

# **Producción de celulasas por inmovilización celular para el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos**

## **Cellulase production by cell immobilization for the treatment of industrial effluents lignocellulose**

Mario Alcarraz Curi<sup>1</sup>, Abad Flores Paucarima<sup>2</sup>, Juan de Dios Godoy Alcarraz<sup>3</sup>

### **RESUMEN**

El tratamiento de efluentes industriales altamente contaminantes requiere de nuevas alternativas tendientes a la disminución de costos y la mayor factibilidad para ser adoptadas por el respectivo sector industrial. La bioconversión enzimática de los residuos lignocelulósicos se constituye en una alternativa promisoriosa para la descontaminación de este tipo de efluentes a favor de nuestros ecosistemas.

La inmovilización de microorganismos industriales en la producción biotecnológica de enzimas significa un aumento en la producción, facilidad en las operaciones unitarias y disminución de costos. La búsqueda de nuevos medios de cultivo para obtener productos biotecnológicos deseados como la celulasas es también vital para elevar el nivel de producción de estos compuestos. Los objetivos planteados fueron inmovilizar esporas y evaluar la producción de celulasas en los diferentes medios de cultivo a base de bagazo de caña. Para inmovilizar se utilizó agar al 2, 4 y 6 % como soportes. La incorporación del microorganismo se realizó en forma de esporas ( $10^6$ /mL) diluidas en Tween 80 al 0.1% en solución salina fisiológica a 45°C en las soluciones de agar a la misma temperatura. Se utilizó la técnica de microgoteo sobre aceite vegetal a 4°C para formar esferas. Se diseñó un modelo de biorreactor de tanque agitado, donde se ensayó medios de cultivo inductores compuestos de bagazo de caña seco (4-6% humedad, 60 Mesh) como fuente de carbono al 4, 8, 16%, sulfato de amonio 0.1; 0.2 y 0.3%, sulfato de

---

<sup>1</sup> Magister en Microbiología, docente de la facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM. E-mail: biomac\_20@hotmail.com

<sup>2</sup> Doctor en Ciencias Biológicas, docente de la facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM.

<sup>3</sup> Bachiller en Farmacia y Bioquímica.

magnesio al 0.5; 1 y 2%, bifosfato de potasio al 0.1, 0.2 y 0.3% y solución salina fisiológica al 0.9% como diluyente final. Se incubó 25 °C, agitados con 100cc de aire/min por 5 días. Se evaluó la actividad celulolítica sobre celulosa microcristalina midiendo la liberación de glucosa espectrofotométricamente durante los 5 días de incubación. Los resultados demuestran la efectividad de los tres sistemas de inmovilización; sobresaliendo el sistema formado por agar al 2%, debido a la mayor densidad microbiana alcanzada en la superficie de las esferas. Los sistemas al 4 y 6% mostraron menor densidad microbiana sobre las superficies de las esferas, debido a la dificultad de las esporas para germinar dentro del agar. El medio compuesto por bagazo de caña al 4%, sulfato de amonio 0.1%, sulfato de magnesio al 0.5% y bifosfato de potasio al 0.2% induce mayor actividad celulolítica a los 3 días de fermentación con *Aspergillus niger*.

**Palabras clave:** inmovilizar, esporas, celulasas, celulosa, bagazo.

## **ABSTRACT**

Industrial effluent treatment requires highly polluting alternatives designed to lower costs and greater feasibility for adoption by the respective industrial sector. Enzymatic bioconversion of lignocellulosic waste constitutes a promising alternative for the decontamination of such effluents on behalf of our ecosystems.

The immobilization of microorganisms in industrial biotechnological production of enzymes is an increase in production, ease of unit operations and reduced costs. The search for new culture media for biotechnology products desired as cellulase is also vital to raise the level of production of these compounds. The objectives were immobilized spores and assessing the production of cellulases in different culture media based on sugarcane bagasse. Agar was used to immobilize the 2, 4 and 6% as carriers. The addition of the microorganism was carried out in the form of spores (106/mL) diluted in 0.1% Tween 80 in physiological saline at 45 ° C in agar solutions at the same temperature. Technique was used on vegetable oil droplet at 4 ° C to form spheres. Model was designed a stirred tank bioreactor, where culture media was tested compounds induce dry bagasse (4-6% moisture, 60 Mesh) as a carbon source to 4, 8, 16%, ammonium sulfate 0.1; 0.2 and 0.3%, magnesium sulfate 0.5, 1

and 2% potassium diphosphate 0.1, 0.2 and 0.3% and saline 0.9% as final diluent. Incubated 25 ° C, agitated with 100 cc air / min for 5 days. Cellulolytic activity was evaluated on microcrystalline cellulose by measuring spectrophotometrically the release of glucose during the 5 days of incubation. The results demonstrate the effectiveness of the three systems of detention, projecting the system consisting of agar to 2% due to increased microbial density achieved on the surface of the spheres. Systems to 4 and 6% showed lower microbial density on the surfaces of the spheres, due to the difficulty of the spores to germinate within the agar. The medium composed of sugar cane bagasse to 4%, 0.1% ammonium sulfate, magnesium sulfate 0.5% and potassium dihydrogenphosphate 0.2% higher cellulolytic activity induced by 3 days of fermentation

With *Aspergillus niger*.

**Keywords:** freeze, spore, cellulase, cellulose, bagasse.

## INTRODUCCION

La alta carga de residuos lignocelulósicos en los efluentes industriales de papeleras, procesadoras de vegetales, entre otras, representa un gran potencial contaminante por la significativa materia orgánica que incrementa los valores de la demanda bioquímica de oxígeno, superando excesivamente los límites permisibles para dichos efluentes. La biotecnología presenta algunas alternativas para el tratamiento de estos contaminantes como el tratamiento enzimático o la bioconversión en compuestos que generen un valor agregado reduciendo su potencial contaminante. Por lo que la búsqueda y producción de enzimas destinadas a la hidrólisis y bioconversión de los desechos lignocelulósicos constituye el inicio de un proceso enzimático para el control de estos contaminantes.

Las enzimas son utilizadas en diversos procesos industriales, ya sea convencionales como en el tratamiento de basura, conversión de desechos vegetales en fertilizantes o alimentos para animales, o nuevos procesos como la textilería o la fabricación de detergentes. Dentro de la industria alimentaria, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles y en la

hidrólisis parcial de materiales lignocelulósicos mejorando la digestión de los rumiantes. Las celulasas incrementan la producción de extracto de productos vegetales, debido a que produce la liberación de componentes del tejido además de liberar el compuesto extra que se encuentra encerrado dentro de las células. Por otra parte, los dominios de unión a celulosa se han usado con gran éxito sobre una matriz de celulosa para facilitar la purificación de proteínas recombinantes.(1)

Actualmente las celulasas comerciales provienen de especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo la cantidad de enzima producida por estos microorganismos es todavía motivo de múltiples investigaciones, puesto que existen múltiples factores involucrados, entre ellos el medio de cultivo, que juega un rol determinante al momento de la expresión de la enzima. La producción biotecnológica puede resultar costosa si no se adopta una estrategia para disminuir los costos de producción, la utilización de residuos industriales (bagazo) aumentaría el rendimiento y disminuiría los costos de producción.

Los aspergillus son miembros ubicuos de la microflora del aire, por ello se encuentran frecuentemente como contaminantes de medios de cultivo. *Aspergillus niger*, como sugiere su nombre es un hongo negro denominado comúnmente “el moho negro”. Esta especie filamentosa es de interés industrial, ampliamente utilizado en la producción de una gran variedad de glucanasas con un espectro tal que puede lograrse la degradación completa de la celulosa. Este hongo muestra algunas ventajas para la producción industrial de enzima: tiene un alto nivel de producción, presenta buenas propiedades para el cultivo lo que posibilita la producción a gran escala además, sus productos son considerados como GRAS (generally regarded as safe), lo que permite su aplicación en la industria de alimentos tanto para el hombre y animales.(2)

El objetivo de esta investigación fue evaluar sistemas de inmovilización de esporas de *Aspergillus niger* y la capacidad inductora de celulasas de 3 medios de cultivo formulados con un residuo industrial, bagazo de caña, para su posible uso en el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se evaluó la influencia de las variables independientes: tipo soporte para inmovilización y formulaciones de medios de cultivo sobre la expresión de celulasas en *Aspergillus niger*. Utilizando el programa MINITAB-15 resultando un total de 9 ensayos controlados.

## **Marco teórico**

### **Celulasas**

Las celulasas o hidrolasas O-Glucosil, son un grupo de enzimas producidas por hongos y bacterias que hidrolizan el puente glicosídico entre dos o más carbohidratos. Estos complejos enzimáticos están compuestos por varios tipos de enzimas, entre las cuales se incluyen las hidrolasas, enzimas hidrolíticas complejas especializadas en el rompimiento y descomposición del enlace glicosídico  $\beta$ -1,4 de la celulosa transformándola en glucosa con el fin de metabolizarla y cumplir así con funciones vitales. La configuración  $\beta$ , le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales se presentan unidas entre sí por medio de enlaces de puentes de hidrógeno dando lugar a la formación de microfibrillas. Estas regiones, conocidas como regiones cristalinas, son altamente ordenadas y le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático. (3)

### **Clasificación de celulasas**

- 1) Exoglucanasas o exo- $\beta$ -1,4-D-glucanasas (E.C.3.2.1.91). También llamadas celobiohidrolasas. Trabajan consecutivamente en cada extremo de la celulosa. Producen glucosa o celobiosa.
- 2) Endoglucanasas o endo-  $\beta$ -1,4-D-glucanasa(E.C.3.2.1.4) Cortan la celulosa en sitios al azar y producen cadenas de oligosacáridos de diferentes longitudes.
- 3)  $\beta$ -1,4-Glucosidasas (E.C.3.2.1.21). Cortan la celobiosa y otros oligosacáridos para producir glucosa.

### ***Aspergillus niger***

Los *Aspergillus* son miembros ubicuos de la microflora del aire, por ello se encuentran frecuentemente como contaminantes de medios de cultivo. *Aspergillus niger*, como sugiere su nombre es un hongo negro denominado comúnmente “el moho negro”. Esta especie filamentosa es de interés industrial, ampliamente utilizado en la producción de una gran variedad de glucanasas con un espectro tal que puede lograrse la degradación completa de la celulosa. Este hongo muestra algunas ventajas para la producción industrial de enzima: tiene un alto nivel de producción, presenta buenas propiedades para el cultivo lo que posibilita la producción a gran escala además, sus productos son considerados como GRAS (generally regarded as safe), lo que permite su aplicación en la industria de alimentos tanto para el hombre y animales. El crecimiento de *Aspergillus niger* ha sido estudiado extensamente sobre discos rotatorios, principalmente con vistas a la producción de ácidos orgánicos. Las esporas de estos hongos son considerados estructuras durmientes. Sin embargo cada vez resulta más claro que muchas esporas contienen enzimas que permiten expresar un amplio rango de actividades, muchas de las cuales puede ser utilizada comercialmente. Las esporas de *Aspergillus niger* poseen la ventaja de ser estables, pueden ser transportadas y luego utilizadas como un conveniente catalizador biológico. El medio requerido es sencillo, constituido solamente por un tampón con o sin glucosa añadida. Cualquier espora que no germine puede ser utilizada posteriormente. (4)

### **Inmovilización de esporas**

El uso de sistemas inmovilizados (biocatalizadores) para llevar a cabo biotransformaciones es un área de la Biotecnología en continua expansión. Un aspecto clave del proceso es el uso del catalizador (célula o enzima) en un sistema continuo que permite extender el uso del mismo en el tiempo dando como resultado una disminución de los costos del proceso y otras ventajas como una mayor pureza del producto, mayor productividad etc. También se puede pensar en la reutilización del biocatalizador en procesos batch. Para lograr este objetivo los biocatalizadores se inmovilizan. La definición de la European Federation of Biotechnology (1983) aclara el concepto. "Los

biocatalizadores inmovilizados son enzimas, células u organelos (o combinación de ellos) confinados o localizados en cierta región definida del espacio, con retención de su actividad catalítica y, si es necesario, de su viabilidad, y que pueden ser usados de modo repetido y continuo”. (5)

### ***Tipos de soportes (carriers).***

Desde el punto de vista químico, las sustancias usadas para soportar a los biocatalizadores pueden ser divididas en inorgánicas u orgánicas, y el origen de las mismas puede ser natural u obtenidas por síntesis.

INORGANICOS: Naturales: arena, silicatos, arcillas. Sintéticos: vidrios de porosidad controlada, cerámicas.

ORGANICOS: Naturales: virutas de madera, antracita, colágeno, celulosa, alginatos, carragenatos, albúmina. Sintéticos: PVC, polipropileno, poliacrilamida, resinas de intercambio iónico, epóxidos, poliuretanos.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

**Sustrato:** Se utilizó el bagazo de caña, material fibroso, heterogéneo en cuanto a su composición granulométrica y estructural, que presenta relativamente baja densidad y un alto contenido de humedad, en las condiciones en que se obtiene del proceso de molienda de la caña.

*Tabla 1. Composición centesimal del bagazo de caña (% base seca).*

<b>Característica</b>	<b>%</b>
<b>Carbono fijo</b>	41,9
<b>Volátiles</b>	46,36
<b>Cenizas (815°)</b>	11,74

*Tabla 2. Composición elemental del bagazo de caña (% base seca).*

<b>Característica</b>	<b>%</b>
<b>Carbono</b>	42,54
<b>Hidrógeno</b>	5,17

<b>Nitrógeno</b>	0,63
<b>Azufre</b>	0,30
<b>Oxígeno</b>	39,62

**Inmovilización de esporas** (*método de Inmovilización durante la preparación del carrier-entrampamiento*): Se preparó una solución de agar-agar estéril (Sigma<sup>R</sup>, Gum agar) en tres diferentes concentraciones: 2, 4 y 6%, se calienta hasta 45° y se añade 1mL de solución de esporas de *Aspergillus niger* (10<sup>6</sup>/mL) diluidas en Tween 80 al 0.1% en solución salina fisiológica (SSF) a 45°C; la mezcla se aspira con una micropipeta a la misma temperatura y se dejan caer microgotas (20µL) de la mezcla en un tubo de 30cm de longitud con aceite vegetal a 4°C. Las esferas formadas se desengrasan con detergente y se secan con aire estéril a 30°C. (3)

**Formulación de medios de cultivo:** se formularon 3 medios: A, B y C, utilizando como única fuente de carbono el bagazo de caña seco con (4-6% humedad, 60 Mesh), suplementado con sulfato de amonio, sulfato de magnesio y bifosfato de potasio en diferentes concentraciones; se utilizó solución salina fisiológica (SSF) como diluyente final. Los medios fueron formulados por triplicado de acuerdo a la siguiente tabla:

*Tabla 3. Composición de medios de cultivo experimentales (%: g/100mL SSF).*

<b>Medio</b>	<b>Bagazo</b>	<b>SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>SO<sub>4</sub>Mg</b>	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>
<b>A</b>	4%	0.1%	0.5%	0.1%
<b>B</b>	8%	0.2%	1%	0.2%
<b>C</b>	16%	0.3%	2%	0.3%

**Fermentador:** se diseñó 9 fermentadores de columna para sistema batch, agitados por inyección de aire filtrado a 100cc/min.



*Fermentación:* 100 gramos de esferas se sembraron en 100mL de los medios autoclavado constituido por bagazo de caña seco (4-6% humedad, 60 Mesh), sulfato de amonio, sulfato de magnesio, bifosfato de potasio y solución salina fisiológica al 0.9% como diluyente final (tabla 3), se incubó a 25 °C, agitados con 100cc de aire/min por 5 días en oscuridad.

*Desempeño del soporte:* Se tomó una muestra diaria de cada soporte y se observó microscópicamente la integridad, el color, la velocidad de germinación de las esporas, la densidad de la biopelícula constituida por los hongos filamentosos y el crecimiento del hongo durante los 5 días. (3)

*Medida de la actividad celulolítica. Actividad endo-b-1,4-Glucanasa (EC 3.2.1.4) o CMCase. Metodo Stutzenberger (1972):* Se tomó 1ml del medio de cada fermento durante los 5 días, las muestras se centrifugaron a 6000g x 30min, los sobrenadantes se filtraron, un mililitro de las soluciones limpias se diluyeron 1:5 con SSF y se añadió 3,5 ml de CMC (celulosa microcristalina) al 1% y 0,1 ml de buffer acetato de sodio 1,0 M (pH 6,0). Este sistema fue incubado a 50 °C durante 30 min. Cumplido el tiempo de incubación, se midió la liberación de glucosa utilizando el Kit Winner Glycemia HK-UV<sup>R</sup>. La actividad fue expresada en unidades internacionales (UI) por ml, considerando una unidad como la cantidad de enzima que libera un micromol de glucosa por minuto.

## RESULTADOS

**Tabla 4. Comportamiento del soporte en el sistema fermentativo.**

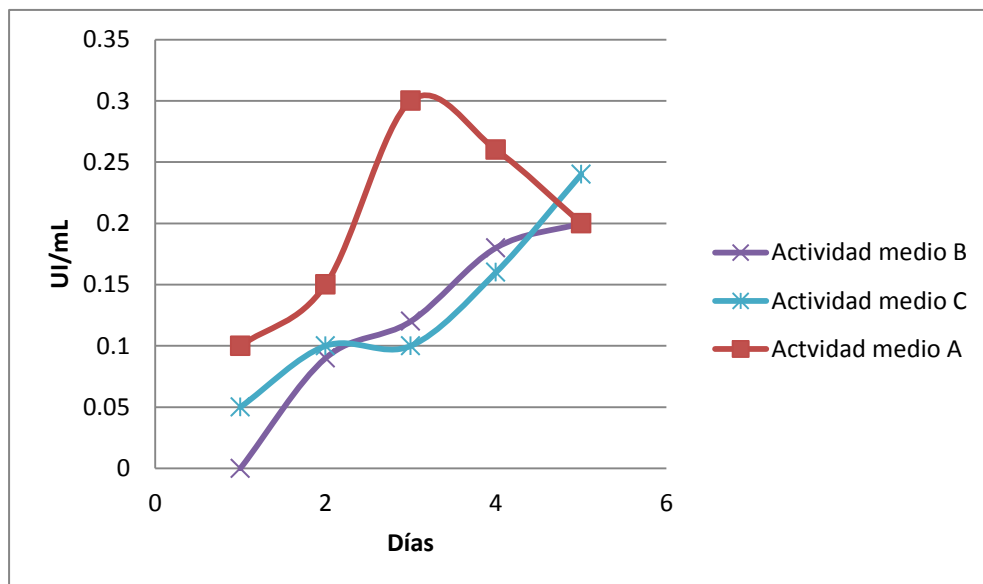
		1	2	3	4	5
<b>Agar 2%</b>	Aspecto	Integro	Integro	Integro	Integro	Integro
	Forma	Esférico	Esférico	Esférico	Esférico	Esférico
	Color	Gris	Crema	Crema	Crema	Crema
<b>Agar 4%</b>	Aspecto	Integro	Integro	Integro,	Ruptura de soporte	Ruptura de soporte
	Forma	Esférico	Esférico	Esférico	Amorfo	Amorfo

	Color	Gris	Gris	Crema	Crema	Crema
<b>Agar 6%</b>	Aspecto	Integro	Integro	Integro	Integro	Integro
	Forma	Esférico	Esférico	Esférico	Esférico	Esférico
	Color	Gris	Gris	Gris	Gris	Gris

**Tabla 5. Aspectos del crecimiento de *Aspergillus niger* en los diferentes soportes**

	Día				
	1	2	3	4	5
<b>Agar 2%</b>	Germinación	Biopelícula Poco densa	Biopelícula Poco densa	Biopelícula densa	Biopelícula muy densa
<b>Agar 4%</b>	No germina	Germinación	Biopelícula Poco densa	Biopelícula Poco densa	Biopelícula densa
<b>Agar 6%</b>	No germina	No germina	No germina	Germinación	Biopelícula Poco densa

Después de 5 días de observación, el comportamiento de los medios inductores se observa en la figura 1.



*Figura 1. Actividad celulolítica de los sistemas fermentativos*

## **DISCUSIÓN**

La concentración del agar es determinante al momento de evaluar la eficacia del soporte. El soporte compuesto por agar al 2%, presentó mejores indicadores de crecimiento, esto se debe a la facilidad de las esporas para germinar, puesto que los nutrientes pueden difundir más fácilmente por el agar al 2% que en agar al 4% o al 6%. La dureza del agar al 4%, no permite la difusión de los nutrientes, además de disminuir las propiedades elásticas del soporte, lo que termina por romper la estructura. Otro factor importante fue el peso de las esferas; el sistema fue agitado con aire filtrado a 100cc/min, la altura alcanzada por las esferas con agar al 2% fue mayor que las alcanzadas por las esferas al 4 y 6%, esto por la densidad de los soportes, mientras más concentrados, más densos y pesados serán.

Los resultados muestran que la inducción de la expresión de enzimas celulolíticas es mayor en el medio A, 0.3UI/mL, este medio constituido por bagazo de caña 4%, sulfato de amonio al 0.1%, sulfato de magnesio al 0.5% y bifosfato de potasio al 0.1% es muy similar a los requerimientos nutricionales para *Aspergillus niger* presentados por *Jagnow et al.* (1991) (190g de sacarosa; 2,3g de nitrato de amonio; 1g de bifosfato de potasio y 0.3g de sulfato de magnesio), la distribución del medio en el sistema fermentativo ha sido uniforme durante los cinco días de fermentación, características que han permitido un buen desarrollo del hongo inmovilizado y una alta actividad enzimática con respecto a los medios B y C. La turbidez del medio A, aumentó gradualmente, interpretándose como un exacerbación del metabolismo fungico, caso contrario del medio B y C, que disminuyeron su turbidez por la formación de aglomerados. El medio B, contiene dos veces la concentración del medio A,

se esperaba una mayor expresión de enzimas extracelulares, sin embargo al analizar la composición total, observamos que existe una gran cantidad de sales que pueden inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* además de la viscosidad alta de este medio, que ha dificultado la distribución del oxígeno en todo el sistema fermentativo, puesto que se han formado aglomerados de bagazo que sedimentan en la base del fermentador y dificultan su aprovechamiento. El medio C es tres veces la concentración del medio, por lo tanto la concentración de sales es mayor, la viscosidad permitió la formación de aglomerados muy pesados para el sistema de agitación por aire, estas dos características de los medios, los hace hostiles para el crecimiento del *Aspergillus niger*. (3-11)

## **CONCLUSIONES**

La inmovilización de *Aspergillus niger* es factible con las tres formulaciones de soporte; sin embargo la formulación de Soporte al 2% de agar evidencia una mejor germinación y en menor tiempo.

El medio A, compuesto por bagazo de caña 4%, sulfato de amonio 0.1%, sulfato de magnesio al 0.5% y bifosfato de potasio al 0.2% induce una mayor actividad celulolítica a los 3 días de fermentación con *Aspergillus niger* inmovilizado.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. G. Immanuel, C. Bhagavath, P. Iyappa Raj, P. Esakkiraj & A. Palavesam(2007) Production and Partial Purification of Cellulase by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* Fermented in Coir waste and Sawdust . The Internet Journal of Microbiology. 2007 Volume 3 Number 1
2. Coral G, Arıkan B, Naldi M, Venmez H. (2002) Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of *Aspergillus niger*Z10 Wild-Type Strain. Turk J Biol 26 (2002) 209-213 © T.BÜTAK

3. Gretty K. Gutierrez Correa M. (2003) Biopelículas de *Aspergillus* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Rev peru. biol.* 10(1): 78-87.
4. Gokhan CORAL (2002) Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of *Aspergillus niger* Z10 Wild-Type Strain \**Turk J Biol* 26 (2002) 209-213 © TUBÜTAK 209
5. Bhat, M.K., Bhat, S. (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15: 583-620.
6. Chesson, A. (1987) Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets, In: Haresign W., and Cole D.J.A (eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*, London, Butterworths, pp. 71-89.
7. Bhat, M.K. (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnology Advances*, 18: 355-387.
8. Gielkens, M.M.C., Dekkers, E., Visser, J., Graaf, L.H. (1999) Two cellobiohydrolases-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10): 4340-4345.
9. Han, J.S., Yoo, Y.J., Kang, H.S. (1995) Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene, *J. Biol. Chem.*, 270: 26012- 26019.
10. Bhella, R.S., Altosaar, I. (1984) Purification and some properties of extracellular  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus awamori*, *Can. J. Microbiol.*, 31: 149-154.
11. HURST P, NIELSEN J. (1997) Purification and Properties of a Cellulase from *Aspergillus niger* Department of Biochemistry, University of Otago, Dunedin, New Zealand *Biochem. J.* (1997) 165, 33-41 33.

