



Evaluación de la capacidad de los hongos *Penicillium* y *Aspergillus* spp en la producción de aromáticos y ácidos orgánicos variando la concentración de lignina residual de paja de trigo.

Eliseo Silva Espino^a, E Baltierra-Trejo, J. M. Sánchez-Yáñez, Liliana Márquez-Benavides^a,

^aInstituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, enfriafarmaotmail.com, baltied@yahoo.com.mx, lili.marquez@gmail.com

^bInstituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, syanez01@hotmail.com

RESUMEN

Sin duda, uno de los grandes retos de la humanidad es el de convertir los procesos productivos en limpios, eficientes energéticamente y baratos mediante el uso de microorganismos. La lignocelulosa es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas actuales de energía y materias primas. Subproductos y residuos conteniendo cantidades importantes de lignina, son sustratos atractivos para poder ser utilizado para la producción de insumos en procesos industriales para recuperar algún componente que tenga un mercado demandante. El objetivo de este trabajo fue obtener una producción de compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos con potencial biotecnológicos, a partir de la despolimerización de lignina residual de paja de trigo por Ascomicetos. Para ello se utilizó lignina residual de paja de trigo (LIREPATO) como fuente de carbono en diferentes concentraciones de 20, 30, 40 y 50 g/L, se probaron dos cepas de ascomicetos AT4 y AA4 que se incubaron durante 28 días, muestreando semanalmente para determinar el porcentaje de despolimerización, producción de aromáticos y ácidos carboxílicos mediante pérdida de biomasa y cromatografía de gases respectivamente. Se identificaron aromáticos, ácidos fenólicos y ácidos carboxílicos de cadena corta, existiendo diversidad y cantidad en los primeros 7 días de incubación posteriormente se nota un decaimiento en ambos factores, indicando el metabolismo de ácidos dentro de la primer semana. Encontrándose mayores cantidades de ácido acético y siríngico por el Ascomiceto AA4 en la concentración.

1. INTRODUCCIÓN

Sin duda, uno de los grandes retos de la humanidad es el de convertir los procesos productivos en procesos limpios y eficientes energéticamente. La biotecnología tiene un papel importante que desempeñar en esta transformación tecnológica [1]. Ya que en muchos países, quemar residuos agrícolas continúa siendo la manera más económica y fácil de deshacerse o reducir el volumen de materiales producto de las actividades del campo [2]. Tal práctica repercute considerablemente en las emisiones de CO₂, CO, PM₁₀, CH₄ e hidrocarburos aromáticos policíclicos al medio ambiente, ocasionando un deterioro de la calidad del aire; así como problemas en la salud pública, como son enfermedades respiratorias [3,4]. Desaprovechando el potencial biotecnológico de esta biomasa debido a puede ser utilizado como sustrato para la producción fermentativa de insumos en procesos industriales, o bien, que el material pueda ser sometido a extracciones para recuperar alguno de sus componentes que tenga un mercado demandante [5]. En el caso específico de la lignina residual de paja de trigo, un biopolímero vegetal construido a base de unidades de fenilpropanoides [6], presenta enlaces covalentes de tipo aril-éter, aril-aril y carbono-carbono [1]. La lignina también representa una fuente renovable y potencialmente valiosa para la obtención de



compuestos químicos fundamentalmente de tipo aromáticos y ácidos orgánicos. Por lo tanto, hay un interés en los métodos biológicos de degradación de lignina [6]. Siendo de interés los microorganismos llamados hongos de la podredumbre blanca del phylum Ascomycota que producen enzimas oxidativas como lacasas y peroxidasas [7], estas enzimas no presentan una especificidad alta, por lo tanto pueden tener actividad sobre diferentes compuestos de tipo fenólicos y azo [8]. La lignina al ser despolimerizada, libera guayacol, alcohol coniferílico, alcohol vainillínico, metoximetil fenol, metoxi-p-cresol, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido hidroxibenzoico, alcohol cumarílico, ácido cumárico, syringaldehído, hidrozibenzaldehído [2]. La ruptura de anillos aromáticos a ácidos orgánicos ocurre como continuidad del metabolismo. Tras la ruptura del anillo aromáticos se obtiene una molécula similar a un ácido graso el cual puede ser degradado a acetyl-CoA o hasta ácido acético por β -oxidación, mediante la oxidación de 2 átomos de carbono, en donde la acil-CoA sintetasa (o ácido graso tioquinasa) es la enzima que cataliza esta reacción. El objetivo de este trabajo fue, obtener una producción de compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos con potencial biotecnológicos, a partir de la despolimerización de lignina residual de paja de trigo por *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus fumigatus*.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Cultivo de Ascomicetos.

De la colección del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH se consideraron los ascomicetos AT4 y AA4. La LIREPATO se extrajo de paja de trigo seca, para ello se molió y tamizó en malla de 0.0841 mm, se le adicionó ácido acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$) al 10% (v/v)/30 min en proporción 1:2 (p/v), se neutralizó con NaOH al 10% (p/v), se sometió a 120° C/60 min, se lavó con agua destilada y se secó a 70° C/24 h.

Los Ascomicetos se activaron en medio agar-LIREPATO (g l^{-1}): LIREPATO 10; peptona de caseína 5; extracto de levadura 1.3; K_2HPO_4 0.17; KH_2PO_4 2.61; MgSO_4 1.5; NaCl 0.9; CuSO_4 0.05; se adicionó azul de bromotimol 10 ppm; 2.5 ml de solución detergente al 10% (p/v), y 1 ml l^{-1} de solución de oligoelementos (g l^{-1}): H_3BO_3 2.86; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22; $\text{MnCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.81; KMnO_4 0.09; se agregó agar 18 g l^{-1} , se ajustó el pH a 5.5 y se esterilizó a 121° C durante 20 min [9].

Para separar el micelio del medio agar-LIREPATO se vació a la placa 15.0 ml de solución salina-detergente estéril (12 ml NaCl 0.85% y 3.0 ml detergente 0.01%), se removió el micelio con asa micológica y se recuperó con pipeta. Se inocularon 12.5 ml de micelio de cada ascomiceto en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 300 ml de medio líquido LIREPATO a diferentes concentraciones 20, 30, 40 y 50 g l^{-1} , se incubaron en agitador rotatorio por 28 días a 30° C y 150 rpm. Se tomó muestra a los 7, 14, 21, 28 días para determinar e identificar aromáticos y ácidos orgánicos provenientes del metabolismo de compuestos aromáticos.

Determinación del porcentaje de despolimerización de la LIREPATO.

La despolimerización de la LIREPATO por los Ascomicetos se determinó a los 28 días de incubación, para ello el caldo LIREPATO se filtró y el remanente se lavó con agua destilada, se secó a 70° C por 24h y se calculó el porcentaje de despolimerización por pérdida de peso.

Identificación y cuantificación de aromáticos.

Para el análisis en el cromatógrafo usar una columna capilar (megabore) DB-5 (fennil metil polisiloxano) de 30 m de longitud x 0.53 mm de diámetro interno. Establecer las siguientes condiciones para el análisis: Temperatura del inyector: 270° C, Temperatura del FID: 300° C con rango 12, Flujo de gas transportador (nitrógeno) en columna: 15 ml/min, Flujo de makeup (nitrógeno complementario): 15 ml/min, Flujo de hidrógeno en FID: 30 ml/min, Flujo de aire en FID: 290 ml/min, Programa de temperatura en la columna: Temperatura inicial de 70° C por 4 min, rampa de 20° C/min y temperatura final de 240° C. Tomar 5 mL de las muestras centrifugadas y acidificar a un pH de 1 – 2 con HCl concentrado, adicionar NaCl a saturación y extraer la muestra en una ocasión con 3 ml de acetato de etilo. Colocar los extractos combinados en un baño de hielo



para después llevar la mezcla a temperatura ambiente antes de inyectarla en el cromatógrafo. Usar como patrones una mezcla estándar de los ácidos fenólicos p-hidroxibenzoico, vainillínico, ferúlico y siríngico, así como de vainillina y guayacol, con una concentración de 1mg/ml (p/v) disueltos en acetato de etilo, de la marca Sigma-Aldrich.

Identificación y cuantificación de ácidos orgánicos.

Se determinaron los ácidos orgánicos producto del metabolismo de los productos aromáticos procedentes de la despolimerización de la LIREPATO por cromatografía de gases con un equipo VARIAN CP 3800. Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante 10 min. Inyectar en el cromatógrafo 2.0 μ L con jeringa para líquidos de 5 μ L. El cromatógrafo de gases funciona con una columna capilar para ácidos orgánicos de 60.0 m x 0.53 mm (Agilent 125-3262), el flujo de nitrógeno 10 ml/min. La temperatura del horno, inyector y detector FID fueron de 90.0, 200.0 y 210.0 $^{\circ}$ C, respectivamente. La curva de calibración se preparó con disoluciones de ácido acético, propiónico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, caproico.

4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Determinación del porcentaje de despolimerización de la LIREPATO.

El ascomiceto que logra mayor porcentaje en la despolimerización de LIREPATO fue el AT4 perteneciente al género *Penicillium* con 32.4 % en la concentración de 30 gL^{-1} a los 28 días de incubación, el Ascomiceto AA4 perteneciente al género *Aspergillus* obtuvo su mayor valor de 26.2 % en la concentración de 20 gL^{-1} (tabla 1), la capacidad de ambos Ascomicetos es similar a la reportada en algunos Basidiomicetos como *Phlebia radiata* y *Phlebia brevispora* 29 y 30.5 % ambos a los 30 días de incubación respectivamente [10]. Pero son inferiores a lo reportado en *Trametes versicolor* de 46% a los 21 días de incubación [11]. Aun así entre los tratamientos no presentan diferencia estadística, no obstante no es un resultado determinante para decidir que concentración de LIREPATO es óptima.

Identificación y cuantificación de ácidos carboxílicos.

El Ascomiceto que mantuvo una producción de ácidos orgánicos durante las cuatro semanas de incubación fue el AA4 perteneciente al género *Aspergillus*, se observa que durante la primera semana de incubación (figura 1) existe una producción en cantidad y diversidad por ambos hongos en las 4 concentraciones de LIREPATO. En las semanas restantes (figura 2,3 y 4) se observa una disminución en producción y diversidad en las concentraciones de 30, 40 y 50 gL^{-1} por el Ascomiceto AT4 y AA4 mantiene la producción en diversidad y cantidad en la concentración de 20 gL^{-1} y en las concentraciones de 30, 40 y 50 gL^{-1} la producción de ácido acético. Los resultados obtenidos indican el metabolismo de ácidos orgánicos dentro de la primera semana de incubación, existiendo un mantenimiento de ambos factores en la concentración más baja utilizada de LIREPATO por el género *Aspergillus*.

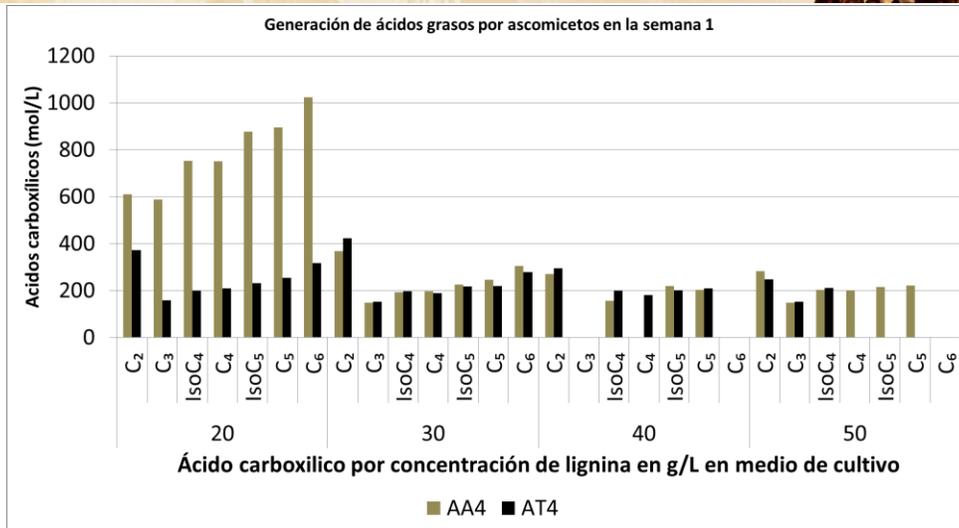


Figura 1 Producción de ácidos orgánicos en la primera semana de incubación por hongos Ascomicetes. C₂ acético, C₃ propiónico, IsoC₄ isobutírico, C₄ butírico, IsoC₅ isovalérico, C₅ valérico y C₆ caproico.

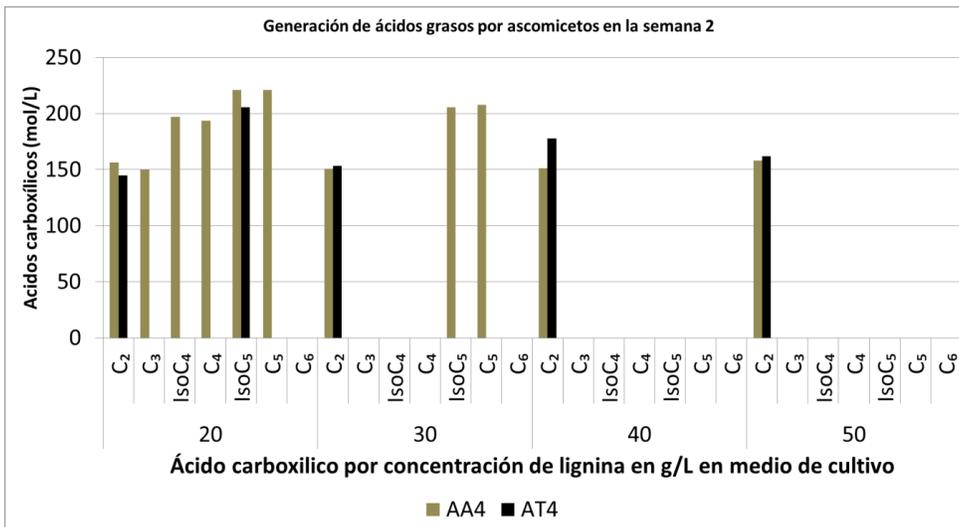


Figura 2 Producción de ácidos orgánicos en la segunda semana de incubación por hongos Ascomicetes. C₂ acético, C₃ propiónico, IsoC₄ isobutírico, C₄ butírico, IsoC₅ isovalérico, C₅ valérico y C₆ caproico.

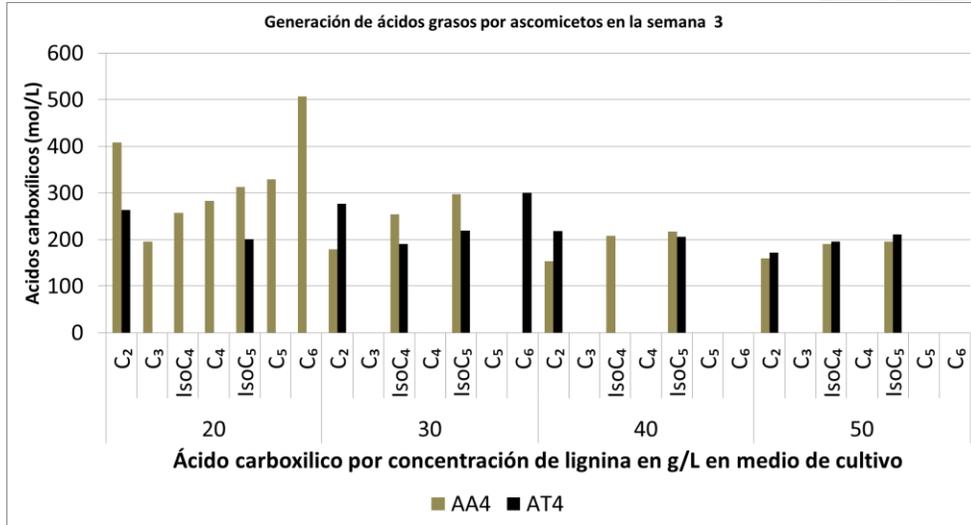


Figura 3 Producción de ácidos orgánicos en la tercera semana de incubación por hongos Ascomicetos. C₂ acético, C₃ propiónico, IsoC₄ isobutírico, C₄ butírico, IsoC₅ isovalérico, C₅ valérico y C₆ caproico.

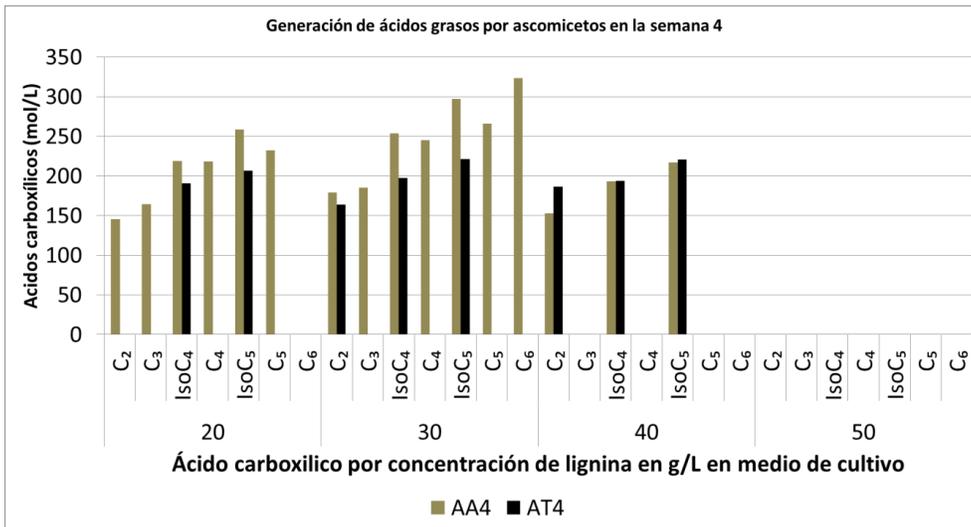


Figura 4 Producción de ácidos orgánicos en la cuarta semana de incubación por hongos Ascomicetos. C₂ acético, C₃ propiónico, IsoC₄ isobutírico, C₄ butírico, IsoC₅ isovalérico, C₅ valérico y C₆ caproico.

Identificación y cuantificación de aromáticos

La producción de aromáticos fue variable a lo largo del experimento pero registrándose máxima en su producción a los 14 días de crecimiento, los aromáticos que se produjeron en mayor abundancia fueron el siríngico con 5249 mg L⁻¹ en la semana 1 de la concentración de 20 mg L⁻¹ de LIREPATO, seguido por ferúlico con 6833 mg L⁻¹ en la primera semana en la concentración de 40 mg L⁻¹ de LIREPATO y el vainillínico con 6974 mg L⁻¹ en la segunda semana en la concentración de 40 mg L⁻¹ de LIREPATO. El HML que produjo mayor concentración de aromáticos fue



Aspergillus fumigatus AA4 en la concentración de 20 mg L⁻¹ de LIREPATO, la concentración 50 mg L⁻¹ tuvo en promedio menor producción de aromáticos (Figura 5 y 6).

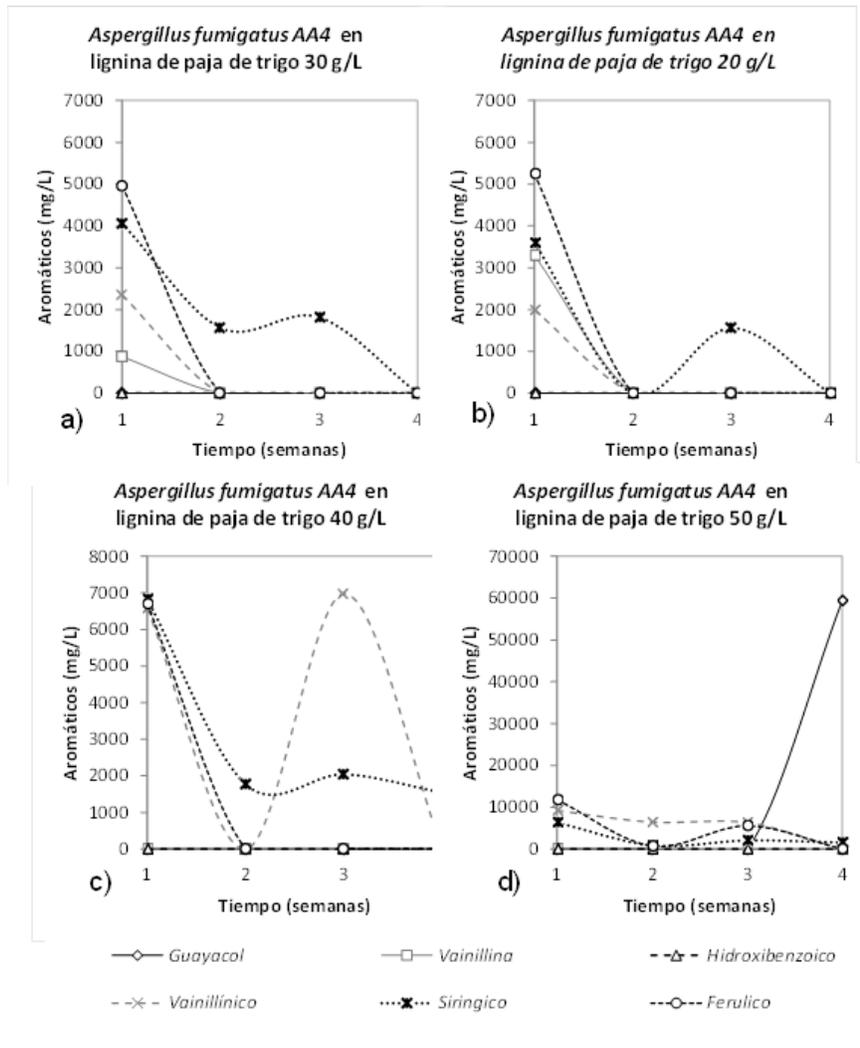


Figura 5 *Aspergillus fumigatus* en la cinética de producción de aromáticos por la despolimerización de lignina residual de paja de trigo a) 20 g/l b) 30 g/l c) 40 g/l d) 50 g/l en 28 días de incubación

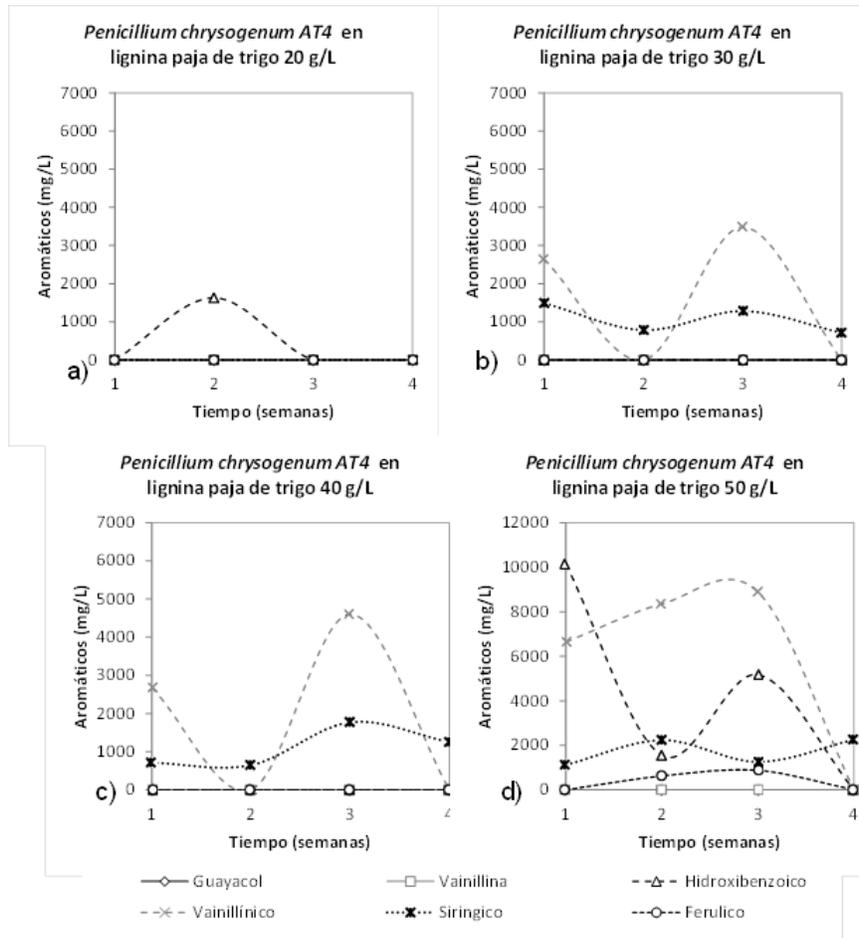


Figura 7 *Penicillium chrysogenum* en la cinética de producción de aromáticos por despolimerización de lignina residual de paja de trigo a) 20 g/l b) 30 g/l c) 40 g/l d) 50 g/l en 28 días de incubación

Los datos obtenidos indican que la LIREPATO resulta ser una materia prima asequible en calidad de sustrato para la producción de compuestos aromáticos procedentes de su despolimerización empleando *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium chrysogenum*.

Aspergillus fumigatus es mejor candidato para producir compuestos aromáticos por despolimerización de LIREPATO por que presento mayor producción en cuanto a cantidad y diversidad de compuestos aromáticos en todas las concentraciones de LIREPATO utilizadas. Por el contrario *Penicillium chrysogenum* solo presento cantidad y diversidad de compuestos aromáticos en la concentración de 50 g/L.



BIBLIOGRAFÍA

1. Dávila G, Vázquez-Duhalt R. Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales. Mensaje Bioquímico. 2006; XXX: 29-55.
2. González García, Yolanda, González Reynoso, Orfil, Nungaray Arellano, Jesús. Potencial del bagazo de Agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos-Gnosis [en línea] 2005, () : [Fecha de consulta: 10 de octubre de 2014] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73000314>> ISSN
3. CCA (2014), La quema de residuos agrícolas: fuente de dioxinas, Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal, Canadá, 6 pp.
4. Coronado-Ortega y col., 2011. Hacia la sustentabilidad: Los residuos sólidos como fuente de energía y materia prima: 270-274.
5. Saval S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. BioTecnología, (16)2:14-46.
6. . Chávez - Sifontes y col., 2013. Av. cien. Ing.4:15-46.
7. Alvira Iráizoz P. Estudio y formulación de nuevos cócteles enzimáticos para la mejora de la producción de etanol a partir de paja de trigo [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia; 2011.
8. Páez Llerena M G. Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil [tesis]. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de ciencias de la vida; 2012.
9. Sánchez-Yáñez J.M., Carrillo J.C., Marqués-Benavides L., Villegas J.A., Dashgupta N. 2007. Breve Tratado De Microbiología Agrícola, Teoría y Práctica. COSUSTENTA, CIDEM, UMSNH, SEDRU. pp: 80-85. Morelia: Michoacán-México. ISBN 978-970-95424-1-7.
10. Arora, D. S., & Sharma, R. K. (2009). Comparative ligninolytic potential of Phlebia species and their role in improvement of in vitro digestibility of wheat straw. Journal of animal and Feed Sciences , 151-161.
11. Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, Á. T., & Martínez, M. J. (2011). Fungal pretreatment:An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. Bioresource Technology , 7500-7506.