



PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA A PARTIR DE UN CULTIVO INDUCIDO CON DESECHOS DE LA COSECHA DE TRIGO DE LA PAMPA HÚMEDA ARGENTINA.

María C. Porfiri, Guillermo Picó, Beatriz Farruggia, Diana Romanini. Dpto. de Tecnología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. IPROBYQ- CONICET, Rosario (CP 2000) Argentina. dromanini@conicet.gov.ar.

Palabras clave: Alfa-amilasa; polímeros, Aspergillus oryzae.

Introducción. La alfa amilasa es una enzima muy requerida por diversas industrias en grandes cantidades, lo que implica que su producción requiera de metodologías eficientes, fáciles de escalar y de bajo costo que no causen perjuicios al medio ambiente (1). Una estrategia que cumple con estos requisitos es la producción fúngica en medio líquido empleando un desecho rico en almidón como inductor de la secreción de la enzima y su posterior precipitación en el filtrado del cultivo empleando polímeros de afinidad. La precipitación de un complejo enzima-polímero requiere un exhaustivo estudio de condiciones del medio y un cultivo con presencia mayoritaria de la enzima de interés (2). La optimización de las condiciones de la precipitación implica una afinidad diferencial del polímero por la proteína de interés respecto de las otras proteínas presentes en el filtrado del cultivo.

El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas de cultivo inducido por rastrojo de trigo que permitan aplicar un diseño de precipitación con polímeros aniónicos para luego obtener la enzima.

Metodología. Se cultivó la cepa de *Aspergillus oryzae* empleando un medio optimizado y se determinaron las condiciones óptimas de formación de complejos analizando las concentraciones y las relaciones molares de polímeros "inteligentes" (poliacrilato, PM 240.000) y de alfa amilasa, así como el pH, la fuerza iónica del medio y la cinética de formación (3). Se evaluó la estabilidad catalítica de la enzima por medio de medidas de actividad (4) tanto en presencia como en ausencia de los polímeros, y se analizó el efecto de la formación de complejo sobre la estabilidad catalítica de alfa-amilasa a través del tiempo. A partir de las condiciones óptimas determinadas con la enzima comercial, dicha metodología fue aplicada a un cultivo de *A. oryzae* en el cual se fueron empleados para su desarrollo diversas fuentes de carbono alternativas: almidón comercial y desechos colectados post-cosecha de trigo en campos de la Pampa Húmeda, Santa Fe, Argentina. Los medios de cultivo se denominaron: Medio A (almidón comercial) y Medio B (desecho de semillas triturado). La concentración de almidón en el medio de inducción ha sido ajustada al mismo valor en ambos medios.

Resultados. Los resultados de la precipitación con el poliacrilato (PAA) y la enzima comercial resultaron satisfactorios tanto en términos de purificación (FP: 7.40),

rendimiento (R%: 87.6) como en la concentración de la enzima, dado que además se reduce sustancialmente el volumen donde está contenida la misma. Las actividades de alfa-amilasa en los filtrados empleando ambas fuentes de carbono fueron elevadas: 59.72 U/L y 48.73 U/L para los medios A y B, respectivamente. Luego de implementar la metodología de precipitación las actividades alcanzadas en los precipitados redissueltos (PP), sobrenadantes (SN) y controles indican un alto poder precipitante del PAA. La evaluación del proceso total se muestra en la tabla de purificación a continuación

Tabla 1. Resultados de la purificación de alfa-amilasa a partir de los medios estudiados: A (almidón) y B (desecho de semillas triturado).

	Act Esp (U/mg)	Rto %	FP
Medio A	0.06	76.21	2.90
Medio B	0.05	70.35	2.00
Control A	0.02	100	1
Control B	0.02	100	1

Conclusiones. Se observa un alto poder precipitante del PAA sobre la enzima alfa-amilasa. Los elevados rendimientos porcentuales hacen a esta metodología eficaz para la obtención y posible concentración de la enzima a partir de fuentes naturales de la misma, como lo es un cultivo fúngico de *A. oryzae*, logrando purificar la proteína 2 o 2.9 veces, según el medio, respecto de la muestra de partida. Por otro lado, el empleo de fuentes alternativas de sustrato para el crecimiento del microorganismo y estimulación de la síntesis de alfa-amilasa resultó ser una estrategia útil para el empleo de materias primas sin valor comercial.

Agradecimientos. A *National Center for Agricultural Utilization Research (ARS), USDA, USA* por la donación de la cepa de *A. oryzae* NRRL 694. Agradecemos también a: BiValBi, Biotechnologies to Valorise the regional food Biodiversity in Latin American. Marie Curie Actions y a FONCyT (Argentina) (PICT 2013-1730 y PICT 2008-0186).

Bibliografía

1. Smith J., Biotecnología, Cambridge Univ. Press. (2004) cap. 1
2. Cooper C. Dubin P., Kayitmazer, A. Turksen S. (2005), *Curr Op CollInterf Sciences*, 10, 52-78.
3. Kumara A., Srivastava, A., Yu Galaev, I., Mattiasson, B. (2007) *Progress Pol Sc*, 32, 1205-1237.
4. Ishikawa, K., Matsui, I., Honda, K., Nakatani, H. (1990). *Biochem-US*, 29, 7119-7123.