



SELECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS CON ACTIVIDAD FERULOIL ESTERASA Y PECTINASA

Gladys G. Pérez-Morales¹, Ascensión Ramírez-Coronel¹, Francisco Cruz-Sosa¹, Danae H. Meza-Trejo¹, Christopher Augur², Gerardo Saucedo-Castañeda¹.

¹Depto. de Biotecnología, UAM-I, Av. San Rafael Atlixco, No. 186. CP 09340, Del. Iztapalapa, México, D.F., Fax (55) 5804-6554, saucedo@xanum.uam.mx

²IRD-IMEP Boite 441, Université Paul Cézanne, 13397, Marseille, Francia

Palabras clave: Actividad feruloil esterasa, etil ferulato, ácido ferúlico, halos de hidrólisis

Introducción. El ácido ferúlico tiene valor comercial por su actividad biológica y por ser precursor de aromas (1). Su liberación selectiva por enzimas tipo feruloil esterasa (EC 3.1.1.73) facilitan su recuperación a partir de material vegetal. Sin embargo, estas enzimas no liberan ácido ferúlico por sí mismas pues en la pared celular de las plantas hay una gran variedad de material polimérico (celulosa, pectina, lignina, etc.). De esta manera, es necesario emplear enzimas hidrolíticas (pectinasas, xilanasas, etc.) que ayuden a liberar oligosacáridos feruloilados que después son usados como sustrato de las feruloil esterases (2). Utilizamos un método rápido y sencillo que permite seleccionar un mayor número de cepas en menor tiempo. El objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas de hongos filamentosos capaces de producir enzimas tipo feruloil esterasa y pectinasas utilizando medios selectivos y metodologías por halos de hidrólisis.

Metodología. Se cultivaron 13 cepas de hongos filamentosos en cajas de Petri utilizando medio de Bacto Agar (1%) con etil ferulato como sustrato (0.738 g/L). Las cajas se inocularon por triplicado con 5 µl de una suspensión de esporas (10⁷ esporas/mL) preparada con Tween 80 (0.01 %) y se incubaron a 30 °C durante 12 d. Para detectar el rompimiento del enlace éster se utilizó un indicador de pH (verde de bromocresol) inundando la caja Petri (3). Una pectinasa comercial proveniente de un extracto enzimático de *Aspergillus niger* (Poligalacturonasa, EC 3.2.1.15, Sigma-Aldrich), fue utilizada como control positivo de la técnica de revelado (3). La actividad pectinasa se determinó inoculando en cajas de Petri (10⁷ esporas/mL) sobre un medio con agar bacteriológico (15 g/L) y pectina (2 g/L). Se incubó a 30 °C por 4 d y al término del cultivo se inundaron las placas con bromuro de hexadecil-trimetil-amonio al 1 % (HTAB, Sigma-Aldrich), el análisis se realizó por cuadruplicado. Se tomaron muestras que fueron analizadas por cromatografía en capa fina y se eluyeron con una mezcla de metanol: cloroformo (1:49, v/v).

Resultados y discusión. De los 13 hongos filamentosos evaluados, la cepa V12307 (no identificada), presentó crecimiento en el medio selectivo de Bacto Agar y etil ferulato. Al adicionar la solución indicadora de verde de bromocresol se presentó un halo de hidrólisis (Figura 1a y 1b) que indicó la presencia de una actividad tipo feruloil esterasa y la liberación de ácido ferúlico. En la cepa V12307 también se observó actividad pectinasa, la cepa presentó

crecimiento en el medio con pectina y produjo halo de hidrólisis típica de esta actividad enzimática (Figura 1c).



Figura 1. . Halo de hidrólisis (a) de la actividad feruloil esterasa para la enzima comercial (b) la cepa V12307 (c) la actividad pectinasa de la cepa

Por cromatografía en capa fina se obtuvo el R_f del etil ferulato (0.69) y del ácido ferúlico (0.09). Se colocó una muestra del halo de hidrólisis y de la zona no hidrolizada para observar la presencia de ácido ferúlico, el cual se detectó en la zona hidrolizada.

Se calculó el índice de potencia de hidrólisis para la actividad feruloil esterasa (6) y pectinasa (91). La cepa seleccionada tiene un potencial importante para liberar ácido ferúlico a partir de dicotiledóneas, como la pulpa de café, ya que presenta las dos actividades enzimáticas deseadas, feruloil esterases y pectinasa.

Conclusiones. La metodología usada permitió seleccionar una cepa con actividad feruloil esterasa y pectinasa. Un primer análisis morfológico indicó que pertenece al género *Aspergillus*. Se explorará el potencial de aplicación de esta cepa para la liberación de ácidos hidroxicinámicos esterificados a la pared celular de dicotiledóneas.

Agradecimiento. Al financiamiento de CONACYT y al Fondo Sectorial SAGARPA-2005. Proyecto 12187.

Bibliografía.

1. Laszlo, J.A., Compton, D.L. y Li X.-L., (2006). Feruloyl esterase hydrolysis and recovery of ferulic acid from jojoba meal. *Ind. Crops Prod.* 23: 46–53.
2. Saulnier, L y Thibault, J.F. (1999). Review. Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *J. Sci. Food Agric.* 79: 396-4022.
3. Donaghy, J.A. y McKay, A.M. (1994). Novel screening assay for the detection of phenolic acid esterases. *World J Microb. Biotechnol.* 10: 41-44.
4. Antier, P. Mijares, A., Roussos, S., Raimbault, M.Y., Viniegra, G. (1993). Pectinase-hiperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 254–260.