

XXXII Encuentro Nacional y 1^{er} Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

EMPLEO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA LA PRODUCCIÓN DE FERULOIL ESTERASAS DE HONGOS FILAMENTOSOS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

USE OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES FOR THE PRODUCTION OF FERULOYL ESTERASES FROM FILAMENTOUS FUNGI BY SOLID-STATE FERMENTATION

M.A. Camacho-Ruiz^{1*}, J.C. Mateos-Díaz³, H.E. Gómez-Hernández¹, J.A. Córdova-López²,
J.A. Rodríguez-González³

¹Departamento de Ingeniería Química, ²Departamento de Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e
Ingeniería, Universidad de Guadalajara.

Guadalajara, Jalisco, México, *e-mail: mariangelcr00@hotmail.com.

³Unidad de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de
Jalisco A.C., Guadalajara, Jalisco, México.

Resumen

Las feruloil esterases (FEs) poseen la capacidad de hidrolizar ácido ferúlico y otros ácidos aromáticos de estructuras poliméricas, lo que ha incrementado el interés para su empleo en la industria alimentaria, papelera, farmacéutica y de biocombustibles. En este trabajo, se estudió la producción de FEs, llevando a cabo cultivos por Fermentación en Medio Sólido (FMS) de tres hongos filamentosos del género *Aspergillus* (S10-V1, MIIIgc-2b y PCS-6), previamente aislados de residuos lignocelulósicos. Con el objetivo de proponer un medio de cultivo económico, se utilizaron como sustratos residuos agroindustriales ricos en ácido ferúlico como: pulpa de café (PC), cascarilla de maíz (CM) y residuos de la extracción del café tostado (RC). Se realizaron cinéticas de FMS y se detectó que la actividad feruloil esterasa (hidrólisis de etil-ferulato) se produjo al emplear cualquiera de los tres residuos. Particularmente, el hongo S10-V1 tuvo su máxima producción de FEs en RC, con una actividad de 0.35 U/g de Materia Seca (MS). Por otro lado, los hongos MIIIgc-2b y PCS-6 que presentaron un comportamiento similar, tuvieron su máxima producción de FEs al emplear CM como sustrato, con actividades de 0.84 y 5.11 U/g MS, respectivamente. Sorprendentemente, la actividad del mejor fermento bruto (PCS-6) fue solamente 2.3 veces menor que la de uno de los mejores concentrados enzimáticos comerciales (Rapidase® TF). Estos resultados demuestran que los tres agro-residuos son excelentes inductores de FEs, siendo la cascarilla de maíz un sustrato atractivo para su empleo en la producción de cocteles enzimáticos económicos ricos en FEs.

Abstract

Feruloyl esterases (FEs) have the ability to hydrolyze ferulic acid and other aromatic acids from polymeric structures, thus has increased interest for its use in food, paper, pharmaceutical and biofuels industry. In this work, it was studied the FEs production, carrying out cultures by Solid-State Fermentation (SSF) of three filamentous fungi from *Aspergillus* genera (S10-V1, MIIIgc-2b and PCS-6), previously isolated from lignocellulosic wastes. With the objective to propose an economic culture media, agro-industrial wastes rich in ferulic acid were used as substrates: coffee pulp (CP), corn husks (CH), and remainders of toasted coffee extraction (RC). Kinetics of SSF were performed and it was found that the feruloil esterase activity (ethyl-ferulate hydrolysis) was produced by using anyone of the three agro-wastes. Particularly, the fungus S10-V1 has its highest FEs production in RC, with an activity of 0.35 U/g of dry matter (DM). On the other hand, the fungi MIIIgc-2b and PCS-6, that displayed a similar behavior, had their highest FEs production by using CH as substrate, with activities of 0.84 and 5.11 U/g DM, respectively. Surprisingly, the best crude ferment activity (PCS-6) was only 2.3 times lower that one of the best commercial enzyme concentrates (Rapidase® TF). These results demonstrate that the three agro-wastes are excellent FEs inductors, being the corn husk an attractive substrate to be employed to produce economic enzymatic cocktails rich in FEs.

XXXII Encuentro Nacional y 1^{er} Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos que llevan a cabo reacciones bioquímicas de una manera muy eficiente y con un elevado grado de especificidad. Fueron descubiertas en la segunda mitad del siglo diecisiete, y desde entonces han tenido importantes aplicaciones en procesos industriales especialmente amigables con el ambiente (Hoondal y col. 2002). Las enzimas más comercializadas son las hidrolasas, pues representan casi el 80% de las ventas generadas en el mercado de enzimas. Dentro de este grupo de enzimas se encuentran las feruloil esterasas (FEs) (E.C. 3.11.73) las cuales, debido a su capacidad para hidrolizar los enlaces éster existentes entre los compuestos fenólicos y los polisacáridos de las plantas, poseen un gran potencial para ser utilizadas en diversos procesos industriales tales como la obtención de fibras de alta calidad (Record y col. 2003), la recuperación de compuestos fenólicos de interés en la industria alimentaria, cosmetológica y farmacéutica (*i.e.* ácido ferúlico, *p*-cumárico, cafeico y sinapico) (Kroon y Williamson 1999), en la sacarificación de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol (Tabka y col. 2006), etc. También su uso en biocatálisis es muy interesante, puesto que estas enzimas son capaces de modificar ácidos hidroxicinámicos para su uso en productos con propiedades antioxidantes (Topakas y col 2005). Las FEs han sido producidas a partir de un amplio rango de microorganismos, incluyendo bacterias y hongos (*i.e.* *Pseudomonas fluorescens*, *A. niger*, *N. crassa*, etc) (Faulds y col 1995; Asther y col 2002; Xiros y col 2008), en la mayoría de los casos por medio de fermentaciones líquidas. Actualmente, existen pocos reportes de la producción de estas enzimas por FMS, y los sustratos que se han utilizado son principalmente pulpa de remolacha y salvado de trigo (Donaghy y McKay 1995), que son residuos agroindustriales comunes en Europa. Por otro lado, en México los residuos agroindustriales más representativos provienen del sorgo, maíz, trigo, café, caña, agave, entre otros, de los cuales se generan anualmente, alrededor de 50 millones de toneladas (SAGARPA 2006), algunos de estos residuos pueden ser fuentes potenciales (sustratos económicos) para la obtención de productos de alto valor agregado como las enzimas producidas por FMS (Aguilar y col. 2008).

En este trabajo se propone el empleo de varios residuos agroindustriales, tales como la cascarilla de maíz, la pulpa de café y los residuos de la extracción de café tostado, que son materiales que tienen un alto contenido de ácido ferúlico, especialmente la cascarilla de maíz (6% p/p) (Taylor y Mottram 1996); esto con el objetivo de encontrar un sustrato económico que permita obtener una alta producción de FEs, utilizando como microorganismos modelo hongos filamentosos del género *Aspergillus* que han sido reconocidos como productores importantes de FEs (Asther y col. 2002).

METODOLOGÍA

Cepas

Se emplearon las cepas silvestres MIIIgc-2b (*Aspergillus versicolor*), S10-V1 (*Aspergillus fumigatus*) y PCS-6 (*Aspergillus niger*), que fueron previamente aisladas de residuos lignocelulósicos y crecieron en medios que contenían ácido ferúlico como única fuente de carbono.

Sustratos sólidos y soporte utilizados en FMS para la producción de FEs

Se utilizaron como sustratos para la FMS: cascarilla de maíz (CM), pulpa de café (PC) y residuos de la extracción de café tostado (RC); los cuales fueron molidos y tamizados en un tamaño de partícula entre 0.425 y 0.180 mm. Se utilizó espuma de poliuretano de densidad entre 18 y 30 Kg/m³ como soporte para la fermentación, recortado en cubitos de un tamaño de arista de aproximadamente 3 a 5 mm.

Medios de cultivo y condiciones de cultivo para la producción de FEs

El soporte (poliuretano) fue impregnado con un medio mínimo que contenía (g/L): glucosa (SIGMA), 5; urea (SIGMA), 4; K₂HPO₄ (SIGMA), 5; MgSO₄ (SIGMA), 1; ajustando el pH a 6.5; a dicha mezcla se le adicionó el 75% (p/p de materia seca) de alguno de los sustratos (CM, PC o RC). Los medios de cultivo fueron inoculados con 3 x 10⁷ esporas/g de materia seca, a una humedad inicial del 75%. El dispositivo de FMS fue montado de

XXXII Encuentro Nacional y 1^{er} Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

acuerdo a lo reportado por Raimbault y Alazard (1980), se colocaron 20 g de mezcla inoculada en biorreactores tubulares y se incubaron en un baño de agua con temperatura controlada a 30°C y aireación constante durante 5 días.

Determinación de actividad enzimática

La actividad feruloil esterasa fue determinada con el método colorimétrico descrito por Ramírez y col. (2008), el cual consiste en la medición de la producción de ácido ferúlico proveniente de la hidrólisis del etil ferulato empleado como sustrato y utilizando *p*-nitrofenol como indicador de pH, monitoreando el cambio de coloración de la muestra por su lectura de absorbancia a 415 nm. Una unidad de actividad enzimática corresponde a un μ mol de ácido ferúlico liberado por minuto en las condiciones de reacción (pH 7.2 y 35°C).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios realizados previamente permitieron identificar tres cepas silvestres, aisladas de residuos lignocelulósicos, que tenían la capacidad de crecer en un medio selectivo que contenía ácido ferúlico como única fuente de carbono. Esta característica indica que las cepas tienen potencial para la expresión de feruloil esterasas, debido a que el ácido ferúlico es conocido como un inductor para la síntesis de estas enzimas (Faulds y col. 1997). Sin embargo, es también conocido que este sustrato inhibe el crecimiento de muchos microorganismos, por lo que el crecimiento de las cepas en ácido ferúlico fue pobre comparado con su crecimiento en un medio enriquecido (Papa Dextrosa Agar), tal como se muestra en la Figura 1A y B, respectivamente; en la cual también se presentan imágenes microscópicas de las 3 cepas (Figura 1.C) y se puede observar que todas ellas pertenecen al género *Aspergillus* (Rakotonirainy 2010). Para conocer su especie, estas cepas se mandaron identificar por vía molecular, siendo PCS-6 identificado como *A. niger*, S10-V1 como *A. fumigatus*, y MIIIgc-2b como *A. versicolor*. Hongos pertenecientes a este género ya han sido estudiados como buenos productores de FEs (Benoit y col 2008).

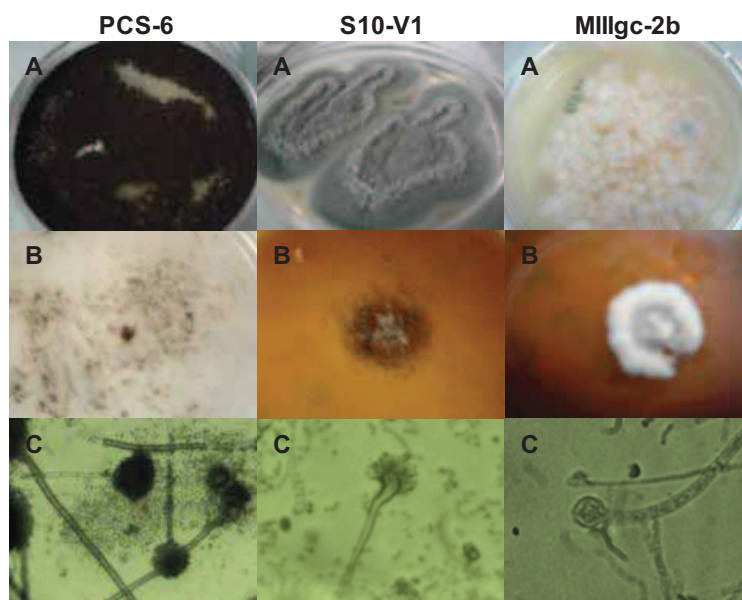


Figura 1. Imágenes de los hongos productores de feruloil esterasas: PCS-6 (*A. niger*); S10-V1 (*A. fumigatus*); y MIIIgc-2b (*A. versicolor*). A) Imágenes macroscópicas de los hongos cultivados en medio papa dextrosa agar (PDA). B) Imágenes macroscópicas de los hongos cultivados con ácido ferúlico como única fuente de carbono. C) Imágenes microscópicas de las cepas, en ellas se observa la cabeza aspergilar típica de hongos del género *Aspergillus*.

XXXII Encuentro Nacional y 1^{er} Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

Influencia de residuos agroindustriales en la producción de feruloil esterases por FMS

En la Figura 2 se muestra el efecto del sustrato (residuo agroindustrial) en la producción de FEs por FMS, en ella se presentan los mejores resultados obtenidos durante las cinéticas de FMS de los hongos. Como puede observarse, los tres residuos agroindustriales inducen la producción de FEs. Particularmente, el hongo S10-V1 tuvo su máxima producción en RC, con una actividad de 0.35 U/g de Materia Seca (MS), obtenida a las 50 horas de fermentación. Por otro lado, los hongos MIIIgc-2b y PCS-6 que presentaron un comportamiento similar, tuvieron su máxima producción enzimática al emplear CM como sustrato, con actividades de 0.84 U/g MS a las 48 horas de fermentación y 5.11 U/g MS a las 72 horas de fermentación, respectivamente.

Particularmente, la producción de FEs obtenida del cultivo del hongo PCS-6 en CM es superior a las reportadas en la literatura para cultivos de hongos filamentosos por FMS, pues en la mayoría de esos trabajos la actividad FE reportada es inferior a 1 U/g MS. Además, cabe mencionar que no se han encontrado reportes que hayan empleado la cascarilla de maíz como sustrato para inducir la producción de FEs, siendo a nuestro conocimiento en este trabajo la primera vez que se emplea este residuo. *Aspergillus niger* es el hongo más estudiado como productor de FEs; existen varios reportes de cultivos de este hongo en pulpa de remolacha y salvado de trigo por FMS; algunos de los trabajos más relevantes son el de Asther y col. (2002), que cultivaron a *A. niger* en pulpa de remolacha, logrando obtener una actividad FE de 1.17 U/g MS empleando metil sinapato (MSA) como sustrato para la reacción enzimática; y el de Hegde y Muralikrishna (2009), en el que se realizaron cultivos de *A. niger* en salvado de trigo logrando obtener 0.52 U/g MS empleando *p*-nitrofenil ferulato como sustrato para la reacción enzimática. Si bien, no se emplearon los mismos sustratos para la determinación de la actividad FE, cabe destacar que el etil ferulato es uno de los sustratos más difíciles de hidrolizar en comparación con algunos metil y *p*-nitrofenil ferulatos, lo cual indica que la actividad obtenida para PCS-6 con EF fue elevada.

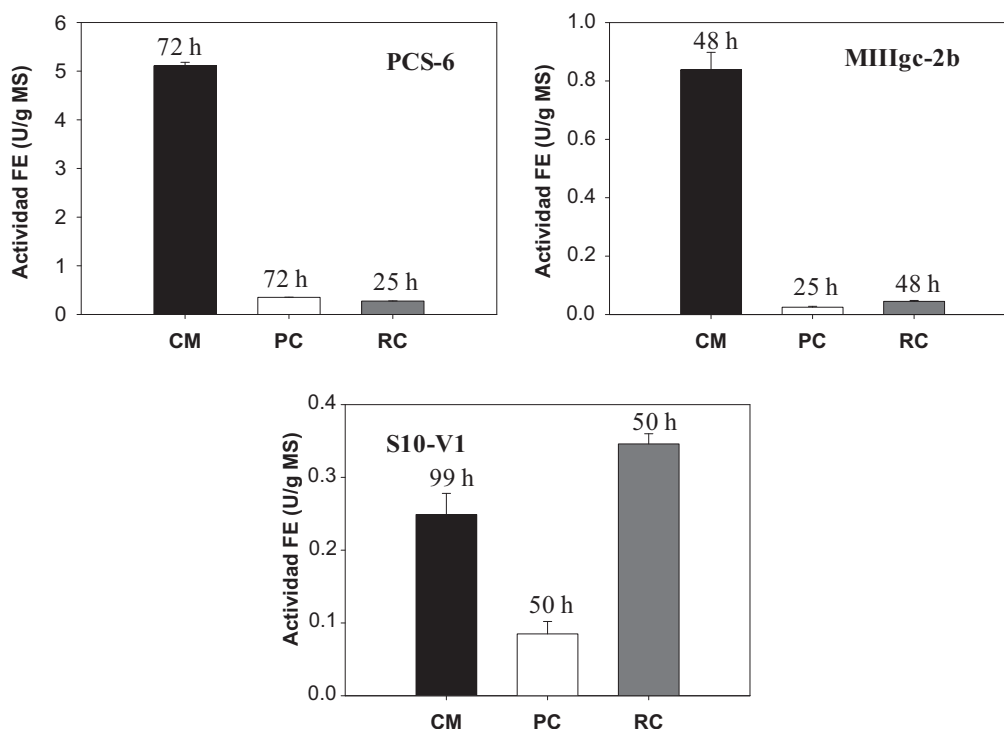


Figura 2. Efecto de los residuos agroindustriales empleados como sustratos en la producción de feruloil esterases de los hongos PCS-6 (*A. niger*), MIIIgc-2b (*A. versicolor*) y S10-V1 (*A. fumigatus*) cultivados por FMS. CM: cascarilla de maíz; PC: pulpa de café; RC: residuos de la extracción del café tostado. FE: feruloil esterasa.

XXXII Encuentro Nacional y 1^{er} Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

Comparación de la actividad del extracto enzimático rico en FEs con una formulación comercial

La actividad del extracto enzimático obtenido de PCS-6 (*A. niger*) en cascarilla de maíz (CM) a las 72 horas de fermentación fue comparada con la contenida en la formulación enzimática comercial de *A. niger* (Rapidase® TF). Los resultados del ensayo de actividad feruloil esterasa para ambos extractos se presentan en la Figura 3; en la cual se muestran las pendientes de las cinéticas de reacción enzimática que fueron determinadas por medio del valor de absorbancia (410nm) de las muestras .

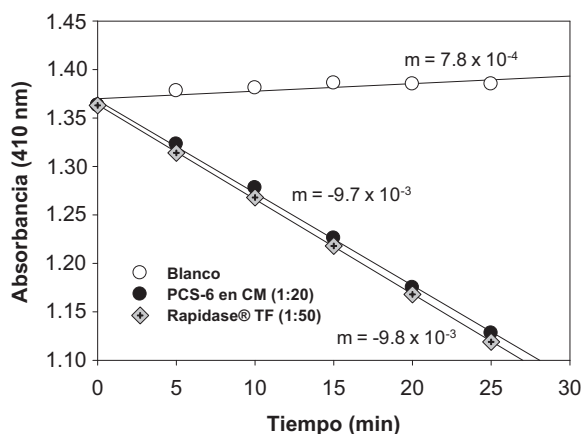


Figura 3. Cinéticas enzimáticas de la hidrólisis de etil ferulato con la Rapidasa® TF (*A. niger*) y el extracto de PCS-6 (*A. niger*) producido con CM, diluidas 50 y 20 veces, respectivamente. m: pendiente (Abs/min).

La actividad FE obtenida para la formulación comercial Rapidase® TF fue de 4 U/mL, mientras que para el extracto enzimático de PCS-6 fue tan solo 2.3 veces menor (1.7 U/mL). Cabe mencionar que las formulaciones enzimáticas comerciales son en realidad concentrados enzimáticos, mientras que los extractos enzimáticos que se obtuvieron en este trabajo experimental no tuvieron ningún tratamiento; esto sugiere que el nivel de actividad FE obtenida al emplear cascarilla de maíz fue muy satisfactorio y puede ser competitivo con los que actualmente están en el mercado.

CONCLUSIONES

Los tres residuos agroindustriales empleados por fermentación sólida resultaron buenos inductores de FEs; siendo la cascarilla de maíz el mejor de ellos, probablemente debido a su alto contenido de ácido ferúlico esterificado. De los tres hongos *Aspergillus* cultivados, el que fue identificado como *A. niger* (PCS-6) produjo la mayor cantidad de FEs, con el cual se pudo obtener un extracto enzimático con actividad FE cercana a la que contiene uno de los preparados enzimáticos comerciales con mayor actividad FE (Rapidase® TF). Estos resultados sugieren que la cascarilla de maíz es un sustrato potencial para ser empleado en la producción de cocteles enzimáticos económicos ricos en FEs.

AGRADECIMIENTO

María de los Ángeles Camacho Ruiz agradece al CONACyT por el financiamiento de su beca de maestría. Se agradece al PROMEP por el financiamiento de la Red PROMEP 2008: Aprovechamiento de la biodiversidad en México a través de herramientas biotecnológicas.

REFERENCIAS

1. Aguilar, C. N., G. Gutiérrez-Sánchez, P. A. rado-Barragán, R. Rodríguez-Herrera and J. L. Martínez-Hernandez (2008) Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 4, 354-366.

XXXII Encuentro Nacional y 1^{er} Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

2. Asther, M., M. Haon, S. Roussos, E. Record, M. Delattre, L. Lesage-Meessen and M. Labat (2002) Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*. 38, 685-691.
3. Benoit, I., E. G. J. Danchin, R. J. Bleichrodt and R. P. de Vries (2008) Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnology Letters*. 30, 387-396.
4. Donaghy, J. A. and A. M. McKay (1995) Production of feruloyl/p-coumaroyl esterase activity by *Penicillium expansum*, *Penicillium brevicompactum* and *Aspergillus niger*. *Journal of Applied Microbiology*. 79, 657-662.
5. Faulds, C. B., R. P. De Vries, P. A. Kroon, J. Visser and G. Williamson (1997) Influence of ferulic acid on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters*. 157, 239-244.
6. Faulds, C. B., M. C. Ralet, G. Williamson, G. P. Hazlewood and H. J. Gilbert (1995) Specificity of an esterase (XYLD) from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 1243, 265-269.
7. Hegde, S. and G. Muralikrishna (2009) Isolation and partial characterization of alkaline feruloyl esterases from *Aspergillus niger* CFR 1105 grown on wheat bran. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 25, 1963-1969.
8. Hoondal, G. S., R. P. Tiwari, R. Tewari, N. Dahiya and Q. K. Beg (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59, 409-418.
9. Kroon, P. A. and G. Williamson (1999) Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79, 355-361.
10. Raimbault, M. and D. Alazard (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. Applied Microbiology and Biotechnology*. 9, 199-209.
11. Rakotonirainy, M. S. (2010) Mycota, les contaminants fongiques du patrimoine culturel, Centre de Recherche sur la Conservation des Collections
12. Ramirez, L., J. Arrizon, G. Sandoval, A. Cardador, R. Bello-Mendoza, P. Lappe and J. C. Mateos-Diaz (2008) A New Microplate Screening Method for the Simultaneous Activity Quantification of Feruloyl Esterases, Tannases, and Chlorogenate Esterases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 151, 711-723.
13. Record, E., M. Asther, C. Sigoillot, S. Pages, P. J. Punt, M. Delattre, M. Haon, C. van den Hondel, J. C. Sigoillot, L. Lesage-Meessen and M. Asther (2003) Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62, 349-355.
14. SAGARPA (2006) http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeagr.html.
15. Tabka, M. G., I. Herpoel-Gimbert, F. Monod, M. Asther and J. C. Sigoillot (2006) Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 897-902.
16. Taylor, A. J. and D. S. Mottram (1996) Flavour science: recent developments.
17. Topakas, E., C. Vafiadi, H. Stamatis and P. Christakopoulos (2005) *Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*. 36, 729-736.
18. Xiros, C., E. Topakas, P. Katapodis and P. Christakopoulos (2008) Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresource Technology*. 99, 5427-5435.

Índice