
Obtención de enzimas hidrolasas en micelio de *Pleurotus djamor* fermentado en residuos agroindustriales de piña (*Ananas comosus L.*)

Production of hydrolase enzymes in pleurotus djamor micelium fermented in agroindustrial pineapple waste (*Ananas comosus L.*)

Marín Castro Marco Antonio², Soriano Morales Ana Lilia², Portillo Rodríguez Erick², Tejocote Romero Martín², Morales Maldonado Margarita², Sánchez Pardo Ma. Elena³, Mora Escobedo Rosalva³, *Ramos Cassellis Ma. Elena¹

¹ Av. San Claudio y 18 sur Edif.106, Ciudad Universitaria, Puebla, Puebla, México.
cassellis71@yahoo.com.mx

² Av. 14 sur 6301 edificio 103B Ciudad Universitaria, Col. San Manuel. Puebla, Puebla, México.

³ Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Col. Sto. Tomás. C.P. 11340, México D.F.

RESUMEN. México ocupa la séptima posición a nivel mundial en la producción de piña con 701,740 toneladas al año (FAOSTAT, 2011) de las cuales el porcentaje de su pulpa aprovechable puede estar entre el 36.4 y 41.9%, esto genera una gran cantidad de desechos orgánicos.

Se puede decir que residuo es la parte restante después de haber quitado una o más partes, en ocasiones el sobrante es inaprovechable. Sin embargo se busca obtener un beneficio. Se considera que el concepto de residuo agrícola está implícito a materiales sólidos de origen orgánico; aunque su composición suele ser variada dependiendo del tipo de cultivo del que procedan (Balam, 2005). En los últimos años la piña ha adquirido una relevancia significativa por su dinámica económica y por ser una fuente importante de empleo, tanto en la producción y comercialización de la fruta fresca como en el proceso de industrialización, generando residuos orgánicos con gran potencial para el uso como fuente de biodiesel, biogás, en la obtención de fibra y como sustrato de hongos lignocelulósicos para Fermentaciones en Estado Sólido (FES).

La composición química de los residuos de la piña (corazón, corona y cáscara); son principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina. Teniendo en cuenta esta composición, los residuos pueden usarse para el cultivo de *Pleurotus djamor* organismo capaz de producir por la fermentación sólida enzimas celulasas y xilanasas las cuales tienen importantes aplicaciones industriales. Específicamente, las celulasas favorecen la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos y la extracción de aceites comestibles; mientras que las xilanasas tienen aplicaciones importantes en la industria del papel, en la

Recibido: enero, 2013.

Aprobado: mayo, 2013

clarificación de jugos y vinos, en la industria de la panificación, y en la hidrólisis de residuos lignocelulósicos para producción de etanol.

Una de las ventajas que ofrece la obtención de enzimas por fermentación sólida es que son extracelulares, lo que hace que su recuperación sea sencilla. En el presente trabajo se utilizó el residuo de piña y se determinó la capacidad del hongo *Pleurotus djamor* para producir celulasas y xilanasas extracelulares en fermentación sólida, evaluando la actividad enzimática en cada caso.

Palabras clave: Actividad enzimática, xilanas, celulasas, *Pleurotus djamor*.

Keywords: nzyme activity, xylanases, cellulases, *pleurotus djamor*

Objetivo

Aprovechar los residuos agroindustriales de la piña (*Ananas comosus* L), para producir enzimas de interés industrial “xilanasas y celulasas”, utilizando *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una cepa de *Pleurotus djamor* (Fr.) *Boedijn* (DICA-BUAP 10), nativa de Atlixco, Puebla, fermentada en trigo, donada por el Departamento de Investigación en Ciencias Agrícolas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (DICA-BUAP). Los residuos agroindustriales se obtuvieron de una empresa procesadora de piña en almíbar, estos se generaron entre el último trimestre del año 2010 e inicios del 2011.

Acondicionamiento de la muestra

Los residuos de piña se secaron previamente y se tamizaron con un tamaño de partícula de 420 μm .

Microscopía electrónica de barrido

Se realizó un análisis micro-estructural a los residuos de piña; el equipo que se empleó para hacer las observaciones fue un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM-66 10LV Scanning Electron Microscopy (SEM) de baja presión con programa integrado para captura digital de imágenes.

Acondicionamiento de sustratos

Se adecuó la humedad de los residuos de piña hasta el 90% aproximadamente, colocando 25 mL de agua por cada 100 g de muestra, estos fueron colocados en tubos de ensayo de 9 x 15 mL con rosca y fondo plano.

Inoculación del hongo

Cada uno de los tubos se inoculó con (0.5 g) de trigo fermentado con *Pleurotus djamor*, (micelio activado) a temperatura de 25°C, en cada uno de los residuos de la piña durante 30 días, a partir del día 10 se observó el crecimiento del hongo y se procedió a la extracción de enzimas, tomando muestras por duplicado cada 3 hasta los treinta días. (Guillén y col., 1998).

Obtención del extracto enzimático

Se utilizaron buffers de citrato 50 mM a pH de 5.3 y de 4.8. El extracto se obtuvo de la siguiente manera:

En 10 g muestra se agregó 15 mL de buffer de citrato 50 mM (pH 5.3). Se mezcló en una incubadora orbital SEVE-INO650V-7 por 5 min, se recuperó el extracto líquido, el sólido se desechó (Domínguez., 2010).

Purificación del extracto enzimático

El extracto líquido se sometió a una doble centrifugación (CENTRIFUGE 5810R) a 5000 r.p.m. por 34 min, se obtuvo un sobrenadante para la determinación de las actividades enzimáticas (Domínguez., 2010).

Determinación de xilanasas

La determinación de actividad enzimática se realizó usando la técnica de Miller o DNS (1959), a una longitud de onda de 570 nm se preparó una solución de xilano al 1% (p/v) (SIGMA)[®] como sustrato para las xilanasas y una solución de xilosa el 0.1% (p/v) (MEYER)[®] 50 Mm (pH 5.3) (Domínguez., 2010). Se midió la concentración de xilosa de 0 a 1 mg/mL en un espectrofotómetro JENWAY. Se incubaron a 50 °C por 5 min. Al término del tiempo se agregó 0.750 mL de DNS. Posteriormente se sometió a ebullición por 5 min; finalmente se enfrió por 1 min y se realizó la lectura en el espectrómetro a una longitud de onda de 570 nm (Ramírez y col., 2005).

Determinación de Celulasas

La determinación de la actividad enzimática se realizó usando la técnica de Miller o DNS (1959), (Domínguez., 2010). Se preparó una solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 1% (MEYER)[®] como sustrato para celulasas y una solución de glucosa 0.1% (p/v) (MEYER)[®]. 50 mM (pH 4.8). Se midió la concentración de glucosa de 0 a 1 mg/mL en un

espectrofotómetro JENWAY. Se incubaron a 50 °C por 60 min. Al término del tiempo se agregaron 0.750 mL de DNS. Posteriormente se sometió a ebullición por 5 min. Al concluir el tiempo de la ebullición se enfrió por 1 min y se procedió a leer a una longitud de onda de 570 nm (Ramírez y col., 2005).

Arreglo experimental

Se realizaron tres combinaciones de residuos los cuales fueron: Corona (C₁), Cáscara (C₂) y Corazón (C₃). Como variable de respuesta se midió la actividad enzimática de celulasas y xilanasas. Se hicieron mediciones por duplicado de cada muestra. Las muestras se tomaron a partir del día diez de incubación.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una sola vía con una significancia $P \leq 0.05$, utilizando la prueba media de Tukey, comparando los días de las actividades enzimáticas más altas entre cada una de las partes del residuo para determinar el sustrato con la actividad enzimática más sobresaliente. Los datos se analizaron con el software Minitab versión 16 (Montgomery, 2010).

RESULTADOS

Preparación y acondicionamiento de los sustratos

Tamaño de partícula

Los residuos fueron triturados en un procesador de alimentos combinado, HALLDE[®]-CC-32, utilizando una cuchilla estándar. Posteriormente se realizó la separación de las muestras con tamices MONT-INOX[®], utilizando un tamaño de partícula de 420 µm equivalente a 0.0168 pulgadas (Fuertes y col., 1993).

Microscopia electrónica de barrido al sustrato

La Figura 1 representa las micrografías realizadas a cada uno de los residuos de piña, a una magnificación X100, en la Figura 1a se observan diferentes partículas alargadas [PAH], en forma de hilo las cuales poseen una superficie lisa, estas características morfológicas son peculiares de las fibras de algodón y su composición principal es la celulosa, por lo que se pueden atribuir la presencia de fibras celulósicas (Reddy y col., 2007).

Se percibe una sección de pared primaria [SPP] (Lewin, 2007) indicando la presencia de una red de microfibrillas de celulosa, una matriz de hemicelulosa y pectinas que se disponen en esta red. Sobresale la unión de varias fibras largas en forma de placa [HLP], esto significa una alternancia entre cubiertas es decir unas ricas en lignina y otras en celulosa (Paniagua, 2002) como vemos en la Figura 1b. Finalmente en la Figura 1c se

destacan varios aglomerados de fibras con una ligera forma de hilos semi-helicados [HSH] por la presencia de celulosa (Reddy y col., 2007).

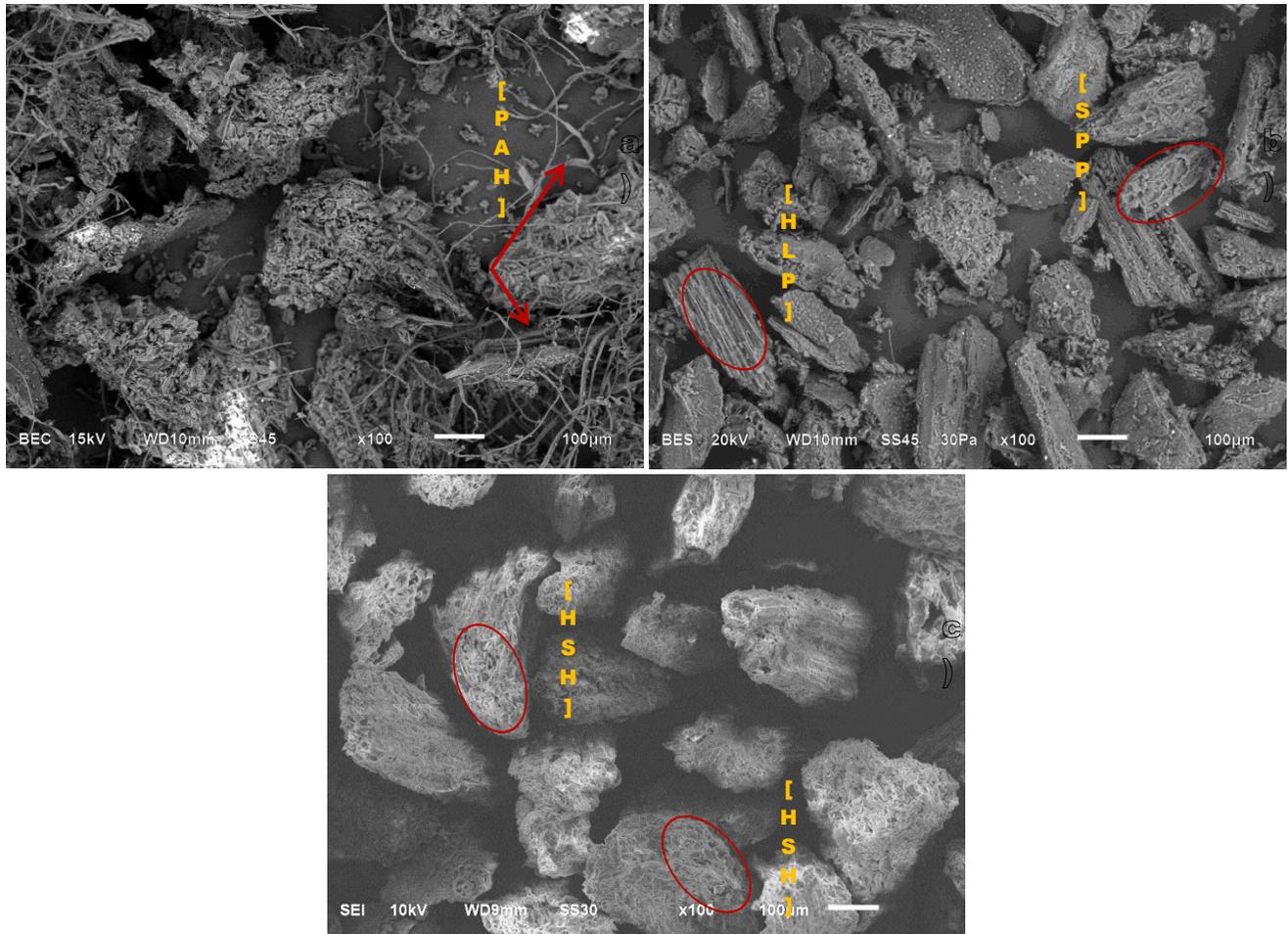


Figura 1. Micrografías de la superficie de a) corona b) cáscara y c) corazón.

Humedad

El aumento de la humedad fue hasta el 90% que es el más apropiado, a porcentajes menores la FES no se llevaba a cabo en su totalidad, deteniéndose en etapas tempranas del desarrollo micelar.

Inoculación del hongo Pleurotus djamor

Los sustratos C₁, C₂ y C₃ con paja de maíz (como soporte) fueron importantes como fuente de carbono para el desarrollo de micelio, observándose la mayor propagación en la combinación de cascara-paja como se observa en la Figura 2, esto fue debido a la cáscara ya que presentaba un alto contenido de compuestos lignocelulósicos con mayor biodisponibilidad esto concuerda con (Peláez, 2010) la composición química, de lignina

30.3%, hemicelulosa 10.1% y celulosa 45.1% beneficiando el desarrollo de la parte micelial de *Pleurotus djamor* y la producción de enzimas hidrolíticas.



Figura 2. Invasión del micelio por casi todo el sustrato, día nueve de fermentación.

Obtención del extracto enzimático

Se obtuvieron 15 mL de extracto enzimático por cada 10 g. de sustrato fermentado a diferentes días, el extracto se utilizó para la cuantificación de la actividad enzimática de celulasas y xilanasas.

Determinación de celulasas y xilanasas

Actividad enzimática

Se determinó que la producción enzimática de xilanasas y celulasas mediante la FES de residuos agroindustriales de piña, donde el tiempo de fermentación y las características del sustrato fueron puntos clave para su obtención. El Cuadro 1 muestra las UI de actividad de xilanasas y celulasas, del cultivo en residuos de piña de *Pleurotus djamor*.

La actividad de xilanasas mostró una tendencia decreciente con respecto al tiempo de incubación; el cual fue mayor en el día 3 usando cáscara como sustrato; al día 30 la actividad disminuyó con respecto a la inicial, observando que la disminución más drástica fue en el día 21, decreciendo cerca del 90% respecto a la actividad más alta para la muestra fermentada con corona.

Cuadro 1. Actividad enzimática de xilanasas y celulasas en los diferentes sustratos.

Tiempo (Días)	Actividad enzimática de xilanasas UI/gSS			Actividad enzimática de celulasas UI/gSS		
	Corona C ₁	Cáscara C ₂	Corazón C ₃	Corona C ₁	Cáscara C ₂	Corazón C ₃

3	0.856	1.917	1.294	0.135	0.017	0.250
6	0.742	1.708	1.515	0.074	0.129	0.055
9	0.803	1.542	0.951	0.124	0.061	0.007
12	0.599	1.531	1.076	0.121	0.178	0.170
15	0.489	1.415	0.848	0.081	0.089	0.096
18	0.663	1.246	1.013	0.098	0.061	0.059
21	0.092	0.658	1.132	0.049	0.076	0.135
24	0.489	0.885	1.332	0.083	0.127	0.100
27	0.854	0.770	1.001	0.069	0.105	0.154
30	0.889	1.204	0.669	0.066	0.191	0.054

La actividad enzimática de celulasas mostro una tendencia oscilatoria donde la mayor actividad enzimática se encontró en el tercer día de fermentación para el sustrato de corona, aunque esta misma tuvo un descenso drástico en el día 9 descendiendo en un 94% aproximadamente; mientras que en cáscara mostró su actividad más alta en el día 30, mientras la actividad enzimática de corona se mantuvo parcialmente constante sin cambios drásticos.

Esto concuerda con Sánchez (2010) y Villegas (2010), ya que dependiendo del porcentaje de polisacáridos presentes en los sustratos, es la cantidad de enzimas producidas, tomando en cuenta los tipos de tratamientos previos a los que se sometan y el tipo de hongo que se utilice para la degradación de estos residuos

Al comparar los resultados obtenidos con los de Sánchez en (2010), donde se midió la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en bagazo de caña de azúcar; se observó que ambos tienen actividades enzimáticas altas en los primeros y últimos días de fermentación para xilanasas y para celulasas los valores de actividad enzimática se mantuvieron constantes por todo el período de fermentación con valores de 0.5 (UI/gSS);

Mientras que en los resultados obtenidos con *Pleurotus djamor* en residuos de piña, las actividades son variables teniendo valores mayores en los primeros días, así como en la mitad de proceso de fermentación comparados con los de Sánchez (2010). Donde podemos decir que existen mejores resultados al tratar residuos agroindustriales con *Pleurotus djamor* para la obtención de enzimas xilanasas.

Con respecto a las celulasas se observó la mayor producción fue en corazón al día 3 con 0.250 UI/gSS, debido a que este sustrato (corazón) puede contener mayor disponibilidad de celulosa comparada con la de cáscara y corona.

Análisis estadístico

Comparación entre las actividades enzimáticas más altas de celulasas en cada sustrato

En la Figura 3 se observan dos grupos (ac, y bc), siendo “bc” y “ac” estadísticamente diferentes; mientras que los residuos con subíndice “ac” (corazón y cáscara) presentan relación estadística, siendo estos los de mayor actividad, por lo tanto los sustratos de mejor rendimiento en comparación con los de corona.

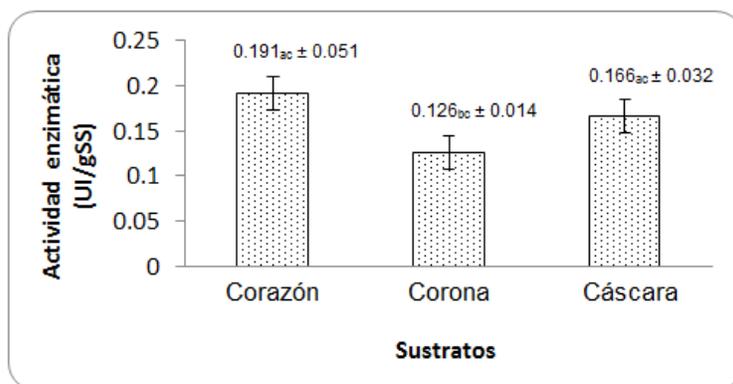


Figura 3. Actividades enzimáticas más altas de celulasas en cada sustrato.

Comparación entre las actividades enzimáticas más altas de xilanasas en cada sustrato. La Figura 4 muestra tres grupos (a, b, y c), donde “c” indica la mayor actividad enzimática, siendo el residuo de cáscara el de mayor rendimiento. Los sustratos de corazón y cáscara, mostraron una actividad enzimática de xilanasas superior en comparación con la corona.

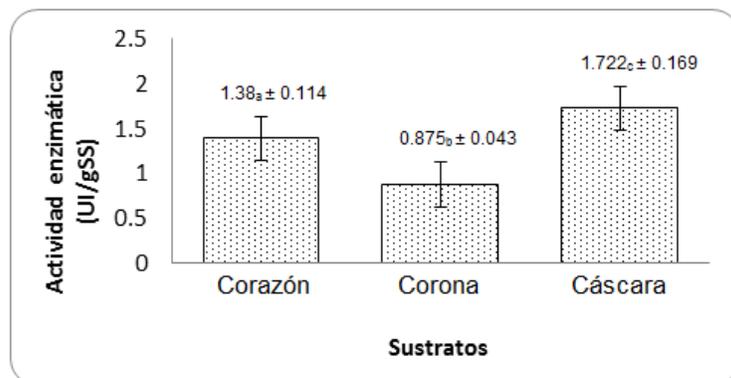


Figura 4. Actividades enzimáticas más altas de xilanasas en cada sustrato.

CONCLUSIONES

En la microscopía se observaron partículas asociadas con compuestos lignocelulósicos que le confirieron un soporte y sustrato rico en nutrientes para la fermentación sólida de *Pleurotus djamor* en la producción de enzimas.

El micelio de *Pleurotus djamor* se desarrolló en forma abundante en los sustratos experimentales, esto demuestra que tienen el contenido nutricional adecuado para el crecimiento del hongo, sin embargo a nivel metabólico se observaron diferencias estadísticas en la generación de las enzimas celulasas y xilanasas, los resultados indican que la actividad enzimática evaluada en los tres sustratos es mayor para ambas enzimas producidas en la cascara y el corazón y en menor grado en la corona de la piña,

En el caso de las celulasas, la mayor actividad se obtiene con el corazón de la piña en función del porcentaje de fibra y carbohidratos contenidos y el estímulo del porcentaje de la paja de maíz adicionado.

Con respecto a las xilanasas la mayor actividad enzimática evaluada se obtuvo con la cascara de la piña, estos resultados se sustentan también en el contenido de celulosa y xilano como constituyente de la pared celular vegetal y el contenido de carbohidratos reportado en este sustrato.

Con respecto a la corona de la piña, se puede concluir que para ambas enzimas la actividad enzimática no presentó significancia, no obstante la cantidad de fibra reportada, probablemente por el menor porcentaje de carbohidratos.

REFERENCIAS

Balam C. R. J, Duarte A. y G. S, Ganché E. G, (2005), Obtención y caracterización de materiales compuestos de fibras de la “piña” de henequén y polipropileno, Unidad de Materiales, Centro de Investigación Científica de Yucatan. Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 5, pp 39-44

Domínguez R. R. (2010) Estudio de la Actividad Enzimática de *Pleurotus ostreatus* Crecido en Rastrojo de Maíz, Universidad Politécnica de Puebla.

FAOSAT (2011) <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anncor> (consultado en Julio 2012).

Fuertes S. Ayala B. Ledesma L. Zumbado H. Benedicto C. (1993), Utilización del níspero japonés salvado de arroz precocido en la elaboración de panqué. Revista de la facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán.

Guillén N. G. K, Márquez R. F. J, Sánchez V. J. E. (1998) Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. Rev Iberoam Micol; 15: 302-306

Lewin M. (2007) Handbook of fiber chemistry, Ed. Taylor & Francis. Third edition

Montgomery D. C. (2010) Diseño y análisis de experimentos. Ed. LIMUSA WILEY. 2da edición. México

Paniagua, R. (2002) Histología y Organografía microscópica vegetal. Citología e Histología Vegetal y Animal. Eds Mc Graw Hill Interamericana. España. Vol 2 pp 250-260.

Peláez A. (2010) Producción de enzimas lacasas e isoformas del género *Pleurotus spp* sobre bagazo de caña de azúcar por cultivo sólido, Colegio de postgraduados, Montecillo, Texcoco Edo. de México.

Ramírez C. L, Aranda I. E, Mendoza M. G. D, Landois P. L, Miranda R. L. A, Crosby G. M. M. (2005) Caracterización de productos fibrolíticos comerciales utilizados en la alimentación de rumiantes. Red de Revista Científica América Latina, Vol. 36, número 001 pp1-9.

Readdy and Yiqi Y. (2007) Structure and Properties Of Natural Cellulose Fibers Obtained from Sorghum Leaves and Stems. J. Agric. Food Chem.55, 5569-5

Sánchez P. (2010) Extractos fibrolíticos fúngicos como modificadores de la fermentación rumial In vitro. Colegio de posgraduados, Montecillo, Texcoco Edo. de México.

Villegas C. M. (2010), Estudio del cultivo solido de paja de sorgo en la producción de enzimas fibrolíticas y digestibilidad rumial in vitro con *Pleurotus sapidus*, Colegio de postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. De México.