



### ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE POLIGALACTURONASA POR *Pichia anomala*.

Hernández- Rivera, J.S.<sup>1,2</sup>, Chesini, M.<sup>1</sup>, Contreras-Esquivel, J.C.<sup>2</sup>, Aguilar, C.N.<sup>2</sup>, Cavalitto, S.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI). Universidad Nacional de La Plata; (CONICET-La Plata). La Plata. Argentina. \*Correo electrónico: cavali@biotec.org.ar

<sup>2</sup> Departamento de Investigación de Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México

Palabras clave: Protopectinasa, Producción, *Pichia anomala*

**Introducción.** Las protopectinasas (PPasas) son un grupo heterogéneo de enzimas capaces de liberar pectina soluble de alto PM a partir de protopectina de tejidos vegetales. Se ha reportado el potencial uso de PPasa-SE en la extracción de pectina y en la maceración de tejidos vegetales de interés en la tecnología de alimentos. La expresión de PPasa en levaduras depende marcadamente de la naturaleza del medio de cultivo. Una cepa de *Pichia anomala* fue aislada de cáscara de fruta en la provincia de misiones (Argentina), estudios previos demostraron que la levadura produce únicamente una poligalacturonasa con actividad PPasa.

En el presente trabajo se estudió la expresión de PPasa en cultivos batch en diferentes medios de cultivo.

**Metodología.** Los cultivos se realizaron en Erlenmeyer agitados utilizando como medio de referencia (MR) uno compuesto por glucosa, urea y sales (1). Los medios se inocularon cuando el cultivo alcanzó una DO inicial de 0.02. El desarrollo de los cultivos se siguió por lecturas de DO y de pH. Una vez agotada la fuente de carbono, el exceso de urea se hidroliza y se incorpora a la biomasa aumentando el pH del medio, este incremento se uso como indicador de finalización de cultivo (2). Una vez terminado, el cultivo se centrifugó y el sobrenadante se congeló hasta posterior análisis. La actividad PGasa se determinó utilizando ácido poligalacturónico como sustrato según la técnica de Cavalitto y col (3).

**Resultados y discusión.** Se estudiaron cuatro medios ya conocidos, tres sintéticos (MR (2), MRO (1) y SC(4)) y uno complejo (YPD). Los resultados obtenidos en actividad enzimática se muestran en la tabla 1

Tabla 1. Expresión de PGasa en cultivos batch con diferentes medios de cultivo

Medio de cultivo	Actividad PGasa U/ml
MR	1.35
MRO	1.18
SC	4.85
YPD	3.15

De acuerdo a los resultados y a sabiendas de que los microelementos juegan un papel crucial en la expresión de las enzimas (1) se eligió el medio SC y sobre este se

modificó el pool de microelementos en su conjunto, manteniendo la proporción entre ellos. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Expresión de PGasa en cultivos batch con medio SC con diferentes concentraciones de microelementos

Dil de microelementos	Actividad PGasa U/ml
10x	0.33
1x	6.41
0.2x	9.45
0.1x	8.15
0.05x	4.05
0.02	1.34
0.001x	2.25

**Conclusiones.** La levadura fue capaz de producir PGasa en medios sintéticos, además es claro que los microelementos juegan un papel importante en la producción de la enzima.

**Agradecimiento.** Este trabajo fue financiado mediante el PIP 5931 del CONICET. Juan Simon Hernandez Rivera agradece el apoyo otorgado por la beca nacional y la beca mixta de CONACYT.

#### Bibliografía..

1. Cavalitto SF, Mignone CF. (2007) Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Process Biochem.* 42:p 175-179.
2. Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF. (2000) Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with syntetic media. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 25:p 260-265.
3. Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF. (1999) Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnol Tech*;13:p 385-390.
4. Kingsman SM, Cousen D, Stanway CA, Chambers A, Wilson M, Kingsman AJ. (1990) High efficiency yeast expression vectors based on the promoter of the phosphoglycerate kinase gene. *Methods Enzymol*;185:p 329-341.