

Identificación de una levadura con capacidad macerante y caracterización parcial de sus carbohidrasas exocelulares

Identification of a yeast with maceration capacity and partial characterization of the extracellular carbohydrases

Martos MA (1), Zubreski ER (1), Combina M (2), Vita CE (3), Hours RA (3)

(1) FCEQyN, UNAM. Posadas, Argentina Félix de Azara 1552. (3300) Posadas, Misiones.

(2) EEA Mendoza, Centro Regional Mendoza. San Juan, INTA.

(3) CINDEFI (UNLP; CCT-La Plata, CONICET).

amartos@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

Estudios previos demostraron que una levadura autóctona, aislada de frutas cítricas, produce extractos enzimáticos con capacidad macerante de tejidos vegetales (papa, mandioca). El objetivo del presente estudio fue identificar dicha levadura por métodos moleculares e identificar las actividades enzimáticas posiblemente involucradas en el proceso de maceración.

La identificación de la levadura se realizó mediante amplificación de la región entre los genes 18S rRNA y 28S rRNA utilizando los primers ITS1 e ITS4, seguido de digestión con enzimas de restricción (*Hinf I*, *Cfo I* y *Hae III*). El fragmento amplificado, 5.8S-ITS rRNA, fue secuenciado para confirmar su identidad.

La levadura fue identificada como *Pichia anomala*. En sobrenadantes de cultivo se detectaron dos isoenzimas con actividad de poligalacturonasa (PG) de tipo endo; no se detectó actividad de pectinliasa, pectatoliasa, pectinesterasa, celulasa ni xilanasa.

ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that enzymatic extracts from a wild-type yeast isolated from citrus fruit peels display macerating activity of plant tissues (i.e. potato, cassava, etc.).

The aim of the present study was to identify the wild-type yeast by molecular methods and characterize the enzymatic activities possibly involved in the maceration process.

Molecular identification of the wild-type yeast was performed by amplification of the 18S and 28S rRNA regions using ITS1 and ITS4 primers followed by digestion with restriction enzymes (*Hinf I*, *Cfo I* and *Hae III*). The species assignation was also confirmed by sequence analyses of the 5.8S-ITS rRNA region.

The wild-type yeast was identified as *Pichia anomala*. Two isoenzymes with PG activity were found in culture supernatants, whereas cellulase, xylanase, pectinlyase, pectatelyase and pectinesterase activities were not detected.

PALABRAS CLAVE: *Pichia anomala*, poligalacturonasa, maceración.

KEYWORDS: *Pichia anomala*, polygalacturonase, maceration.

INTRODUCCIÓN

Las sustancias pécticas se encuentran principalmente en la pared celular primaria y en la región intercelular de los tejidos vegetales. Estas sustancias son hidrolizadas por enzimas pécticas, que se pueden encontrar en los mismos vegetales o bien ser producidas por diferentes microorganismos (García *et al.* 2002). Las enzimas pécticas constituyen un sistema enzimático que incluye esterasas y enzimas depolimerizantes. Entre las esterasas se encuentra pectinesterasa (PE) y entre las depolimerizantes se incluyen poligalacturonasas (PG) y pectinliasas (PL). PE hidroliza los ésteres metílicos de la molécula de pectina liberando metanol. PG y PL actúan sobre los enlaces glicosídicos, por hidrólisis en el caso de PG o por β -eliminación formando oligosacáridos ácidos insaturados en el caso de PL. Las PG se clasifican según su modo de acción en: endo-poligalacturonasas (endo-PG), que

hidrolizan los enlaces glicosídicos internos α -1,4 del ácido péctico produciendo una rápida caída en la viscosidad, y en exo-poligalacturonas (exo-PG), que actúan sobre el extremo no reductor del sustrato, liberando ácido monogalacturónico (Rombouts y Pilnik 1980).

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 (Kashyap *et al.* 2000, Ranveer *et al.* 2005, Nighojkar 2006). La maceración enzimática presenta algunas ventajas sobre la disgregación mecánica ya que conserva intactos aromas, pigmentos y otros componentes celulares, pues las células que los contienen no se destruyen. Este tratamiento es de interés en la producción de néctares de frutas, en la elaboración de purés vegetales (papa, zanahoria, etc.) y de alimentos infantiles en general, así como también en el tratamiento preliminar del café, cacao y fibras de plantas con el fin de eliminar la pulpa de fruta no deseada (Call *et al.* 1985, Ishii 1971, Nakamura *et al.* 1995).

Estudios previos demostraron que una levadura autóctona, aislada de frutas cítricas en Misiones, que crece en un medio líquido con glucosa y pectina de citrus como fuentes de carbono e inductor de la actividad pectinolítica, produce enzimas exocelulares con capacidad macerante de tejidos vegetales (papa, mandioca). El objetivo del presente estudio fue identificar dicha levadura por métodos moleculares e identificar las actividades enzimáticas posiblemente involucradas en el proceso de maceración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Se utilizó la cepa 111 aislada en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNAM, a partir de frutas cítricas en descomposición.

Medios de cultivos

Mantenimiento. Extracto de levadura (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), 5 g/l; triptona (Bacto/Becton Dickinson and Co, Sparks, Md.) 5 g/l; glucosa bacteriológica (Britania, Buenos Aires), 10 g/l; agar (Britania), 18 g/l; pH: 5,0.

Producción de enzimas. Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco/Becton Dickinson and Co, Sparks, Md., EE.UU), 6,7 g/l; glucosa bacteriológica (Britania), 5,0 g/l y pectina cítrica (Parafarm, Buenos Aires, Argentina), 5,0 g/l (Blanco *et al.* 1999). El medio de cultivo con sus componentes fue esterilizado a 121 °C, 1 atm., durante 15 min., excepto la solución de YNB, la que se esterilizó en forma separada por filtración a través de membranas de celulosa (0,45 μ m, Sartorius AG, Goettingen).

Identificación de la cepa 111

La extracción de ADN se realizó aplicando extracción química/mecánica con fenol (Hoffman y Winston 1987). Se realizó PCR del fragmento 5.8S-ITS utilizando los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), seguido de digestión con enzimas de restricción (*Hinf* I, *Cfo* I y *Hae* III) (5.8S-RFLP) (Invitrogen S.A.) (Guillamón *et al.* 1998, Fernández Espinar *et al.* 2000). Los resultados de RFLP fueron contrastados con la base de datos para identificación de levaduras (UV-CSIC, 2009). El fragmento amplificado fue secuenciado para confirmar su identidad utilizando el kit comercial Premix Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, Warrington, UK), según las instrucciones del proveedor basado en el método de Sanger. La reacción de secuenciación se analizó en un equipo 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Warrington, UK). Las secuencias fueron comparadas mediante BLAST (Basic Lineal Alignment Search Tool) en las bases de datos disponibles en la página web del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) (NCBI, 2009).

Producción de enzimas

Se inocularon frascos Erlenmeyer de 500 ml que contenían 95 ml del medio de fermentación con 5 ml de inóculo ($DO_{620} = 0,96$). Los mismos se incubaron a 30 °C con agitación (150 rpm). Luego de 3 días se centrifugó el cultivo a 4.000 rpm durante 10 min, a 5 °C. El sobrenadante se conservó a -18 °C hasta su utilización como fuente de enzima extracelular. Parte del sobrenadante se liofilizó y disolvió en buffer ácido acético-acetato de Na (AcB) (20 mM, pH 5,0), utilizando un décimo del volumen de suspensión original, para preparar sobrenadante concentrado 10 \times .

Determinación de actividades enzimáticas

Actividad PG, celulasa y xilanasa. Los sustratos empleados fueron ácido poligalacturónico (APG) (P-3889, Sigma), carboximetilcelulosa (CMC) (C-4947, Sigma) o xilano (X-4252, Sigma) al 0,2 % en buffer AcB (20 mM, pH 5,0). Para la determinación se incubaron 1,45 ml de la solución de sustrato con 50 μ l de sobrenadante del cultivo (dilución 1/10 v/v para PG o concentrado 10 \times para las otras actividades enzimáticas) a 37 $^{\circ}$ C durante 10 min y se determinó la concentración de los grupos reductores liberados con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (D-0550, Sigma) (Miller 1959). Como referencia se utilizó ácido galacturónico (AG) (G-2125, Sigma) para la determinación de PG y glucosa (G-8270, Sigma) para la actividad de celulasa y xilanasa. En los casos en que no se detectó actividad en 10 min de incubación, se repitió el ensayo con incubación durante 24 h para verificar si había hidrólisis de los sustratos. Una unidad enzimática (UE) de PG se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol del monómero por min en las condiciones de ensayo.

Actividad pectinliasa y pectatoliasa. Como sustratos se emplearon pectina de citrus (P-9135, Sigma) y APG al 0,5 % en AcB (20Mm, pH 5,0) para medir actividad pectinliasa (PL) y pectatoliasa (PAL), respectivamente. Para las determinaciones se incubaron 500 μ l de la solución de sustrato con 10 μ l del sobrenadante concentrado 10 \times ; se registró continuamente la variación de absorbancia a 235 nm con un espectrofotómetro Beckman DU 640, a 37 $^{\circ}$ C, hasta los 30 min (Albersheim 1966).

Actividad PE. Se determinó por cambio de color de una solución de verde de bromocresol (Anedra) durante el curso de la reacción a 37 $^{\circ}$ C. La mezcla de reacción consistió en 500 μ l de la solución de sustrato (10 vol de pectina de citrus (P-9135, Sigma) 0,5 % en agua y 1 vol de verde de bromocresol 0,02 % en agua, la solución se ajustó a pH 5,0) y 10 μ l del sobrenadante concentrado 10 \times . La medida espectrofotométrica se efectuó a 614 nm (Villariño *et al.* 1993).

Modo de acción de PG

Para estudiar el cambio de viscosidad resultante de la acción de PG sobre APG se colocaron 8,7 ml de solución de APG 0,5 % en buffer AcB (20 mM, pH 5,0) y 0,3 ml del sobrenadante de cultivo (dilución 1/10 v/v) en un viscosímetro Cannon-Fenske serie 100. La mezcla de reacción se incubó a 37 $^{\circ}$ C y se midió el porcentaje de reducción de viscosidad en función del tiempo de reacción. Se determinó la concentración de los grupos reductores liberados con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), según se describió más arriba. El análisis de los productos de hidrólisis se hizo por cromatografía en capa delgada, colocando 10 μ l de la mezcla de reacción inactivada (100 $^{\circ}$ C por 5 min) en placas de Silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany); la cromatografía fue realizada de modo ascendente con n-butanol: ácido acético: agua (9:4:7 v/v/v). Como patrón se utilizó AG. La detección de los productos de reacción se realizó pulverizando sobre la placa una solución al 3 % de ácido fosfomolibdico y 10 % de H₂SO₄ en etanol; las placas fueron calentadas por 5 min a 105 $^{\circ}$ C para desarrollar color.

Análisis de proteínas por cromatografía líquida

El sobrenadante de cultivo concentrado 10 \times se desionizó en columna PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala) equilibrada con AcB (20 mM, pH 5,0). Las muestras (1 ml) se inyectaron en una columna MonoQ (Amersham Pharmacia Biotech), acoplada a un FPLC AKTA (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con el mismo buffer. Las proteínas fueron eluidas con buffer de equilibrio seguido por un gradiente de NaCl (0 - 0,5 M). El caudal fue 1 ml/min. Se colectaron fracciones de 1 ml, a las que se determinó actividad PG.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación

En la **Tabla 1** se muestran los perfiles de amplificación y restricción para la cepa estudiada y el perfil de restricción de la especie que más homología presentó en su patrón de restricción con la cepa 111. La restricción mostró un patrón diferente a las cepas de referencia disponibles en la base de datos del GeneBank (NCBI, 2009), lo que se atribuye a una posible mutación en un nucleótido que modifica un sitio de restricción de la enzima **Cfo I** (Tabla 1), por lo que la identidad del aislamiento fue confirmada mediante secuenciación. La levadura aislada fue identificada como *Pichia anomala* por el perfil de restricción obtenido y la homología en la secuencia de nucleótidos del fragmento 5.8S-ITS.

Tabla 1: Perfiles de amplificación y restricción de la levadura 111 y de *Pichia anomala*.

Cepa	Amplificado	<i>Hinf I</i>	<i>Cfo I</i>	<i>Hae III</i>
111	600	320 + 280	290 + 260	600
<i>Pichia anomala</i>	630	320 + 270	630	630

Caracterización parcial de actividad enzimática exocelular

Pichia anomala fue capaz de producir PG (52 UE/ml) en medio líquido, con glucosa y pectina de citrus como fuente de carbono y energía e inductor, respectivamente. No se detectó actividad PL ni PAL en los sobrenadantes de cultivo concentrados. Luego de 24 h de incubación no se evidenció cambio de color del indicador de pH en los tubos que contenían pectina de citrus y verde de bromocresol, indicando ausencia de actividad PE. Tampoco se detectaron otras enzimas capaces de hidrolizar polímeros de la pared celular, como ser celulasa y xilanasas,

Resultados similares fueron obtenidos con *Kluyveromyces marxianus*, una levadura aislada del medio de fermentación de la pulpa de café (García *et al.* 2002) y otra levadura de la misma especie pero aislada del medio de fermentación de cacao (Schwan *et al.* 1997), cuyos extractos enzimáticos presentaron actividad PG sin actividad de PL o PAL detectables. Sin embargo, algunas levaduras pueden producir liasas, tal es el caso de *Kluyveromyces fragilis*, levadura aislada también de la fermentación de la pulpa del café (García *et al.* 2002).

En la cromatografía de intercambio aniónico (**Figura 1**) se detectó la elución de dos proteínas con actividad PG (fracción 1 a 4 y fracción 8 a 11), lo que se atribuye a dos isoenzimas con esa actividad.

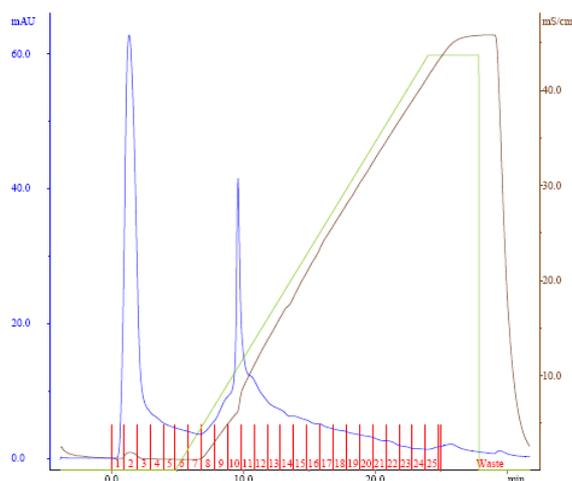


Figura 1. Perfil de elución del sobrenadante de cultivo de *P. anomala* obtenido en la cromatografía de intercambio iónico.

Modo de acción de PG

La **Figura 2** muestra la reducción de viscosidad e incremento de grupos reductores en función del tiempo de reacción de una solución de APG al por acción del sobrenadante de cultivo de *P. anomala*. El sobrenadante rápidamente redujo la viscosidad de la solución de APG. La viscosidad disminuyó cerca de un 50 % en 10 min cuando solamente el 9 % de los enlaces glicosídicos del sustrato fueron hidrolizados. Este comportamiento es característico de las PG que actúan por un mecanismo de tipo endo (endo-PG) (Call y Emeis 1985, Yoshitake *et al.* 1994). La cromatografía en capa delgada de los productos de hidrólisis de APG mostró que el polímero fue inicialmente hidrolizado a oligómeros, formándose además pequeñas cantidades de AG cuya concentración fue aumentando con el tiempo de reacción. Resultados similares fueron informados para PG producidas por *Kluyveromyces wickerhamii* (Moyo *et al.* 2003), *K. marxianus* (Schwan *et al.* 1997) y *Candida macedoniensis* (Call *et al.* 1985), las que actuaron sobre los enlaces glicosídicos al azar.

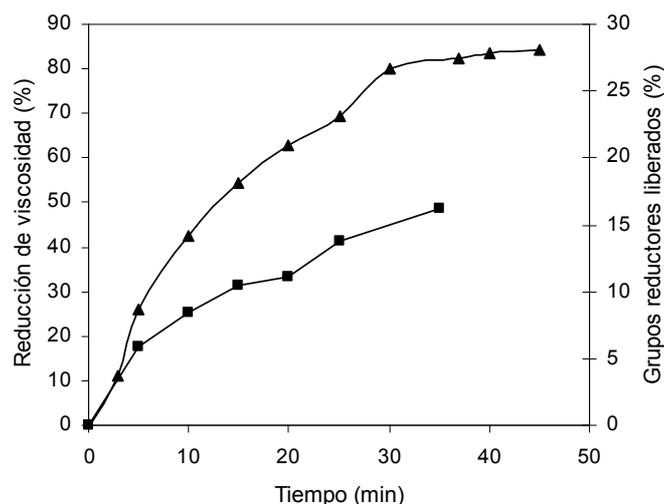


Figura 2: Hidrólisis de ácido poligalacturónico con sobrenadante de cultivos de de *P. anomala*.
 -▲-: reducción de viscosidad. -■-: grupos reductores liberados.

CONCLUSIONES

La levadura aislada fue identificada como *Pichia anomala*. Los resultados obtenidos mostraron que esta levadura posee un sistema pectolítico constituido fundamentalmente por dos isoenzimas con actividad poligalacturonasa., cuyo modo de acción es preferentemente del tipo endo, las que serían responsables de la capacidad de maceración de los tejidos vegetales de esta cepa.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Albersheim P, Neukom H, Deuel H. 1960. Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. Arch. Biochem. Biophys., 90: 46-51.
- Blanco P, Sieiro C, Villa TG. 1999. Production of pectic enzymes in yeasts. Mini Review. FEMS Microbiol. Lett., 175: 1-9.
- Call HP, Walter J, Emeis CC. 1985. Maceration activity of an endopolygalacturonase from *Candida macedoniensis*. J. Food Biochem., 9: 325-348.
- NCBI, 2009. Centro Nacional de Información de Biotecnología. Instituto Nacional de Salud (NIH) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Fernández Espinar MT, Esteve Zarzoso B, Querol A, Barrio E. 2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of yeasts. Antonie Van Leeuwenhoek, 78: 87-97.
- García AR, Balbín MI, Cabrera JC, Castelvi A. 2002. Actividad endopoligalacturonasa de un preparado de la levadura *Kluyveromyces marxianus* aislada de la pulpa de café. Cultivos Tropicales, 23: 67-72.
- Guillamón JM, Sabate J, Barrio E, Cano J, Querol A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer ITS region. Arch. Microbiol., 169: 387-392.
- Ishii S, Yokotsuka T. 1971. Maceration of plant tissues by pectin trans-eliminase. J. Agric. Food Chem., 20: 787-791.

- Hoffman CS, Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently release autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene*, 57: 267-272.
- Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. 2000. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technol.*, 77: 215-227.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426–428.
- Moyo S, Gashe BA, Collison EK, Mpuchane S. 2003. Optimizing growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. *Int. J. Food Microbiol.*, 85: 87-100.
- Nakamura T, Hours RA, Sakai T. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *J. Food Sci.*, 60:468-472.
- Nighojkar S, Phanse Y, Sinha D, Nighojkar A, Kumar A. 2006. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. *Process Biochem.*, 41: 1136-1140.
- Ranveer SJ, Shivalika S, Reena G. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.*, 40: 2931–2944.
- Rombouts FM, Pilnik W. 1980. *Microbial Enzymes and Bioconversions*. Ed. A.H. Rose. Academic Press, London. Vol. 5.
- Schwan RF, Cooper RM, Wheals AE. 1997. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme Microb. Technol.*, 21:234-244.
- (UV-CSIC) 2009. Universidad de Valencia–Centro Superior de Investigaciones Científicas.. Base de datos para la identificación de levaduras utilizando 5.8S-ITS RFLP. <http://yeast-id.com>.
- Vilariño C, Del Giorgio JF, Hours RA, Cascone O. 1993. Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. *Lebensm-Wiss U-Technol.*, 26: 107-110.
- Yoshitake S, Numata T, Katsuragi T, Hours RA, Sakai T. 1994. Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. *J. Ferment. Bioeng.*, 77:370-375.