

## Mejoramiento en la producción de celulasas y xilanasas de hongos filamentosos, para su uso en la sacarificación del lirio acuático.

César Isaías Espinoza-Abundis, Evelyn Romero-Borbón, Ricardo Chavarín-Elizalde, Jesús Antonio Córdova-López \*

Laboratorio de Fermentaciones y Biocatálisis, Departamento de Química, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

\* Autor de correspondencia: jesuscordovaudg@yahoo.com.mx

**Energías Renovables** (Biocombustibles).

**Palabras clave:** bioetanol; bagazo de caña; fermentación en medio sólido.

**Introducción.** Las celulasas y xilanasas son enzimas que hidrolizan la biomasa vegetal y tienen diversas aplicaciones biotecnológicas. En particular, estas enzimas son empleadas en la obtención de azúcares fermentables a partir de materiales vegetales (sacarificación), para la producción de bioetanol. Debido a su alta tasa de crecimiento, el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) se considera una especie invasiva de los cuerpos de agua, que afecta tanto al ambiente, como a la salud y a las actividades humanas (Gupta & Yadav, 2020). La biomasa vegetal puede ser empleada como sustrato, soporte e inductor de celulasas y xilanasas, para el cultivo de hongos filamentosos celulolíticos en fermentación en medio sólido (FMS) (Karimi *et al.*, 2021). En este trabajo se aislaron, en total, 128 cepas de hongos filamentosos celulolíticos y se evaluó su producción enzimática en FMS. Seis cepas fueron seleccionadas por su alta producción de celulasas y xilanasas y se estudió la optimización de su producción enzimática.

**Materiales y Métodos.** Para el aislamiento de hongos filamentosos celulolíticos, se realizaron muestreos de plantas de lirio acuático en descomposición (Lago de Chapala, Jalisco) y de bagazo de caña (Ingenio San Cristóbal, Poza Rica, Veracruz). Las muestras fueron depositadas en un medio selectivo de aislamiento a base de lirio fresco, sales minerales y agar; e incubadas a 30°C y 45°C, para el aislamiento de hongos mesófilos y termófilos, respectivamente. Se determinó la producción de celulasas y xilanasas, cultivando cada cepa aislada en FMS por 48 h.

Se utilizó un medio a base de bagazo de caña (como sustrato, soporte e inductor enzimático) y sales minerales. Para la medición de la actividad xilanasas y celulasas, se utilizó xilano y carboximetilcelulosa, respectivamente como sustratos y el método de Miller (1959), para la cuantificación de azúcares reductores. La actividad enzimática se reportó como Unidades/gramo de fermento seco (U/gFS). Para optimizar la producción enzimática, se utilizó un diseño experimental 2<sup>2</sup>. Los factores estudiados fueron la fuente de nitrógeno: NaNO<sub>3</sub> o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el tipo de bagazo de caña: Lavado o sin lavar. Empleando las cuatro cepas que mostraron mayores actividades enzimáticas, se realizó un segundo experimento, en el cual se usó medio de cultivo con una fuente de nitrógeno mixta (50% NaNO<sub>3</sub> y 50% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), con el fin de mantener un pH ligeramente ácido durante la FMS.

**Resultados.** Se aislaron 128 cepas de hongos filamentosos, a partir de muestras de lirio acuático y bagazo de caña. Todas ellas produjeron en diferentes niveles celulasas y xilanasas. En particular, seis cepas fueron seleccionadas por su alta capacidad de producción enzimática en FMS y fueron objeto de estudios de optimización en la producción de enzimas xilanasas y celulasas. Los mejores resultados de actividad xilanasas se obtuvieron al usar bagazo lavado y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fuente de nitrógeno. Para la actividad celulasas, tres cepas mostraron la mayor producción al usar NaNO<sub>3</sub> y bagazo no lavado, las otras tres cepas mostraron alta producción usando (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y bagazo lavado (Tabla 1). Empleando la fuente de N mixta y el bagazo lavado, las actividades xilanasas y celulasas de las cuatro mejores cepas aumentaron considerablemente (Tabla 2).

Tabla 1. Producción de celulasas y xilanasas en el diseño experimental.

Cepa	Nivel de cada factor		Celulasas	Xilanasas
	Tipo de bagazo	Fuente de N	U/gFS	U/gFS
B4112	No lavado	NaNO <sub>3</sub>	17.90 ± 0.39	42.64 ± 0.75
	No lavado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.36 ± 0.16	4.51 ± 0.04
	Lavado	NaNO <sub>3</sub>	8.78 ± 0.16	9.08 ± 0.04
	Lavado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	28.52 ± 0.26	315.36 ± 1.09
ML7R(1)	No lavado	NaNO <sub>3</sub>	8.44 ± 0.24	189.51 ± 3.97
	No lavado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.12 ± 0.28	6.74 ± 0.30
	Lavado	NaNO <sub>3</sub>	1.35 ± 0.28	7.43 ± 0.30
	Lavado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.93 ± 0.54	293.51 ± 6.40
43A545	No lavado	NaNO <sub>3</sub>	10.04 ± 0.16	328.54 ± 3.87
	No lavado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.51 ± 0.40	5.26 ± 0.07
	Lavado	NaNO <sub>3</sub>	4.57 ± 0.40	9.52 ± 0.07
	Lavado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12.95 ± 0.21	381.60 ± 5.23
56CIV	No lavado	NaNO <sub>3</sub>	23.91 ± 0.45	24.29 ± 0.35
	No lavado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.16 ± 0.08	3.72 ± 0.29
	Lavado	NaNO <sub>3</sub>	3.88 ± 0.08	6.77 ± 0.30
	Lavado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	13.34 ± 0.59	493.18 ± 1.15
1S3	No lavado	NaNO <sub>3</sub>	14.21 ± 0.42	15.76 ± 0.45
	No lavado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.83 ± 0.12	4.57 ± 0.45
	Lavado	NaNO <sub>3</sub>	5.14 ± 0.12	6.69 ± 0.45
	Lavado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20.43 ± 0.29	434.82 ± 4.51
SB2R25	No lavado	NaNO <sub>3</sub>	2.73 ± 0.25	2.88 ± 0.20
	No lavado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.36 ± 0.28	0.54 ± 0.80
	Lavado	NaNO <sub>3</sub>	0.98 ± 0.28	1.08 ± 0.80
	Lavado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.243 ± 0.01	138.75 ± 3.64

Los datos representan el promedio y la desviación estándar de dos ensayos.

Tabla 2. Producción de celulasas y xilanasas de cuatro cepas cultivadas en FMS, empleando fuente de nitrógeno mixta (50% NaNO<sub>3</sub> y 50% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Cepa	Actividad celulasas U/gFS	Actividad xilanasas U/gFS
B4112	41.48 ± 0.86	1311.72 ± 6.93
43A545	32.08 ± 0.30	1279.08 ± 16.80
56CIV	33.16 ± 0.56	725.66 ± 27.26
1S3	44.48 ± 0.50	1085.10 ± 22.99

Los datos representan el promedio y la desviación estándar de dos ensayos.

**Conclusiones.** De las 128 cepas de hongos aisladas, seis de ellas mostraron una alta producción de celulasas y xilanasas. Los resultados en la optimización de la producción enzimática, mostraron que lavar el soporte y utilizar (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fuente de N, favorece la producción de enzimas. Además, el utilizar una mezcla de las dos fuentes de nitrógeno, estabilizó el pH durante el proceso fermentativo y aumentó la producción de celulasas y xilanasas en 147% y 235%, respectivamente. Estos cocteles enzimáticos están siendo aplicados en la sacarificación de la biomasa del lirio acuático, para obtener azúcares que serán fermentados para producir bioetanol.

### Bibliografía.

- Gupta, A. K. & Yadav, D. (2020). Biological control of water hyacinth. Environmental Contaminants Reviews (ECR) 3(1) (2020) 37-39.10.26480/ecr.01.2020.37.39.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.
- Karimi, F., Mazaheri, D., Saei Moghaddam, M., Mataei Moghaddam, A., Sanati, A. L., & Orooji, Y. (2021). Solid-state fermentation as an alternative technology for cost-effective production of bioethanol as useful renewable energy: a review. Biomass Conversion and Biorefinery.