

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CELULASAS EXTRACELULARES A PARTIR DE CEPA NATIVA DE *TRICHODERMA HARZIANUM* USANDO COMO FUENTE DE CARBONO PAJA DE TRIGO DEL VALLE DE MEXICALI

Lydia Toscano Palomar^a, Cristian Correa Leyva^a, María Guadalupe Amado Moreno^a, Kimberly L. Ogden^b, Francisco Gómez Puentes^a

^a Departamento de Ingeniería y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Mexicali, Av. Tecnológico S/N, Mexicali, B.C. 21376, MÉXICO. toscano.lydia@itmexicali.edu.mx

^b Department of Chemical and Environmental Engineering, University of Arizona, 1133 E. James E. Rogers Way, Tucson, AZ. 85721, USA.

Resumen

El propósito de este estudio fue producir enzima celulasa a partir de una cepa nativa *Trichoderma harzianum*, aislada de suelo de cultivo. La producción de celulasa se realizó por dos métodos diferentes de fermentación, sumergida y fermentación en estado sólido. Se utilizó medio mineral Mandels y como fuentes de nitrógeno urea y sulfato de amonio. Se utilizó paja de trigo seca y molida en las fermentaciones como fuente de carbono. La actividad de la celulasa se determinó por medición de azúcares reductores al papel filtro y a la carboximetilcelulosa usando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Los resultados mostraron que la paja de trigo tiene el potencial para usarse como sustrato en la producción de celulasas. *Trichoderma harzianum* mostró actividad enzimática de 0.125 FPU/ml (unidades de papel filtro) y 1.35 U/ml a la CMC (unidades de carboximetilcelulosa) por fermentación en estado sólido (FSS) después de 96 horas de fermentación. El pH óptimo para los dos sustratos se determinó realizando pruebas con buffers de citratos (pH 4 a 6), de fosfatos (pH 6 a 7) y tris-HCL (pH 8 a 9). Para la determinación de la temperatura óptima se manejó el rango de 30°C a 80°C. Las pruebas de almacenamiento se realizaron cada siete días en un periodo de 6 semanas. Se encontró que el pH óptimo de actividad en papel y CMC es de 6. La temperatura óptima de actividad es de 70°C para PF y de 80°C para CMC.

Introducción

En el Valle de Mexicali donde el principal cultivo es el trigo, se genera un residuo agrícola (paja de trigo) del cual el 85% es quemado in situ a cielo abierto en la preparación de la tierra para el siguiente ciclo de cultivo [1]. Este residuo generalmente se acumula en el ambiente causando un problema de contaminación. La biomasa de las plantas considerada como “residuo” es biodegradable y puede ser convertida en productos de valor agregado tales como biocombustibles, fuente barata de energía para fermentación, forraje, productos químicos y nutrientes humanos [2]. Sus componentes incluyen los polisacáridos de celulosa y hemicelulosa, en un rango de 60-80%, lignina y otros componentes que incluyen compuestos extractivos y no extractivos [3]. Una gran variedad de hongos y bacterias pueden fragmentar estas macromoléculas para usarlas como fuente de carbono utilizando enzimas oxidativas o hidrolíticas. Las celulasas son enzimas sinérgicas que se utilizan para separar la celulosa en glucosa u otros compuestos oligosacáridos. El sistema enzimático de los hongos está formado por tres enzimas hidrolíticas: (1) endo-(1,4)- β -D-glucanasa (endoglucanasa, endocelulasa, CMCasa) la cual rompe enlaces β al azar. (2) exo-(1,4)- β -D-glucanasa (celobiohidrolasa, exocelulasa, celulasa microcristalina, avicelasa, CMXasa), esta libera celobiosa y (3) β -glucosidasa (celobiasa) la cual libera glucosa a partir de la celobiosa [4]. Considerando la importancia y la aplicación de las celulasas, este estudio está dirigido a la determinación de la habilidad celulolítica del aislamiento fungal a partir de cultivo de cebollin, *Trichoderma harzianum*, comparando las actividades celulolíticas del complejo enzimático

cuando se utilizan Fermentación Sumergida (FSm) y Fermentación en Estado Sólido (FSS). También se reporta la caracterización del complejo enzimático parcialmente purificado con el objetivo de tener un mejor entendimiento de las condiciones para la producción y actividad enzimática.

Metodología

Microorganismos

La cepa de *Trichoderma harzianum* fue aislada de cultivo de cebollin de la variedad Aspen en suelo del Valle de la Trinidad, localizado en Baja California, México. La identificación de la cepa del hongo aislado se realizó por las características micro- y macro-morfológicas de acuerdo a las claves taxonómicas [5]. Se obtuvieron cultivos puros de la cepa subcultivando en medio Agar Dextrosa Papa (ADP) y manteniendo el subcultivo a 4°C.

Inoculo

La suspensión de esporas para la inoculación de los fermentos se preparó agregando 4 cm³ de agua destilada estéril a cultivos de 10 días de edad en placa Petri y desprendiendo el material fúngico bajo condiciones asépticas. La suspensión de esporas tuvo una concentración de 1.6 x 10⁸ esporas.cm⁻³.

Medio de cultivo y sustrato

El medio de cultivo fue medio mineral Mandels [6], conteniendo en g/L: urea: 0.3; KH₂PO₄: 2; (NH₄)₂SO₄: 1.4; MgSO₄.7H₂O: 0.3; peptona de soya: 0.75; CaCl₂: 0.4 y en mg/L: FeSO₄.7H₂O: 5; MnSO₄.7H₂O: 1.08; ZnSO₄.7H₂O: 1.4; CoCl₂: 2, utilizando paja de trigo molida como fuente de carbono en la fermentación sumergida (FSm) y en fermentación por estado sólido (FSS). La composición del sustrato se reportó en base seca como cenizas, grasa, celulosa, lignina y proteína y se analizaron por métodos estándares dando los resultados de 8.3%, 7.5%, 67.3%, 16.2% y 1.5% respectivamente.

Producción de celulasas por fermentación sumergida (FSm)

Cepas de los microorganismos fueron subcultivados en placas Petri en ADP e incubadas a 29°C por 10 días. Se prepararon suspensiones de esporas cosechadas a partir de las placas Petri con solución salina 1% y 0.1% Tritón X-100. El cultivo se realizó usando frascos Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio y el 5% w/v de paja de trigo molida y ajustando el pH a 5. Se utilizó un inóculo de 1 x 10⁸ esporas/frasco y se incubó con agitación a 29°C por 5 días. Subsecuentemente, los cultivos se filtraron (Whatman No. 1 y Millipore 0.45 µm) y se utilizaron para pruebas enzimáticas. El filtrado del cultivo se utilizó en este estudio como extracto crudo.

Producción de celulasas por fermentación en estado sólido (FSS)

Para la fermentación en estado sólido 5.0 gramos de paja de trigo molida (malla No. 25) se utilizaron en frascos de 500 ml. La paja se humedeció con medio Mandels ajustando la humedad a 60% v/w y el pH a 5. Se esterilizaron por autoclave a 121°C por 20 min antes de inocularse con suspensión de esporas ajustando la concentración a 1x10⁷ esporas/gms. Los frascos se incubaron colocados en posición horizontal a 29°C por 96 horas. Los cultivos se realizaron por duplicado. La extracción de la enzima se realizó con agitación a 200 rpm a temperatura ambiente por 60 min. Se agregó a cada frasco 70 ml de solución salina (NaCl 1%) y 0.1% Tritón X-100. Después de agitar, las muestras se filtraron con vacío a través de gaza de algodón y Millipore 0.45 µm y se midió la actividad enzimática del filtrado.

Extracción de sistema enzimático

Después de las fermentaciones, los extractos enzimáticos se liberaron de material fungal por centrifugación a 4,500 rpm y 4°C para filtrarse posteriormente a través membranas de celulosa 0.45 micras. Las celulasas fueron parcialmente purificadas, precipitándolas de los extractos enzimáticos con

etanol en una relación 1:5 v/v extracto-alcohol, centrifugadas y deshidratadas por liofilización para su preservación.

Actividad Enzimática

La actividad celulolítica del extracto se midió como la actividad al papel filtro (PFU) y actividad a la carboxi-metil celulosa (CMC) [7]. Expresada con relación al medio de cultivo para el hidrolizado de PF y para el hidrolizado de CMC se calcula de acuerdo a la Ec. (1).

$$\text{Actividad enzimática } \left(\frac{U}{mL} \right) = C_g * \frac{1}{M} * \frac{1}{t} * D \quad (1)$$

Donde C_g es la concentración de glucosa medida (g/L); M es el peso molecular de glucosa (0.18 g/ μ mol); t es el intervalo de tiempo de reacción de 60 min y D es el factor de dilución del extracto en el análisis. En la fermentación sumergida (FSm) se midió la actividad enzimática en términos de la hidrólisis al papel filtro y en la FSS se midió la actividad en términos de hidrólisis de papel filtro y de carboxi-metil-celulosa (CMC), esta última por presencia de endoglucanasas. Después de la hidrólisis, los azúcares reductores liberados se estimaron por adición de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El color desarrollado por el complejo se midió en términos de la absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro (HACH, DR 500).

Caracterización del sistema enzimático

La temperatura óptima de la celulasa cruda se determinó en buffer de citratos 0.1 M (pH 4.8) en incubación por 60 min en un rango de 30-80°C en intervalos de 10°C. Para cada temperatura la enzima (1mg/ml) se incubó con PF y CMC. El pH óptimo de reacción se midió con buffer de citratos para pH 3-6, buffer de fosfatos para pH 7-8 y buffer Tris-HCl para pH 9. La estabilidad al almacenamiento se realizó en una suspensión de celulasa cruda (1 mg/ml) en solución salina al 0.25% w/v y Tritón X-100 0.1% y almacenando a 4°C. Se determinó la actividad enzimática residual cada 7 días en un período de un mes.

Determinación de parámetros cinéticos

La constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) de la enzima cruda se determinó para endoglucanasa (CMC_{asa}): variando la concentración de los sustratos 0.5 a 15 mg/ml. La K_m y la V_{max} fueron calculadas de acuerdo al método gráfico de Lineweaver y Burk.

Resultados

En la Figura 1, se muestran los valores de las actividades presentadas por la cepa *Trichoderma harzianum* después de 96 horas de fermentación sumergida y fermentación en estado sólido. Una menor producción de celulasa se observó en la fermentación sumergida en comparación con la fermentación en estado sólido. La producción de celulasa por FSS fue 3.2 veces mayor que la obtenida por FSm. Tendencias similares se reportaron por Rubeena *et al* [8].

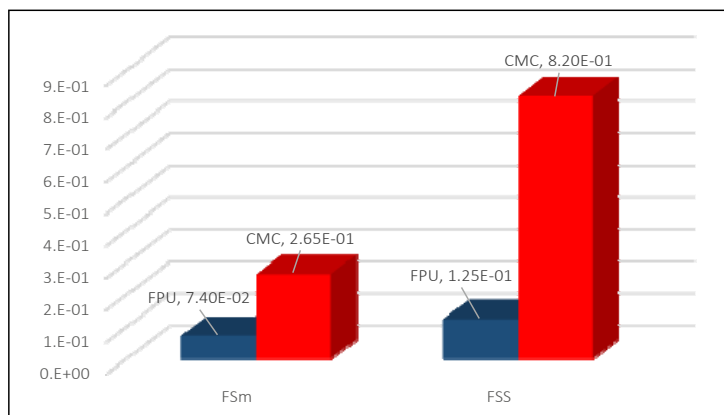


Figura 1.- Producción de celulasa por *Trichoderma harzianum* en FSm (U/ml) y en FSS (U/gss) para las actividades al FPU y a la CMC usando como sustrato paja de trigo.

La figura 2, muestra que la temperatura óptima de la celulasa cruda fue de 70 °C y de 65 °C para la actividad al CMC y al PFU respectivamente. El pH óptimo de la celulasa se determinó sobre un amplio rango de pH y mostró su máxima actividad al pH 5.5 y pH 5 para las actividades al CMC y al PFU de acuerdo a la Figura 3.

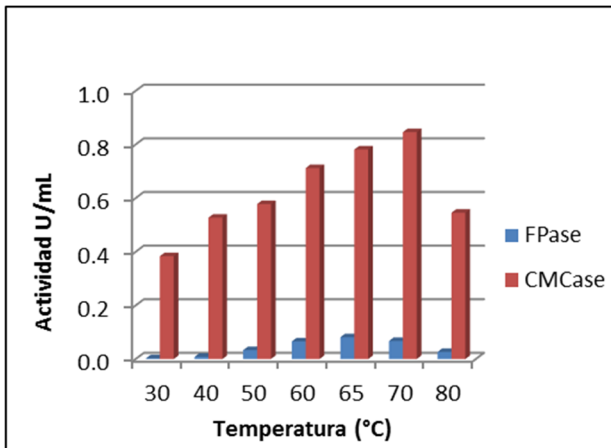


Figura 3.- Temperatura óptima de celulasa cruda a partir de *T. harzianum* para la actividad al CMC y FPU.

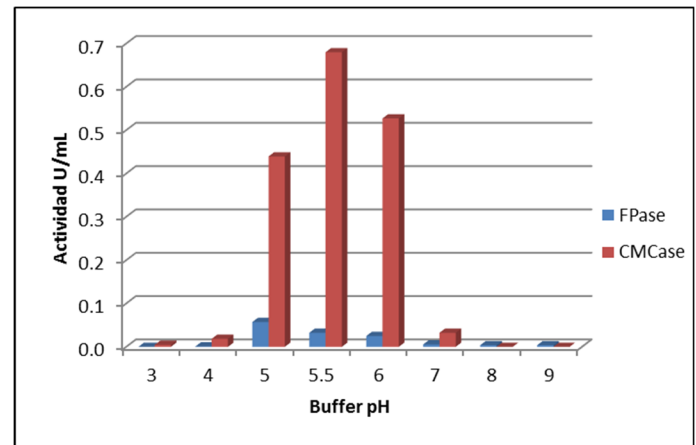


Figura 4.- pH óptimo de la celulasa cruda a partir de *T. harzianum* para la actividad al CMC y FPU.

La cinética de la actividad enzimática sigue un comportamiento de primer orden como se presenta por la Figura 5 con el gráfico de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la celulasa se determinaron por la gráfica Lineweaver-Burk de la actividad enzimática usando varias concentraciones de CMC como sustrato. Los valores fueron de $0.40 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $19.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente.

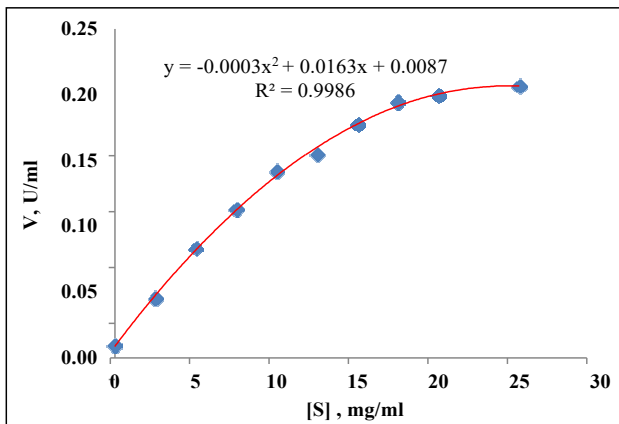


Figura 5.- Gráfica de Michaelis-Menten. Cinética de la actividad de la celulasa cruda a partir de *T. harzianum*.

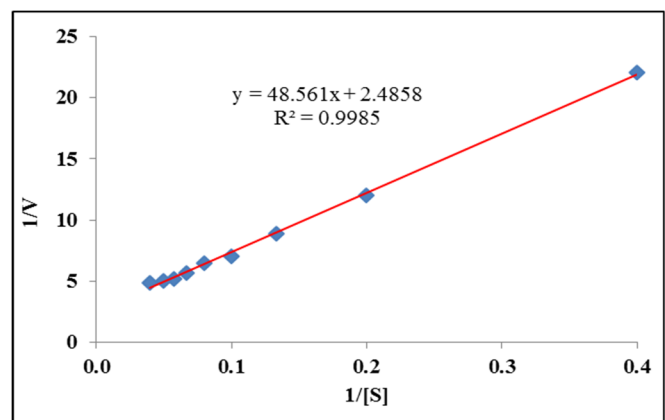


Figura 6.- Gráfico de Lineweaver-Burk en el cálculo de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de celulasa

Conclusiones

En este estudio se ha mostrado que es posible la producción de un complejo de celulasas extracelulares a partir de *Trichoderma harzianum* con una actividad predominantemente de endoglucanasas (CMC) por fermentación en estado sólido utilizando como sustrato y fuente de carbono paja de trigo. La alta temperatura óptima en la actividad enzimática le imparte características favorables en su utilización en procesos de hidrólisis de materiales lignocelulósicos como los residuos agrícolas. Las fermentaciones realizadas en el presente estudio requieren de una posterior investigación en la optimización de la producción de celulasas a partir de un residuo agrícola y su conversión en productos valiosos.

Referencias

1. Nombre de los Autores, “Título del artículo o sección del libro consultado”, *Nombre de la revista o libro (cursiva)*, Vol. X, No. X, p. XX-XX, Año de la publicación. (Times New Roman 10 pt, justificado)
1. Coronado Ortega, M. A., Montero Alpírez, G., García González, C., Pérez Sánchez, A., & Pérez Pelayo, I. J., “Emisiones de las quemadas de paja de trigo en el valle de Mexicali”, 1987-2010. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28, 119-126, 2012.
2. Howard RL, Abotsi E, Jansen van REL, Howard S., “Lignocellulose Biotechnology: Issue of Bioconversion and Enzyme production”, *Afr. J. Biotechnol.* 2(12): 602-619, 2003.
3. Ortiz, W. G. C., “Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de Etanol y Productos Químicos”, *Revista de Tecnología*, 13(1), 39-44, 2013.
4. Wilson, D. B., “Microbial diversity of cellulose hydrolysis”. *Current opinion in microbiology*, 14(3), 259-263, 2011.
5. Cervantes-Díaz, L., Moreno, C. J., Pulido, H. A., Ceceña, D. C., et al. in: Proceedings of XI International Congress XXXVI of the Mexican Society of Phytopathology, A. C., 2009, July 19-23, Guerrero, México, 1-8, 2009.
6. Mandels, M., & Weber, J., “The production of cellulases”, 391-414, 1969.
7. Ghose, T.K., “Measurement of cellulase activities”, *Pure Appl. Chem.* 59: 257-268, 1987.
8. Rubeena M., Kannan Neethu, S., Sajith, S., Sreedevi, S., Prakasan, K., Unni, M., Sarath, V., Pradeep, S., & Sailas, B., “Lignocellulolytic activities of a novel strain of *Trichoderma harzianum*”, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(2), 214, 2013.