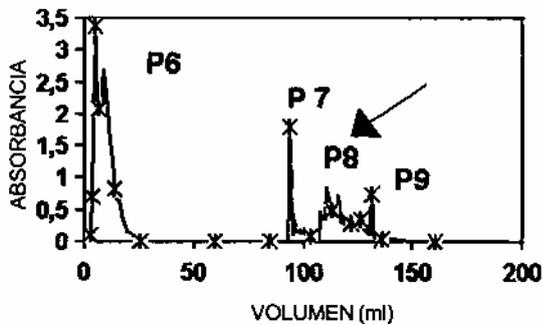


Figura 4. Diagrama de elución de la fracción B en DEAE Sephadex A-50. (X) OD 280 nm. Actividad endo-PMG en la fracción P8.

### Propiedades enzimáticas

Los extractos crudos de las fermentaciones son los productos que se utilizan comercialmente en la industria de alimentos para clarificar los jugos de frutas, siendo importante conocer las condiciones de pH y temperatura en las cuales el extracto enzimático presenta una acción más efectiva.

### Efecto del pH

La actividad de endo-PMG del extracto crudo fue medida en un rango de pH 3,0-7,5; se obtuvo máxima actividad a pH 4,5 y 6,3 (figura 5). La enzima fue estable en un rango de pH 2-10 por un período de 22 horas a temperatura ambiente.

Estos resultados refuerzan el hecho de que el *Aspergillus niger* produjo dos isoenzimas cuyos valores de pH óptimos están cercanos a 4,5 y 6,3. Estos datos son similares a los encontrados para otras cepas de *Aspergillus* como para otros microorganismos (Borin, Said *et al.*, 1996; Mikhailova, Sapunova *et al.*, 1995).

El extracto crudo es estable a pH básicos, lo que no ocurre con las poligalacturonasas estudiadas en el trabajo de Acuña, Gutiérrez *et al.* (1995), que pierden rápidamente la actividad cuando se incuban por encima de pH 6.

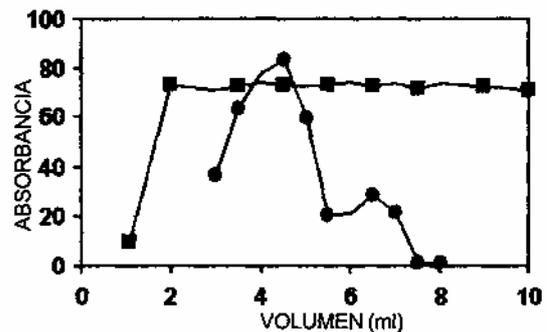


Figura 5. (●) Efecto de pH en la actividad enzimática y (■) estabilidad con respecto al pH de endo-PMG. (se utilizó buffer Me Ilvaine).

### Efecto de la temperatura

El efecto sobre la actividad endo-PMG del extracto crudo fue similar al reportado para las pectinasas producidas tanto por otras cepas de *Aspergillus niger* como por otros hongos (Amsaber e Ismail, 1996; Mikhailova, Sapunova *et al.*, 1995; Fonseca y Said, 1995).

Se estudió un rango de 20-92°C y se obtuvo máxima actividad entre 40 y 45°C. Fue estable hasta los 65°C, pero a los 70°C se inactivo completamente (figura 6).

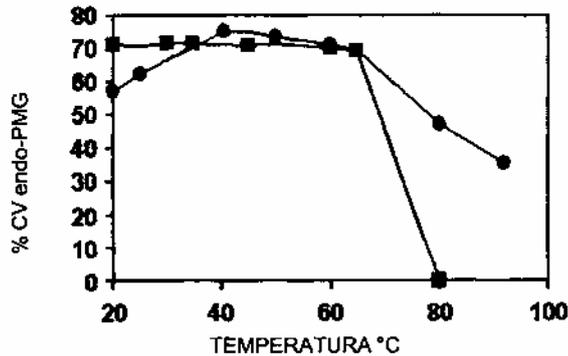


Figura 6. (●) Efecto de la temperatura en la actividad enzimática (incubación a 30°C por 30 min) y (■) estabilidad frente a la temperatura de endo-PMG. (incubación por 15 min a pH 4,5).

**Efecto de iones monovalentes**

En las poligalacturonas no se había reportado la influencia que tenían sobre la actividad enzimática iones monovalentes como sodio y potasio. La figura 7 muestra que el sodio inhibió la enzima a concentraciones mayores a 0,1 M. La enzima perdió un 46% de su actividad inicial cuando la concentración de sodio fue 0,5M.

El potasio aumentó un poco la actividad a concentraciones menores de 0,1M; a mayor concentración también inhibió la actividad enzimática pero de una manera menos drástica; a una concentración 0,5M de K<sup>+</sup> se perdió el 5,4% de la actividad inicial.

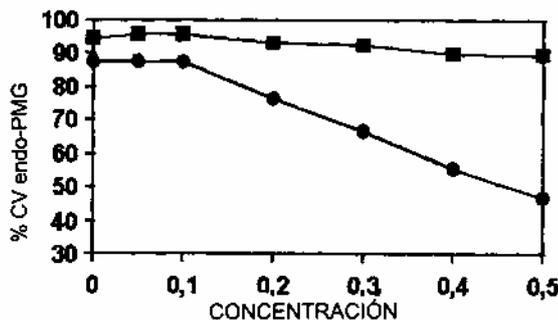


Figura 7. Efecto de la concentración de (●) NaCl y (■) KCl sobre la actividad enzimática de endo-PMG.

El efecto de los iones sobre la actividad de endo-PMG puede resultar de un efecto directo o indirecto sobre el sitio activo, ya que la fuerza iónica y la constante dieléctrica pueden alterar los valores de Pk de los grupos que intervienen en la reacción enzimática; también se cambia la ionización y la viabilidad del enlace de la enzima con el sustrato.

Sakai y Yoshitake (1984) reportaron que endopoligalacturonasa de *Klayveromyces fragilis* fue inhibida por iones Hg<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>.

**CONCLUSIONES**

La cepa nativa de *Aspergillus niger* utilizada en este estudio produjo dos isoenzimas de endo-PMG en las condiciones de crecimiento empleadas, aunque la actividad obtenida es baja comparada con las obtenidas en otros trabajos. No se produjo PE.

El pH y la temperatura en que la actividad enzimática de endo-PMG es máxima, sugieren su posible uso en el procesamiento de frutas acidas, con la ventaja de que la actividad endo-PMG se inactivaría a la temperatura de pasteurización.

Para mejorar la producción de las enzimas y así poder ser utilizadas a nivel industrial, se deben estudiar otras condiciones de fermentación.

**AGRADECIMIENTOS**

A Graciela Chalela por el suministro de la cepa de *Aspergillus niger*. A la Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química. A Colciencias y el Programa de Biotecnología y Alimentos de la OEA.

**BIBLIOGRAFÍA**

Amsaber, Ismail. 1996. Utilization of orange peéis for the production of multienzyme complex by some fungal strains. *Process- Biochemistry*. 31.7.645-650.

Acuña, M. E., Gutiérrez, M, Viniegra, G, Favela, E. 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotech* nol. 43. 808-814.

Aguilar, G., Trejo, B. A, García, J. M. y Huitron, C. 1991. Influence of pH on endo and exo pectinases production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Can.J. Microbiol.*37.912-917.

- Borin, M, Said, S. y Fonseca, M. 1996. Purification and Biochemical Characterization of an Extracellular Endo-polygalacturonase from *Penicillium frequentans*. *J. Agric. Food. Chem.* 44. 1616-1620.
- Barrios G, y Martínez C. 1989. Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* 11. 551-554.
- Dzurova, M., Heinrichova, K., Stratilova, E. y Biely, P. 1997. The Pectic enzymes complex produced by *Aureobasidium pullulans*. *Folia-Microbiol.* 41.3.279-281.
- Fonseca, M. y Said, S. 1995. Sequential production of pectinases by *Penicillium frequentans*. *World. Journal. Microbiol., Biotechnol.* 11.174-177.
- Galiotou, M., Kapantai, M. y Kalantzi, O. 1997. Growth Conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482, for Polygalacturonase Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47 A. 425-429.
- Hagerman, A. y Austin, P. 1986. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin-metilesterase. *J. Agric. Food. Chem.* 34.3.440-444.
- Jacques, A. E, Benechary, C. M., Visser, K. J. 1999. Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonase Y, II y C. *European Journal of Biotechnology*, 259,577-585.
- Maldonado, M. y Callieri, D. 1989. Influence of environmental conditions on the production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger*. *Mircen Journal.* 5.3. 327-333.
- Mili, P. y Tutobello, R. 1961. The pectic enzymes of *Aspergillus niger* 2. Endopoligalacturonase. *Biochem. J.* 79. 57-64.
- Mikhailova, R., Sapunova, L, and Lobonok, A. 1995. Three polygalacturoñases constitutively synthesized by *Aspergillus alliaceus*. *World. Journal. Microbiol, Biotechnol.* 11.330-332.
- Pilnik, W., Voragen, A. G. J. 1993. Pectic enzymes in fruit and vegetables, juice manufacture. *Enzymes in food precessing.* Academic Press. 207-217, 363-399.
- Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing.* New York: Academic Press. 107-117.
- Sakai, T. y Yoshitake, S. 1984. Purification and some properties of a protopectin solubilizing enzyme from *Galactomyces reesii* strain. *Agric. Biol. Chem.* 48.8.1941-1950.
- .Purification, crystalization and some properties of Endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* 48.8. 1951-1961.
- Shanley, N., Van den Broek, L., Voragen, A. and Coughlan, M. 1993. Physicochemical and catalytic properties of three endopolygalacturonases from *Penicillium pinophilum*. 28.199-218.
- Suckling, C. 1990. *Enzyme chemistry. Impact and Application.* London: Chapman and Hall. 324-326.
- Velásquez, M. 1992. Empleo de pectinasas en el procesamiento de frutas tropicales. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 1-5.
- Wingard, C. 1979. *Applied Biochemistry and Bioengineering.* London.: Academic Press. 30-35.