

CONCENTRACIÓN DE PECTINASAS POR ULTRAFILTRACIÓN CON MEMBRANAS DE POLISULFONAS

Carlos da Silva^{1,2}, Mauricio M. Silveira¹, Raul Riveros² y Mára Zeni^{1,2*}

1) Instituto de Biotecnología Universidad de Caxias do Sul, 95001-970 CAXIAS do SUL-Rs. Brasil

2) Departamento de Física y de Química. Universidad de Caxias do Sul, 95001-970 CAXIAS do SUL-Rs. Brasil. Correo electrónico: mzandrad@ucs.br

RESUMEN

En este artículo, se ha estudiado el método de ultrafiltración, utilizando membranas sintéticas de polisulfonas, con el fin de concentrar pectinasas obtenidas por un proceso de fermentación inmerso. Los caldos pectinolíticos producidos por *Aspergillus oryzae* CCT 3940 fueron sometidos a ultrafiltración en un sistema tangencial con membranas de Peso Molecular medio entre 10.000 y 30.000 g/mol. También fue evaluado el efecto de la adición de solución acuosa de NaCl, entre 1,0 y $2,5 \cdot 10^{-4}$ molL⁻¹, sobre el caldo enzimático, con la finalidad de aumentar la selectividad de las membranas. Considerando la actividad enzimática y el contenido proteínico de los fermentados, las membranas polisulfónicas de 10.000 g/mol mostraron mayor selectividad, observándose un efecto favorable de la solución acuosa de NaCl, a partir de concentraciones de $1,5 \cdot 10^{-4}$ molL⁻¹. Estos resultados parecen estar relacionados con la distribución del peso molecular de las proteínas con los poros de las membranas.

Palabras claves: Pectinasas, ultrafiltración, membranas, polisulfona

INTRODUCCIÓN

Las pectinasas desempeñan un importante papel en la industria de alimentos, en la extracción y clarificación de jugos de frutas y vinos, en la maceración de vegetales y frutas, visando facilitar los procesos de extracción de diferentes óleos vegetales y en la producción de alimentos infantiles (1-3). Otra importante aplicación de las pectinasas está en la industria textil, específicamente en el tratamiento de fibras naturales como rami y lino (4). Como aplicación potencial de las pectinasas se estudia actualmente su empleo en la extracción de aceites esenciales de frutas cítricas, productos de alto valor comercial.

De una forma general, las enzimas, dependiendo de sus características, pueden ser concentradas por evaporación del agua, precipitación con sales y disolventes orgánicos, por el uso de métodos envolviendo membranas de ultrafiltración. Estudios realizados por Snir et al. (7, 8) mostraron que, para la ultrafiltración de pectinestereasas en membranas de polisulfona con peso molecular medio de retención entre 10.000 e 100.000 g/mol, los mejores resultados fueron alcanzados con las membranas de 10.000 g/mol, a pH 3,8. Para el mismo sistema, Charnay et al. (9) demostraron un efecto positivo de la adición de soluciones acuosas de NaCl o CaCl₂ a la solución enzimática, como forma de mejorar la permeabilidad.

Para la extracción de aceites esenciales desde frutas cítricas, que es el principal interés de la línea de investigación al cual pertenece este estudio, las enzimas pectinolíticas utilizadas no necesitan tener un alto grado de pureza, pudiendo ser apenas concentradas. De esta forma, en este trabajo, se ha estudiado el método de ultrafiltración, usando membranas sintéticas comerciales, con la finalidad de obtener un concentrado de pectinasas a partir de un proceso fermentativo inmerso de *Aspergillus oryzae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparaciones enzimáticas. Los caldos pectinolíticos utilizados en los ensayos fueron obtenidos por un proceso de fermentación inmerso, con *Aspergillus oryzae* CCT 3940, en un medio de cultivo descrito por Malvessi (10). Fue utilizado un biorreactor BIOSTAT B (B. BRAUN BIOTECH, RFA) con capacidad máxima de 5L con 3,5 L un volumen de medio, equipado con tres turbinas de paletas planas. El sistema fue operado a 28°C, con agitación y aire variable con el fin de mantener la concentración de oxígeno disuelto con un 30% de saturación. El pH inicial para la producción de pectinasas fue 4,0. Los medios de cultivo conteniendo las enzimas fueron filtrados y centrifugados a 4.000 rpm por 5 minutos para remover sólidos.

Procedimiento experimental. En los ensayos de ultrafiltración, fue utilizado un reservorio de doble camisa, con capacidad para almacenar 500 mL de muestra, con circulación de agua a una temperatura entre 2 y 4°C. La temperatura de recirculación del caldo en el sistema varió entre 27 y 29°C, la temperatura de circulación externa fue mantenida con un baño refrigerado a 5°C. La recirculación del caldo enzimático se llevó a cabo con una bomba FAMAC (1/3 CV; 3.500 rpm). Para el proceso de ultrafiltración fue utilizado un compresor de aire QUIMIS (modelo Q.355 B 2.VC; 1,4 HP) mantenido a una presión mínima de 2 bar y conectado a través de mangueras al reservorio de doble camisa.

La celda de ultrafiltración, construida en acero inoxidable permitió la utilización de los sistemas directo y tangencial. En controles preliminares, la forma de alimentación directa se mostró ineficaz, ya que aparecieron problemas de flujo, obstrucción de la membrana por entupimiento y baja permeabilidad y, por lo tanto, fue necesario utilizar el sistema de filtración tangencial en todos los ensayos.

Los tipos de membranas utilizados en los ensayos son mencionados en el texto. Las membranas de polisulfona evaluadas son referidas por su capacidad de retener masas moleculares medias de proteínas, expresas en g/mol

Métodos analíticos. La determinación de la actividad de las pectinasas fue efectuada por el método de reducción de viscosidad (10). En esta técnica, 3,2 mL de los convenientemente diluidas fueron mezcladas con 14,8 mL de solución 1% (p/v) de pectina cítrica en tampón ácido acético/acetato 0,05 M pH 4,0. La reducción de la viscosidad fue evaluada en un viscosímetro Brookfield modelo DV-II⁺. Entre tanto siendo que la reducción de la viscosidad es consecuencia de la acción de diferentes enzimas del complejo pectínico, por esta técnica, se evalúan principalmente la actividad de la endopoligalactouranasa, enzima que tiene como característica la quiebra de enlaces centrales de la cadena pectínica. Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que reduce en 50% la viscosidad de la solución en un tiempo de 30 minutos de reacción a 30°C.

El contenido proteico de las muestras fue determinado a través del método descrito por Bradford (11) y con solución acuosa de albúmina bovina como patrón.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de la realización de los ensayos de ultrafiltración, considerándose la posibilidad de pérdida de actividad del complejo pectinolítico, en función de las temperaturas relativamente altas, que pueden ser alcanzadas durante el proceso, fueron realizados ensayos de termo-estabilidad con el caldo enzimático. En la Tabla 1, son presentados los resultados obtenidos para la actividad pectinolítica, en ensayos en que el sistema enzimático fue sometido a cinco temperaturas diferentes, mostrando una excelente estabilidad hasta 50°C por tres horas de exposición.

Tabla 1. Evaluación de la termoestabilidad de las pectinasas desde *Aspergillus oryzae*, después de tres horas de exposición a diferentes temperaturas (actividad enzimática original entre 140 y 150 U.mL⁻¹)

| Temperatura (°C) | Actividad enzimática (U.mL ⁻¹) |
|------------------|--|
| 10 | 140 |
| 20 | 146 |
| 30 | 148 |
| 40 | 147 |
| 50 | 148 |

En el proceso de ultrafiltración de las pectinasas fueron evaluadas preliminarmente los tipos de membranas, utilizando como parámetro de análisis el contenido proteico y la actividad de la endo-galactouranasa son relacionadas: membranas de epoxi-diacrilato (MZA) da UCB Chemical (Ebecryl 616), producidas por el Departamento de Física y Química de la Universidad de Caxias do Sul, RS, Brasil (12); membranas de acetato de celulosa (Sartorius), con poros de 0,45 µm; membranas Durapore[®] (difluoruro de polivinilideno, Millipore[®]), con poros de 0,47 µm y membranas de polisulfona (Millipore[®]), con capacidad de retención de moléculas con tamaños comprendidos entre 10.000 y 30.000 g/mol

Los tres primeros tipos de membranas no mostraron selectividad para pectinasas, una vez que en la solución enzimática inicial sometida a concentrar, la fracción permeada y la no permeada presentaron prácticamente la misma actividad enzimática y concentración proteínico. Cuando se utilizaron membranas de polisulfona se obtuvieron mejores resultados, que discutiremos a continuación más detalladamente.

Membranas de polisulfonas de 10.000 g/mol fueron empleadas inicialmente en la ultrafiltración de pectinasa, con caldo enzimático con un pH corregido en 5,5 y soluciones acuosas de NaCl de concentraciones 1,0; 1,5; 2,0; 2,5x10⁻⁴ mol.L⁻¹, respectivamente. La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 2. Contenido proteico y actividad enzimática en la UF con membranas de polisulfona de 10.000 g/mol, en pH 5,5 y diferentes concentraciones de NaCl.

| NaCl 10^{-4} (mol/L) | Contenido protéico (mg.mL ⁻¹) | | | Actividad enzimática (U.mL ⁻¹) | | |
|------------------------------|---|----------|-------------|--|----------|-------------|
| | Solución Inicial | Permeado | No Permeado | Solución inicial | Permeado | No permeado |
| 1 | 0,21 | 0,10 | 0,23 | 162 | 86 | 204 |
| 1,5 | 0,22 | 0,06 | 0,29 | 162 | 75 | 251 |
| 2,0 | 0,21 | 0,06 | 0,28 | 162 | 79 | 249 |
| 2,5 | 0,21 | 0,05 | 0,28 | 163 | 79 | 248 |

Los datos en la ultrafiltración, con diferentes concentraciones de NaCl presentaron variaciones significativas con respecto a la actividad enzimática. También es posible observar que el contenido proteico de las fracciones permeadas y no permeadas son claramente diferentes de las encontradas en el caldo enzimático inicial, demostrando que las membranas de polisulfona utilizadas presentan selectividad para enzimas pectinolíticas. Puede ser activado también, que en las cuatro soluciones de cloruro de sodio las membranas de polisulfonas de 10.000 g/mol fueron selectivas. En las concentraciones de NaCl superior a $1,5 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, la eficiencia de estas membranas no fue muy diferente, indicando poca influencia en la selectividad.

Fueron realizados cálculos de balance de masa para el contenido proteico de las fracciones de permeados y no permeados usándose la siguiente expresión

$$V.CPSI = VPCPP + VNP.CPNP$$

donde V el volumen de caldo enzimático (mL), CPSI el contenido proteico de la solución inicial (mg/mL), VP el volumen del permeado (mL), CPP el contenido proteico del permeado (mg/mL), VNP el volumen del no permeado (mL) y CPNP el contenido proteico del no permeado (mg/mL)

Los balances de materia de las proteínas en este ensayo son presentados en la Tabla 3 y muestran una excelente confiabilidad en los análisis.

Tabla 3 Balance de materia de las proteínas en el proceso de ultrafiltración ensayado con membranas de polisulfona de 10.000 g/mol.

| Ensayos | Balance de materia de proteína total |
|-----------|--|
| P10 – P14 | 500 mL.0,21 mg/mL = 131 mL.0,10 mg/mL + 369 mL.0,23 mg/mL 105 mg ≈ 99,5 mg (desviación estándar: 3,88) |
| P15 – P19 | 500 mL.0,22 mg/mL = 141 mL .0,06 mg/mL + 359 mL.0,29 mg/mL 110 mg = 112,57 mg (desviación estándar: 1,81) |
| P20 – P24 | 500 mL.0,21 mg/mL = 142 mL .0,06 mg/mL + 358mL.0,28 mg/mL 105 mg ≈ 108,76 mg (desviación estándar: 2,45) |
| P25 – P29 | 500 mL.0,21 mg/mL = 140 mL.0,05 mg/mL + 360mL.0,28 mg/mL 105 mg ≈ 107,8 mg (desviación estándar: 1,97) |

Debido a que la actividad enzimática no es directamente proporcional a la concentración proteica, después de los ensayos las soluciones obtenidas (permeado y no permeado) fueron nuevamente mezcladas y la actividad enzimática medida. La actividad presentada por esta mezcla (160 U/mL) fue prácticamente idéntica a la medida en el caldo enzimático inicial (162 U/mL), demostrando que el proceso de ultrafiltración no provoca pérdidas de la capacidad catalítica da enzima.

Membranas de polisulfona de pesos moleculares de 30.000 g/mol fueron estudiadas en las mismas condiciones y los resultados de estos ensayos (véase la Tabla 4), mostraron

variaciones significativas tanto con la actividad enzimática como con el contenido proteico de las fracciones permeadas y no permeadas y del caldo enzimático. Los flujos del permeado y la permeabilidad de las membranas de 30.000 g/mol fueron superiores a los encontrados con membranas de 10.000 g/mol debido a la mayor porosidad. Entretanto se constata que la selectividad de las membranas de polisulfona de 30.000 g/mol es menor que la de las de 10.000 g/mol concordando con los resultados de Snir et al. (7) para pectinasas.

Tabla 4. Contenido proteico y actividad enzimática en la ultrafiltración con membranas de polisulfona 30.000 g/mol, con pH 5,5 a diferentes concentraciones de solución de NaCl.

| NaCl $10^{-4}(\text{mol.L}^{-1})$ | Contenido protéico (mg.mL^{-1}) | | | Actividad enzimática (U.mL^{-1}) | | |
|--------------------------------------|--|----------|-------------|---|----------|-------------|
| | Solución Inicial | Permeado | No Permeado | Solución inicial | Permeado | No permeado |
| 1 | 0,20 | 0,13 | 0,20 | 161 | 111 | 143) |
| 1,5 | 0,21 | 0,08 | 0,23 | 160 | 98 | 175 |
| 2,0 | 0,20 | 0,08 | 0,25 | 162 | 101 | 171 |
| 2,5 | 0,20 | 0,09 | 0,25 | 162 | 100 | 170 |

Mismo que la masa molar de pectinasas de *Aspergillus oryzae* CCT3940 no haya sido descrita en la literatura, para otros hongos filamentosos, Rombouts y Pilnik (13) describen masa molecular superior a 35.000 g/mol para endo-poligalactouronase. Estos resultados, por lo tanto, pueden estar relacionados a masas molares menores de pectinasas de *Aspergillus oryzae* CCT3940, en relación a los de otros microorganismos, indicando la

necesidad de esta determinación para una correcta definición de la membrana a ser utilizada.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permiten las principales conclusiones:

- Membranas de epoxi-diacrilato, acetato de celulosa y difluoruro de polivinilideno no son selectivas para la ultrafiltración de las pectinasas.
- Los mecanismos de retención de pectinasas por membranas de polisulfona parecen estar relacionados a la distribución molecular de las proteínas y de los poros de las membranas.
- Membranas de polisulfonas de 10.000 g/mol mostraron selectividad y capacidad de retención superior a las obtenidas con membranas de 30.000 g/mol, probablemente debido a la masa molecular de las proteínas .
- La adición de un electrólito a la preparación enzimática favorece el transporte de la membrana con concentraciones de NaCl de 1,5 y $2,5 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, en pH 5,5 respectivamente proporcionaron un aumento de la selectividad en ambas membranas de polisulfona testadas.

Agradecimientos. Los autores agradecen a SCT/RS., a la CAPES y a la UCS por el apoyo para realizar este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alkorta, I. Garbisu, C. Llama, M.J. y Serra, J.L., (1998), *Process Biochem.*, **33**, 21-28.
2. Freitas, S.P. y Couri, S., (1999), *Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática*, 4, V-11.
3. Roumbouts, F.M. y Pilnik, W., en ROSE, A.H. ed., (1980), *Economic Microbiology*, London: Academic Press, V. 5, p. 227.

4. Baracat, M.C., Vanetti, M.C.D., Araújo, E.F. y Silva D.O. (1991), *Biotechnol. Lett.*, **13**, 693-696.
5. Paroul, N., Atti-Serafini, L. y Dillon, A.J.P., (1995), *Simpósio de Ciência e Tecnologia da Universidade de Caxias do Sul*, **1**, 55.
6. Pedruzzi, I. y Silveira, M.M., (2001), *Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS*, **9**, 107.
7. Snir, R., Koehler, P.E., Sims, K.A y Wicker, L., (1995), *J. Agricult. Food Chem.*, **43**, 1157-1162.
8. Snir, R., Koehler, P.E., Wicker, L. y Sims, K.A., (1995), *J. Agricult. Food Chem.*, **44**, 2040-2053.
9. Charnay, D., Nari, J. y Noat, G., (1992), *Eur. J. Biochem.*, 711-714.
10. Malvessi, E., (2000), *Estudo da produção de poligalacturonases por Aspergillus oryzae em processo submerso*, Dissertação de Mestrado, Universidade de Caxias do Sul.
11. Bradford, M.M., (1976), *Biochem.*, **72**, 248-254.
12. Zeni, M., Zoppas, J., Caldart, V., Peretti, F. y Santarosa, V.E., (2002), *Desalination*, **149**, 389-391.
13. Rombouts y Pilnik, (1978), *Proc. Biochem.*, **13**, 9-13.