

Efecto de la Relación Celulosa:Hemicelulosa

en la Producción de Xilanasas y Celulasas por *Aspergillus niger* y *Phanerochaete chrysosporium* A594*

M. en C. María Aurora Martínez Trujillo**

Introducción

Cuando un hongo crece utilizando sustratos celulósicos y/o hemicelulósicos como única fuente de carbono, es capaz de secretar una gran variedad de xilanasas y celulasas, cuya cantidad y tipo dependen de la naturaleza de dicho sustrato.¹ En las últimas décadas, las xilanasas y las celulasas han encontrado diversas e importantes aplicaciones industriales, entre las cuales destacan el procesamiento de la pulpa kraft para la fabricación del papel, que requiere

del uso de xilanasas, o el tratamiento de deslavado de la mezclilla, en el cual se emplean celulasas de diversos tipos. Es por eso que estas enzimas se han convertido en un producto con valor agregado.² *Aspergillus niger* es un hongo filamentoso, ampliamente estudiado en la producción de enzimas de interés industrial, debido a su capacidad para secretar al medio de cultivo las enzimas que produce, además de su habilidad para utilizar sustratos de diversos tipos como fuente de carbono.³ *Phanerochaete chrysosporium*, por su parte, es un hongo lignocelulósico, comunmente examinado en los procesos de degradación de compuestos xenobióticos.

Sin embargo, por su naturaleza, es capaz de secretar xilanasas y celulasas al crecer sobre sustratos ricos en materiales lignocelulósicos.⁴ El bagazo de caña por su parte es un residuo agroindustrial rico en celulosa y hemicelulosa. Trabajos previos hechos en el Laboratorio de Catálisis Enzimática han demostrado que es un excelente inductor de celulasas y xilanasas en *A. niger* y que es posible obtener producción de estas enzimas con *P. chrysosporium*.⁵ No obstante, se ha observado que en algunas bacterias, la producción puede aumentar si al inductor se le suplementa con una mayor cantidad de celulosa o hemicelulosa.⁶

Acerca de la autora...

* El presente trabajo, está dedicado a la memoria del Ing. Esteban Enrique Martínez Pelayo.

** Académica investigadora del Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE.

El diseño de un medio de cultivo adecuado puede ayudar en la obtención de elevadas cantidades de estas enzimas. Para obtener el medio de cultivo óptimo en la producción de xilanasas y celulasas por *A. niger* y *P. chrysosporium*, es necesario determinar si ésta aumenta al suplementar el medio que contiene al bagazo de caña, con xilana, para enriquecer la fuente de hemicelulasas; o con carboximetil celulosa (C), para enriquecer la fuente de celulasas. Debido a lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto de la relación celulosa:hemicelulosa en el crecimiento y producción de xilanasas, celulasas por los hongos *A. niger* y *P. chrysosporium* A594.

Metodología

Microorganismos e inóculo

Se utilizó *Aspergillus niger* y *Phanerochaete chrysosporium* A594 que se encontraban conservadas en glicerol al 30%. El inóculo se preparó en matraces de 250 ml con 50 ml de PDA, incubando a 35°C durante cinco días. Las esporas de tres matraces por cada cepa, se cosecharon utilizando una solución de tween 80 al 0.01%. Cada matraz de la cinética se inoculó con 1×10^5 esporas por ml.

Producción del concentrado enzimático

Las enzimas se produjeron en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 50 ml del medio mineral reportado por Araujo y D'Souza.⁷ Los matraces inoculados con *A. niger* se prepararon con 0-1, 0.2-0.8, 0.4-0.6, 0.6-0.4, 0.8-0.2 y 1-0 % (p/v) de bagazo de caña:CMC o bagazo de caña:xilana, mientras que aquellos inoculados con *P. chrysosporium* A594, se prepararon con 0-1, 0.2-0.8, 0.4-0.6, 0.6-0.4, 0.8-0.2 y 1-0 % (p/v) de carboximetilcelulosa (CMC):xilana. Una vez inoculados, se incubaron a 35°C y 150 rpm durante 72 h, luego de las cuales se filtraron, recuperando el sobrenadante.

Ensayos enzimáticos

La actividad de celulasas como CM-Casas y FPAsas se determinaron de acuerdo a lo indicado por Ponce y de la Torre.⁸ La actividad de xilanasas se determinó de acuerdo al procedimiento previamente descrito,⁹ pero utilizando el regulador a pH 4 e incubando la mezcla de reacción a 50°C durante 5 min. Una Unidad Internacional de actividad enzimática (UI) se define como la cantidad (μmol) de producto formado (glucosa o xilosa, respectivamente) por minuto bajo las condiciones estándar de operación.

Cuantificación de azúcares reductores

Se cuantificó la concentración de azúcares reductores en cada muestra de la cinética, empleando el ácido dinitrosalicílico, de acuerdo a la metodología descrita por Martínez-Trujillo.¹⁰

Todos los análisis se hicieron por triplicado y los promedios de dichos triplicados se muestran en los resultados.

Resultados y discusión

Con el comportamiento de *A. niger*, respecto a la producción de xilanasas, no se observan cambios considerables entre las combinaciones probadas; su máxima producción se obtuvo con la combinación B0.6:X0.4 (Exp. 4, 1A), en donde la actividad aumenta solo 0.44 UI/ml (12%) con respecto al control. En lo referente a la actividad de celulasas sobre papel filtro (FPAsas), la mayor producción se alcanza en la combinación 0.8B:0.2X (Exp. 5, 1B), donde la actividad aumenta en un 68% (~ 0.13 UI/ml) con respecto al control. En cuanto al efecto de las combinaciones sobre la actividad de celulasas, para la producción de CMCasas, la mejor combinación es 0.8B:0.2C (Exp. 7, 1C), donde se obtuvo un 65% más que el control. En lo referente a la producción de azúcares reductores durante la fermentación, la

mayor cantidad de ellos se obtuvo cuando se utilizó xilana como única fuente de carbono (Exp. 1, 1D).

Respecto al comportamiento de *P. chrysosporium* A594 (Figura 2), cuando se utiliza CMC como única fuente de carbono, todas las enzimas se expresan en sus niveles más bajos. El máximo crecimiento del hongo (0.8 g/l) se alcanzó en la combinación 0.4 C:0.6 X, mientras que la mayor actividad de las enzimas (1.7 UI de xilanasas/ml, 2.5 UI de CMCasas/ml y 1.4 UI de FPAsas/ml) se expresó al utilizar xilana como única fuente de carbono. Con lo anterior, es posible suponer que la xilana es un buen inductor de las actividades tanto xilanolíticas como celulolíticas en este hongo. Además, la combinación C0:X1 permite obtener una concentración aceptable de azúcares reductores, lo cual podría ser un indicador de que *P. chrysosporium* es capaz de soportar altas concentraciones de azúcares con una fuente de carbono rica en xilana.

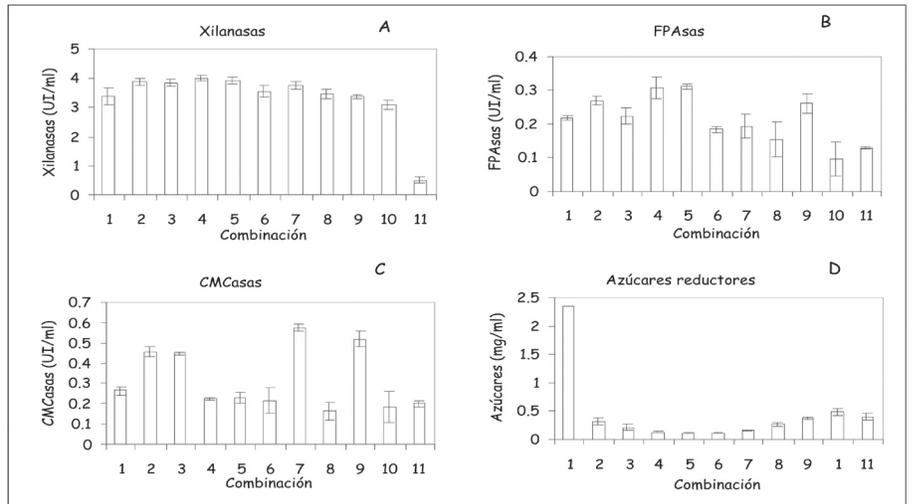


Figura 1. Producción de xilanasas (A), FPAsas (B), CMCasas (C) y azúcares reductores (D) por *A. niger* sobre diferentes combinaciones B:X y B:C. (1). B0:X1, (2). B0.2:X0.8, (3). B0.4:X0.6, (4). B0.6:X0.4, (5). B0.8:X0.2, (6). B1(control), (7). B0.8:C0.2, (8). B0.6:C0.4, (9). B0.4:C0.6, (10). B0.2:C0.8, (11). B0:C1

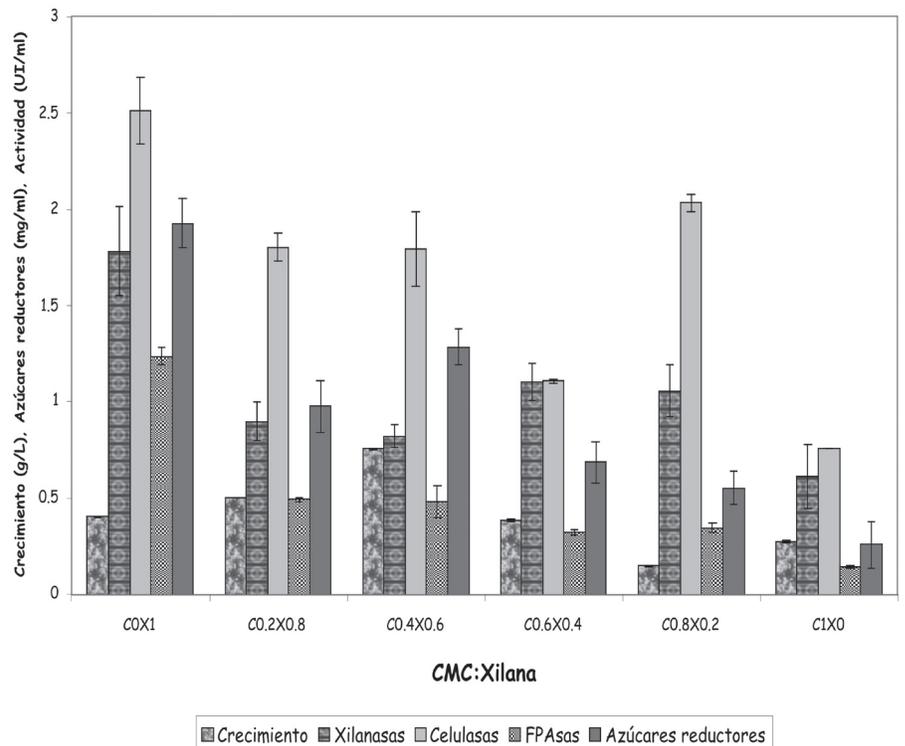


Figura 2. Efecto de la relación CMC:Xilana en el crecimiento y producción de xilanasas, celulasas y azúcares reductores por el hongo *P. chrysosporium* A594.

Conclusiones

Es posible obtener la mejor relación celulosa:hemicelulosa para optimizar el medio de cultivo en la obtención de xilanasas o celulasas por *A. niger*. Para lograr esto en una sola fermentación, es recomendable partir de la combinación 0.2B:0.8X, con la que se obtiene 8% más xilanasas, 45% más FPAsas, 110% más CMCasas y 181% más azúcares reductores con respecto al control. Lo anterior indica que es necesario realizar nuevos experimentos, probando como inductor de las actividades un residuo rico en xilana, como puede ser la avena, con el objetivo de incrementar la cantidad de enzimas producidas.

La xilana, utilizada como única fuente de carbono en el medio de cultivo, es un buen inductor de actividades xilanólíticas y celulólicas en *P. chrysosporium A594*.

Agradecimientos

Deseo agradecer el apoyo técnico de la alumna Angélica María Cedillo Aguilar, al Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica (CoSNET) por el apoyo financiero otorgado para la realización de este proyecto (clave 1009.02-P) y al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas (UAM-I) por la donación de las cepas utilizadas en este estudio.

Bibliografía...

1. Gomes, *et al.* 1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 14, 169-173.
2. Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L. y Hoondal, G. S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 56: 326-338.
3. Cardoso-Duarte, J. y Costa-Ferreira, M. 1994. Aspergilli and lignocelulosics: enzymology and biotechnological applications. *FEMS Microbiology reviews*, 13: 377-386.
4. Broda, P.; Birch, P. R. J.; Brooks, P. R. y Sims, P. F. G. 1996. Lignocelulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: gene families and gene expression for a complex process. *Molecular Microbiology.* 19:923,932.
5. Martínez-Trujillo, A.; Castañeda-Gutiérrez, G. y Peralta-Pérez, R. 2002. Producción de xilanasas y celulasas a partir de sustratos lignocelulósicos utilizando *Phanerochaete chrysosporium A594*. III Encuentro Internacional de Biotecnología UPIBI 2002. Querétaro, del 6 al 9 de noviembre del 2002.
6. Pérez-Ávalos, O. y Ponce-Noyola, T. 2002. Synthesis and regulation of D-xilanase from *Cellulomonas flavigena* wild type and a mutant. *Biotechnology Letters*, 24:813-817.
7. Araujo, A. y D'Souza, J. (1980) Production of Biomass from Enzymatic Hydrolysate of Agricultural Waste. *J. Ferment. Technol* 58, 399-.
8. Ponce-Noyola, T. y de la Torre, M. 1995. Isolation of a high-specific-growth-rate mutant of *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 42:709-712.
9. Martínez Trujillo, M. A.; Pérez-Ávalos, O. y Ponce-Noyola, T. 2003. Enzymatic properties of a purified xylanase from mutant PN-120 of *Cellulomonas flavigena*. *Enzyme and Microbial Technology.* 32(3-4, 401-406.
10. Martínez Trujillo, M. A. 2003. "DNS: una técnica de cuantificación de azúcares reductores empleada en el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE". *Tecnocultura* 6: 7-9.