

## PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FERMENTACIÓN SÓLIDA EN MESOCARPO DE COCO CON *Trametes polyzona*.

Rincón Reyna J.F.<sup>a\*</sup>, Rincón Reyna P.G.<sup>a</sup>, Mondragón Rojas A. G.<sup>a</sup>, Torres Maravilla E.<sup>a</sup>, Ortiz Moreno A.<sup>a</sup>, Jiménez García E.<sup>a</sup>, Sánchez Pardo M. E.<sup>a</sup>, Arana Cuenca A.<sup>b</sup>.

<sup>a</sup> Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Ingeniería Bioquímica.

Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Colonia Santo Tomás, Del. Miguel Hidalgo, CP 11340, México, D.F., México.

<sup>b</sup> Universidad Politécnica de Pachuca. Laboratorio de Microbiología Molecular. Carretera Pachuca-Ciudad Sahagún Km. 20 Rancho Luna Ex-Hacienda de Santa Bárbara, C.P. 43830, Zempoala, Hidalgo, México. \* [coty\\_9\\_teils@hotmail.com](mailto:coty_9_teils@hotmail.com)

### RESUMEN:

El mesocarpio de coco está formado por fibras duras y un tejido medular, compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. A pesar de los diferentes usos que presenta, es considerado un residuo agroindustrial. Debido a la composición química que presenta, puede utilizarse como sustrato en un proceso de fermentación en estado sólido (FES) con hongos filamentosos productores de enzimas extracelulares con actividades hidrolíticas de interés industrial. En el presente trabajo se describe la producción de las enzimas lignina y manganoso peroxidasa por *Trametes polyzona* mediante fermentación en estado sólido usando como sustrato el mesocarpio de coco. Las actividades enzimáticas se determinaron cada 24 h. durante 10 días, midiendo de forma indirecta la producción de enzimas determinando el contenido de proteína total (método Bradford) y las actividades enzimáticas por el método de oxidación del rojo de fenol para manganoso peroxidasa y el de oxidación del alcohol veratrílico para lignina peroxidasa. Se observó la mayor actividad de ambas enzimas al 9º día, obteniendo valores de 53 U/g de muestra seca para lignina peroxidasa y 2,026 U/g muestra seca para manganoso peroxidasa, considerando la FES como un sistema alternativo para la producción de enzimas oxidativas.

### ABSTRACT:

The coconut mesocarp consists of hard fibers and medullary tissue composed mainly of cellulose, hemicellulose and lignin. Despite of the different uses that presents, it is considered an agroindustrial residue. Due to the chemical composition exhibiting, it can be used as substrate in a process of solid state fermentation (SSF) with filamentous fungi producing extracellular enzymes with hydrolytic activities of industrial interest. In this work the production of lignin and manganese peroxidase enzymes were described by *Trametes polyzona* in solid state fermentation using as substrate coconut mesocarp. Enzyme activities were determined every 24 h. for 10 days, measuring the production of enzymes by determining the total protein content (Bradford method) and the enzyme activities by the oxidation of phenol red for manganese peroxidase and oxidation of veratryl alcohol for lignin peroxidase. The increased activity of both enzymes was observed to 9th day, obtaining values of 53 U/g of dry sample of lignin peroxidase and 2,026 U/g of dry sample of manganese peroxidase, considering the FES as an alternative system for the production of hydrolytic enzymes.

### Palabras clave:

Fermentación sólida, manganoso peroxidasa, lignina peroxidasa.

### Keyword:

Solid state fermentation, manganese peroxidase, lignin peroxidase.

**Área:** Microbiología y biotecnología.

### INTRODUCCIÓN

Una fuente importante de contaminación ambiental proviene de subproductos resultantes de la actividad agroindustrial. El valor agregado de estos residuos puede incrementarse al usarlos como fuente de energía en el crecimiento de microorganismos que los biotransformen, para

obtener metabolitos y enzimas con posibilidad de incorporarse en el procesamiento de alimentos destinados al consumo humano o animal. La producción de enzimas, hoy en día abarca la mayor parte del mercado con precios de venta considerables, lo que implica altos costos en los procesos industriales en los que se utilizan. La fermentación sólida (FES) se define como un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos en ausencia o casi ausencia de agua libre (baja actividad de agua) y se presenta como un método alternativo en la producción de enzimas debido a la simplicidad de los medios de cultivo, facilidad para la obtención y aplicación del inóculo, bajo riesgo de contaminación bacteriana y bajos requerimientos energéticos (Pastrana, 1996).

En general, los sustratos para la FES son productos procedentes de la agricultura o subproductos de la agroindustria como lo es el mesocarpio de coco el cual es la materia prima a emplear en este trabajo; su estructura macromolecular básica (celulosa, hemicelulosa, pectinas, lignina, entre otros) confiere las propiedades de un sólido al sustrato y puede ser utilizado como fuente de carbono y energía para los microorganismos empleados.

Los microorganismos más efectivos para la FES son los hongos, principalmente los del género Basidiomycetes o conocidos como los de podredumbre blanca, ya que son únicos en su capacidad para degradar la mayoría de los componentes lignocelulósicos debido a su capacidad de sintetizar enzimas hidrolíticas extracelulares como son celulasas y xilanasas, además de enzimas oxidativas pertinentes como lo es la lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa que despolimerizan la lignina (Elisashvili *et al.*, 2008).

La lignina estructuralmente es un heteropolímero aromático hidrofóbico con una estructura tridimensional irregular y amorfa, constituida por unidades repetitivas de fenilpropano de alto peso molecular como es el alcohol p-cumárico (4-hidroxicinamílico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinamílico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamílico), que al condensarse forma la estructura polimérica de lignina.

La Lignina Peroxidasa (LiP) (EC 1.11.1.14) es una hemoproteína, cataliza la oxidación de sustratos aromáticos no fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) extracelular. Dicha oxidación ocurre por un mecanismo que consiste en la sustracción de un electrón del anillo aromático de los compuestos de lignina dando lugar a los radicales catiónicos aromáticos correspondientes y reacciones en cadena de radicales libres (Kersten *et al.*, 1985).

La Manganeso Peroxidasa (MnP) (EC 1.11.1.13) cataliza la oxidación del ion  $Mn^{2+}$  al  $Mn^{3+}$  por el  $H_2O_2$  extracelular; oxida solamente las unidades fenólicas de la lignina. El mecanismo de acción del  $Mn^{3+}$  sobre modelos fenólicos es vía formación de un radical fenoxilo que posteriormente evoluciona dando lugar a una serie de productos de reacción parecidos a los obtenidos tras la oxidación por la LiP. Estas enzimas son de interés para los procesos industriales como biorremediación, bi blanqueo de pasta de papel, la degradación y desintoxicación de sustancias recalcitrantes o en la industria alimentaria, de este modo la producción eficiente de estas enzimas por un proceso a bajo costo es de interés para su aplicación en biotecnología (Papinutti and Forchiassin, 2007).

El objetivo de este trabajo es producir enzimas lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa por fermentación sólida en mesocarpio de coco usando el hongo *Bacidiomyceto Trametes polyzona*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sustrato

Los residuos de coco fueron colectados en un punto de venta de coco fruta del Estado de México, donde el coco proviene del estado de Nayarit. Los cascos de coco se lavaron y tallaron con un cepillo sobre la cáscara y endocarpio para retirar todos los residuos de endospermo sólido; se dejaron escurrir y secar. Se eliminó la cáscara y se cortaron láminas de mesocarpio de coco con un grosor de 3-4mm; se deshidrataron y cortaron a un tamaño de partícula de 5x5mm.

### Cepa y preparación del inóculo

*Trametes polyzona* fue aislado en un trabajo previo (Ramírez *et al.*, 2012) en Huejutla, Hidalgo. El hongo se sembró en cajas petri con PDA y se incubaron 5 días a 28°C. La preparación del inóculo se realizó cortando el agar cubierto de micelio en cuadros de 1 cm<sup>2</sup> y pasándolo a un matraz con medio Pontecorvo modificado estéril (50 mL por cada placa), posteriormente se incubó durante 24 h, 28 °C a 180 rpm para la separación del micelio.

### Fermentación sólida

La fermentación sólida se llevó a cabo en tubos de ensaye de vidrio (75 x 150 mm). Los tubos se empacaron con 1 gramo de mesocarpio (con tamaño de partícula de 5mm, seco y estéril) como soporte y única fuente de carbono. El volumen de inóculo fue el necesario para ajustar la humedad del sustrato al 80% de su capacidad de retención de agua. Los tubos se mantuvieron a una temperatura constante de 28 °C durante 10 días, tomando muestras diarias al azar, por triplicado.

### Extracción y ensayos enzimáticos

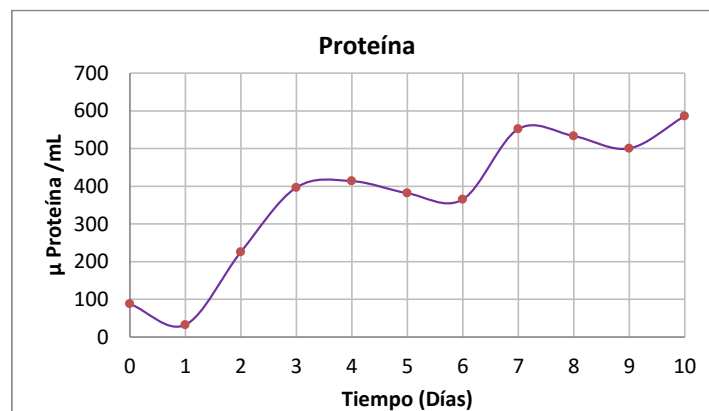
El extracto enzimático se obtuvo agregando 10 mL de agua destilada a cada tubo, se agitaron en un vórtex durante 3 minutos y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes se separaron y como indicativo de producción se determinaron las proteínas totales y la actividad de las diferentes enzimas. La determinación de proteínas totales se realizó con la técnica de Bradford usando albúmina de suero de bovino como estándar (Bradford, 1976).

La actividad de lignina peroxidasa se determinó con el método de (Tien and Kirk, 1983). La determinación se llevó a cabo en celda espectrofotométrica donde la mezcla de reacción contenía 200 µL de regulador de tartrato (250mM, pH=3), 40 µL de alcohol veratrílico 10mM, 710 µL del extracto y 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40mM en el regulador de tartrato, al momento de añadir el último reactivo la celda se coloca en el espectrofotómetro Genesys 10S Uv-Vis, Thermo scientific, en modalidad cinética a 310nm por 2 minutos y se obtendrá el  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ , donde el ajuste se realiza con un blanco. Una unidad enzimática se definirá como la cantidad de enzima necesaria para formar 1µmol de producto (veratraldehído) por minuto ( $U = \mu\text{mol}/\text{min}$ ), bajo las condiciones del ensayo usando un coeficiente de extinción de 9300 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. La actividad enzimática se expresa como U/g muestra seca.

La actividad de manganeso peroxidasa se determinó mediante el método modificado de (Kuwahara *et al.*, 1984) mediante la oxidación del rojo de fenol el cual consiste en la mezcla de 100  $\mu\text{L}$  de rojo fenol (0.01 %), 100  $\mu\text{L}$  de fosfato de sodio (250mM), 200  $\mu\text{L}$  de albúmina sérica bovina (0.5 %), 50  $\mu\text{L}$  de sulfato de manganeso (2 mM), 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM en regulador de acetatos pH= 5.0 y 500  $\mu\text{L}$  de extracto, la mezcla se incubó durante 5 minutos a 30°C y se obtuvo la absorbancia inmediatamente a 610 nm en el espectrofotómetro Genesys 10S Uv-Vis, Thermo scientific ajustando con un blanco. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de rojo fenol por minuto bajo las condiciones de ensayo usando un coeficiente de extinción de  $4460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La actividad enzimática se expresa como U/g muestra seca.

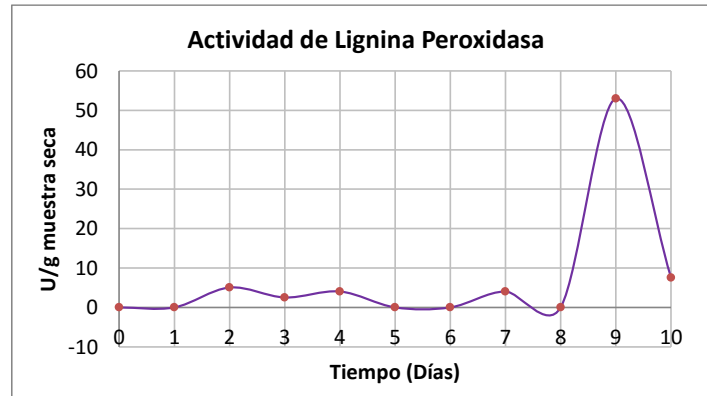
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió un bioproceso para la producción de enzimas industriales, mediante el hongo *T. polyzona* con capacidad de desarrollarse sobre residuos lignocelulósicos por fermentación en estado sólido. Se determinó sobre los extractos la concentración de proteína extracelular y las actividades de lignina y manganeso peroxidasa. Se realizó la cuantificación de proteína con la finalidad de estudiar la relación entre la producción de enzimas lignocelulósicas de *T. polyzona* durante el proceso de fermentación sólida de mesocarpio de coco. Se observó que la mayor producción de proteína se obtuvo el 10° día de cultivo, con 586  $\mu\text{g/g}$  de mesocarpio de coco seco, observando una tendencia a incrementar en días siguientes al 10° (Figura 1).



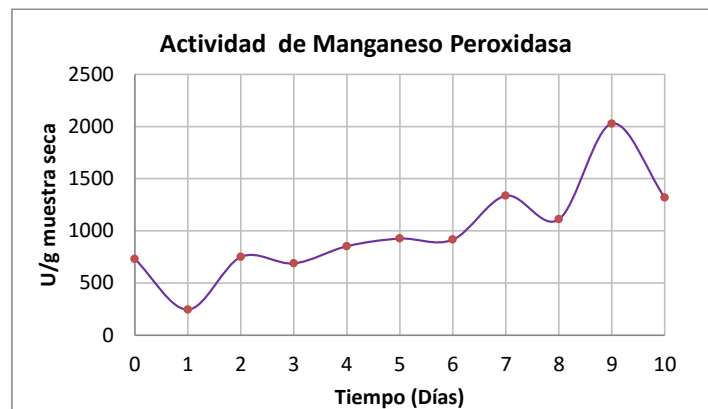
**Figura 1.** Concentración de proteína total producida por *T. polyzona* durante fermentación sólida de mesocarpio de coco.

El perfil de producción de enzimas con actividad de lignina peroxidasa se muestra en la figura 2. En ésta se puede apreciar cómo la producción de enzimas inicialmente es muy baja, se observa actividad a partir del 2° al 5° día, sin embargo se tiene la máxima actividad en el 9° día con 53 U/g muestra seca y disminuye drásticamente al 10° día.



**Figura 2.** Actividad enzimática de lignina peroxidasa producida por *T. polyzona* durante fermentación sólida de mesocarpio de coco.

En cuanto a la producción de manganeso peroxidasa, se observa que durante el paso de los días la producción de ésta incrementa gradualmente donde en el 9° día se observa una actividad máxima de 2,026 U/g muestra seca, y posterior a este se observa un descenso en la actividad (Figura 3).



**Figura 3.** Actividad enzimática de manganeso peroxidasa producida por *T. polyzona* durante fermentación sólida de mesocarpio de coco.

Como se observa en ambas figuras, la máxima actividad se encuentra en el penúltimo día de las cinéticas, donde se debe tener en cuenta que el medio de cultivo formado por celulosa, hemicelulosa y lignina está provocando también la inducción de otras enzimas tales como celulasas, xilanasas y lacasas, lo cual afecta la expresión de las enzimas de estudio (Lorenzo *et al.*, 2002), ya que la producción inicial de enzimas está inducida por la alta cantidad de carbohidratos fácilmente hidrolizables como la celulosa, por lo que la expresión de enzimas como la LiP, se observa hasta los últimos días de la cinética, lo cual no ocurre para la MnP donde reporta (García and Sáe, 2003) que el contenido elevado de azúcares reductores como producto de la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa no afecta la expresión e inhibición de la MnP; así mismo la alta actividad de la MnP hace suponer que con este sustrato se encuentren sustancias inductoras que aumentan como aromáticos en general, y fenoles, que incrementen el contenido de ésta enzima. Así la elección de un sustrato apropiado es de gran importancia para la producción de enzimas ya que no sólo sirve como fuente de carbono y energía, sino que también proporciona los compuestos necesarios para la inducción de las enzimas. Actualmente,

la LiP y MnP, son ampliamente utilizadas en la industria del papel, alimentos, biorremediación de suelos, tratamiento de efluentes, así como en investigación y desarrollo.

## CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra que el hongo *Trametes polyzona* puede ser utilizado para la producción de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa empleando el mesocarpio de coco como sustrato en fermentación sólida considerado un residuo agrícola, ya que permite el crecimiento del microorganismo e induce la producción de estas enzimas. La mayor actividad para LiP y MnP se presentó el 9º día de fermentación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72: 248-254.
- Elisashvili V, Penninckx M, Kachlishvili E, Tsiklauri N, Metreveli E, Kharziani T, Kvesitadze G. 2008. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresouce Technology*. 99: 457-462.
- García TAM, Sáe TGR. 2003. Producción de enzimas lignolíticas por *Basidiomycetes* mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. *Rev. colomb. Biotecnol.* 5(1), 56-64.
- Kersten PJ, Tien M, Kalyanaraman B, Kirk TK. 1985. The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *Journal of Biology and Chemistry*. 260: 2609-2612.
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH. 1984. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS letters*. 169: 247–250.
- Lorenzo M, Moldes D, Rodríguez S, Sanromán A. 2002. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*. 82:109-113.
- Papinutti VL, Forchiassin F. 2007. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *Journal of Food Engineering*. 81: 54-59.
- Pastrana L. (1996) Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos México. 1(3): 4-12.
- Ramírez MC, Rivera RJM, Téllez JA, Gálvez AM, Mercado FY, Arana CA. 2012. Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico. *Journal of Environmental Management*. 95: S256-S259.
- Tien M and Kirk TK. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Burds Science* 221:661-663.