

BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS CAPACES DE HIDROLIZAR ARABINOXILANOS PRESENTES EN EL NEJAYOTE

H. Y. Guerrero Elias^a, J. A. Rodríguez González^a, J. A. Assaf Torres^b, J. C. Mateos Díaz^a, R. M. Camacho Ruiz^{a}*

^aUnidad de biotecnología industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Av. Normalistas No. 800 Colonia Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, CP 44270 MÉXICO. rcamacho@ciatej.mx

^bLaboratorio de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Carretera a la Victoria Km. 0.6, Hermosillo, Sonora, 83304, MÉXICO.

Resumen

El nejayote es un subproducto de la industria de la nixtamalización, el cual contiene moléculas disueltas que pueden ser recuperadas y aprovechadas, entre las cuales destacan los arabinosilanos ferulados que son polisacáridos complejos que tienen diversas propiedades tecnológicas y funcionales de interés biotecnológico. Los hongos filamentosos son microorganismos capaces de adaptarse de manera exitosa a distintos sustratos, es por esto que se consideraron para la búsqueda de enzimas que permitan la hidrólisis parcial y recuperación de oligómeros de arabinosilanos que pueden tener un alto valor agregado. Se estudiaron 35 hongos de las colecciones CIAD-CIATEJ, los cuales se inocularon en un medio que contenía arabinosilanos ferulados (FAXX) de cadena larga como fuente de carbono, los extractos generados a partir de los cultivos fueron analizados por cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC) buscando perfiles de hidrólisis de FAXX, donde se observó la liberación de oligómeros de arabinosilanos, encontrando 14 cepas candidatas de interés.

Introducción

Los arabinosilanos son cadenas de xilano las cuales contienen residuos de otros carbohidratos como glucosa, arabinosa, galactosa e incluso algunos compuestos fenólicos como el ácido ferúlico y *p*-cumárico, estos están presentes en diversas fuentes [1,2,3] y se han convertido en moléculas de alto interés biotecnológico debido a que presentan propiedades tecnológicas como emulsificantes y gelificantes [3] y también algunas propiedades funcionales tales como antioxidantes, prebióticos, fortalecedores del sistema inmune [4] entre otras. El nejayote es la fracción acuosa obtenida como subproducto del proceso de la nixtamalización, éste se considera un agente altamente contaminante debido a las condiciones a las cuales es desechado del proceso (pH 10-14, temperatura 60-80° C, DBO 7000-10000 mg O₂/L) además que se generan entre 16 y 22 millones de m³ al año de este residuo por lo que se le considera un grave problema para el medio ambiente [5].

Las sacaridasas como las amilasas, celulasas y xilanasas en conjunto con las carbohidrato-esterasas como las feruloilesterasas y acetilxilanesterasas, son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar cadenas de oligosacáridos y polisacáridos que permiten la recuperación de moléculas que pueden ser aprovechadas y a las que se les puede dar valor agregado por lo cual han sido utilizadas para la sacarificación de distintos residuos como cascarilla de maíz, residuos de café, desechos de plátano, bagazo de naranja, rastrojo de maíz, entre otros [6,7,8,9,10], es por esta razón que este trabajo está enfocado a la selección de microorganismos que sean capaces de producir esta clase de herramientas biotecnológicas para la liberación y posterior recuperación de oligómeros de arabinosilanos de alto valor agregado a partir de fracciones de nejayote.

Metodología

Obtención de arabinosilanos. Los arabinosilanos (FAXX) utilizados en el presente trabajo se obtuvieron mediante un sistema de filtración de membranas [11], y utilizando etanol para precipitar los arabinosilanos, de cadena larga, retenidos en la membrana de 200 Da, los cuales fueron liofilizados para su mejor manejo y conservación.

Crecimiento de hongos. Se emplearon 35 hongos, 33 de la colección de CIATEJ y dos de la colección de CIAD, los cuales fueron cultivados por picadura en cajas Petri de (30x15mm) en un medio de cultivo formulado con un medio mínimo mineral [12] compuesto de: 5 g/L fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), 1 g/L de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) y 4 g/L de urea ($CO(NH_2)_2$), al cual se le agregó como fuente de carbono 0.5 g/L glucosa, para propiciar el crecimiento del hongo, y, además, 20 g/L de los FAXX obtenidos por liofilizado del precipitado etanólico y agar a 15 g/L ajustando el pH a 6.5 con ácido fosfórico (H_3PO_4).

HPTLC de carbohidratos. El medio de cultivo fue recuperado y homogeneizado mediante un homogeneizador de tejido, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos tomándose el sobrenadante para ser inyectado, utilizando el equipo de inyección CAMAG, en placas aminadas (MACHEREY-NAGEL). Se utilizaron estándares de glucosa, xilosa, arabinosa, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico y ácido sinapínico. Las placas fueron colocadas en cámaras de migración que contenían una fase móvil compuesta de *n*-butanol/metanol/agua/ácido acético (50/25/20/1, v/v/v/v) durante cuatro horas, posteriormente la placa fue fijada a 180° C durante 20 minutos y revelada con una solución de etanol/ácido sulfúrico/anisaldehído (18/1/1, v/v/v) y calentamiento a 120° C por 10 minutos.

Resultados

Durante 8 días se realizó una cinética de crecimiento de los 35 hongos cultivados, se observó crecimiento en 14 cepas demostrando la capacidad de estos hongos de utilizar a los FAXX como fuente de carbono (Figura 1). Se tomaron muestras de los cultivos cada dos días con lo cual fue posible identificar por HPTLC la liberación de oligómeros de FAXX generados por el cultivo de hongos filamentosos, como *Aspergillus terreus*, sobre arabinosilanos de cadena larga. En la Figura 2 se presenta la cinética de cuatro de los hongos estudiados, se observan los FAXX de cadena larga como una banda intensa en el depósito de la placa (t_0). Conforme la fermentación fue transcurriendo se observa la liberación de monosacáridos (G, X, A) así como la presencia de bandas intermedias con R_f de: 0.07, 0.13 0.16, 0.24 correspondientes al perfil que tienen los oligómeros de arabinosilanos los cuales no existían al inicio de la cinética, siendo dichos oligómeros de gran interés.

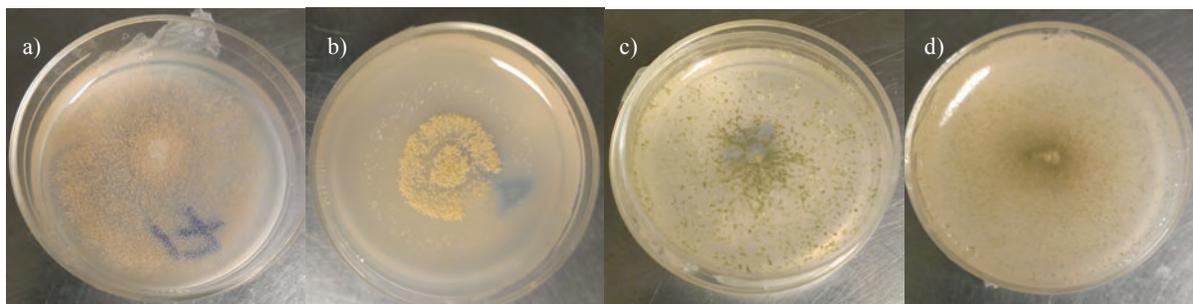


Figura 1. Cultivo en placa Petri al octavo día de crecimiento, a) *Aspergillus terreus* (At 17), b) *Aspergillus ochraceus* (Aoc), c) *Trichoderma sp* (B) y d) *Aspergillus sp* (N).

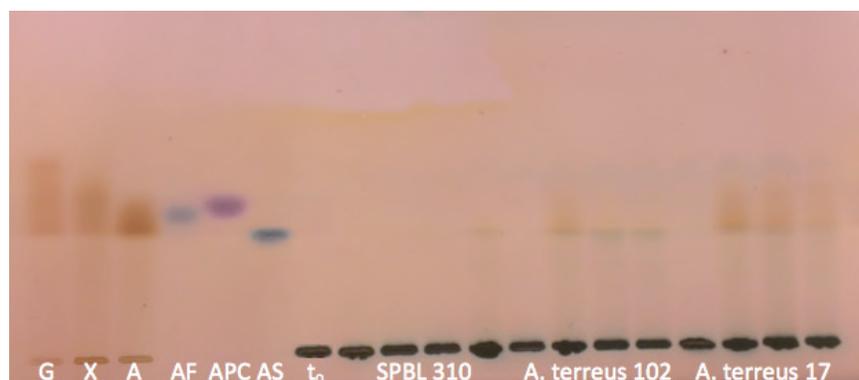


Figura 2. Placa de HPTLC, de izquierda a derecha se muestran los estándares de glucosa (G), xilosa (X), arabinosa (A), ácido ferúlico (AF), ácido p-cumárico (APC), ácido sinapínico (AS), medio de cultivo a tiempo cero (t_0), cinética de SPBL 310 (días 2,4,6,8), cinética de *Aspergillus terreus* 102 (días 2,4,6,8) y cinética de *Aspergillus terreus* 17 (días 2,4,6,8).

En la Tabla 1 se muestran los hongos que presentaron mayor intensidad en las bandas que aparecen en las placas de HPTLC, lo cual nos sugiere que son aquellos que generaron la maquinaria enzimática necesaria para aprovechar los oligómeros de arabinoxilanos presentes en el medio de cultivo. Algunos de éstos hongos ya han sido identificados molecularmente determinándose así su género, además la mayoría de los hongos pertenecientes a éstos géneros identificados ya han sido reportados como productores de celulasas, xilanasas [13,14,15] y feruloilesterasas [16].

Tabla 1. Hongos candidatos de la colección CIAD-CIATEJ capaces de hidrolizar los oligómeros de arabinoxilanos presentes en el nejayote.

CLAVE	CEPA	ACTIVIDAD REPORTADA	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR
B	Hongo verde	Xilanasa	<i>Trichoderma</i>
E	CHJ-1b-III	Celulasa	N.D.
K	Jojo 3 verde	Xilanasa	N.D.
N	MIII-11f-1g	Xilanasa	<i>Aspergillus</i>
O	MIII-II-ZL	-	N.D.
P	Jojo-1-café	-	N.D.
R	C2	-	N.D.
T	MIII-IIf-2g	Xilanasa	N.D.
V	Jojo-1-gris	Xilanasa	<i>Aspergillus</i>
W	MIVIM-2b amarillo	-	N.D.
Y	II5-2c-blanco	-	N.D.
AD	MIII-O-2b	Celulasa	<i>Penicillium</i>
Aoc	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Feruloilesterasa	<i>Aspergillus ochraceus</i>
At 17	<i>Aspergillus terreus</i>	Xilanasa Feruloilesterasa	<i>Aspergillus terreus</i>

Conclusiones

El empleo de un medio de cultivo cuya fuente de carbono mayoritaria son los arabinoxilanos de cadena larga, provenientes del nejayote, permitió encontrar 14 hongos que fueron capaces de hidrolizar los FAXX de cadena larga y producir oligómeros de cadena corta que son de gran interés biotecnológico.

Para conocer que enzimas son las que llevan a cabo la hidrólisis durante el cultivo, se plantea realizar una cinética para monitorear la actividad de las enzimas presentes en cada etapa de la hidrólisis utilizando a los candidatos encontrados así como la identificación de los oligómeros generados.

Agradecimientos

H. Guerrero agradece el financiamiento de beca de maestría y del proyecto PEI 2013-200209 otorgado por el CONACyT.

Referencias

1. Mandalari G., Faulds C., Sancho A., Saija A., Bisignano G., LoCurto R., Waldron K., Fractionation and characterisation of arabinoxylans from brewers' spent grain and wheat bran. *Journal of Cereal Science*, No. 42, p 205–212, 2005
2. Saulnier L., Vigouroux J., Thibault J., Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran, *Carbohydrate research*, No. 272, p. 241-253, 1995.
3. Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Rascón-Chu, A., & Márquez-Escalante, J., Ferulated arabinoxylans and arabinoxylans gels: structure, sources and applications, *Phytochemistry Reviews*, No.9, p. 111-120, 2010
4. Saeed, F., Pasha, I., Anjum, F. M., & Sultan, M. T., Arabinoxylans and arabinogalactans: a comprehensive treatise, *Journal of Food Science and Nutrition*, No. 51, p. 467-476, 2011.
5. Domínguez R., Pacho D., Efluentes de la industrialización del maíz: contaminante o recurso valioso, *Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán*, No. 227, p. 54-63, 2003.
6. Faulds, C.B., Kroon, P.A., Saulnier, L., Thibault, J.F., Williamson, G., Release of ferulic acid from maize bran and derived oligosaccharides by *Aspergillus niger* esterases. *Carbohydrate Polymers* No. 27, p. 187-190, 1995.
7. Fan L., Pandey A., Mohan R., Soccol C., Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Acta Biotechnol* No. 20, p. 41–52 2000.
8. Reddy G., Babu P., Komaraiah P., Roy K., Kothari I., Utilization of banana waste for the production of ligninolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem* No. 38, p. 1457–1462, 2003.
9. Martins E., Silva D., da Silva R., Gomes E., Solid state production of thermostable pectinase from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochem* No. 37, p.949–954, 2002.
10. Panagiotou G., Kekos D., Macris B., Christakopoulos P. Production of cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Ind Crops Prod* No.18, p.37–45, 2003.
11. Assaf A., Reyes M., Method and system for the integral treatment of wastewater from the maize industry, WO2014119990, 2014.
12. Rodríguez, J. A., Mateos J., Nungaray J., González V., Bhagnagar T., Roussos S., Cordova J. and Baratti J., Improving lipases production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochem* No. 41, p. 2264-2269, 2006.
13. Adsul, M. G., J. E. Ghule, Singh, R. Shaikh, H. Bastawde, K. B. Gokhale, D. V., and Varma, A. J., Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers* No. 57, p. 67-72, 2004.
14. Belghith, H., Ellouz-Chaabouni, S. and Gargouri, A., Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Po16) cellulases. *Journal of Biotechnology* No. 89, p. 257-262, 2001.
15. Murashima, K., T. Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, N., Yaguchi, T. and Kono, T., Purification and characterization of new endo-1,4-β-glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* No. 30, p. 319-326, 2002.
16. Benoit, I., Danchin, E. G. J., Bleichrodt, R. J. and de Vries, R. P., Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnology Letters* No. 30, p. 387-396, 2008.