

Aprovechamiento de residuos de raíz de batata para la producción de xilanasas bacterianas: un enfoque sustentable.

Utilization of sweet potato root residues for the production of bacterial xylanases: a sustainable approach.

Presentación: 13 y 14 de septiembre de 2023

Debora Conde Molina

Grupo de Biotecnología y Nanotecnología Aplicada, Facultad Regional Delta, Universidad Tecnológica Nacional, Argentina.
dconde@frd.utn.edu.ar

Guillermina Bogao

Grupo de Biotecnología y Nanotecnología Aplicada, Facultad Regional Delta, Universidad Tecnológica Nacional, Argentina.

Gisela Tubio

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Graciela Corbino

Estación Experimental Agropecuaria San Pedro, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.

Resumen

La producción del cultivo de batatas genera una cantidad significativa de residuos en la región noroeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Con el fin de desarrollar un bioproceso que emplee residuos de raíz de batata para la producción de xilanasas, enzimas de gran aplicación industrial, se aisló y estudió la cepa BX1. El crecimiento de la bacteria y su actividad de xilanasas se evaluó en cultivos líquidos de MSM (medio salino mínimo) + batata, MSM + xilano y MSM + cáscara de batata. Los resultados mostraron que la cepa BX1 presentó la capacidad de producir xilanasas en un bioproceso diseñado en 2 etapas, primero un batch con medio MSM + batata (5 %p/v) para generar biomasa, y luego esta biomasa se cosechó y empleó en un batch con medio MSM + xilano (0,5 %p/v) para inducir la producción de xilanasas. Esta actividad enzimática se localizó en la fracción extracelular.

Palabras clave: Residuos de batata, xilanasas, bioproceso.

Abstract

Sweet potato crop production generates a significant amount of waste in the northwestern region of the province of Buenos Aires, Argentina. In order to develop a bioprocess that uses sweet potato root residues for the production of xylanases, enzymes of wide industrial application, strain BX1 was isolated and studied. The growth of the bacterium and its xylanases activity was evaluated in liquid cultures of MSM (minimal saline medium) + sweet potato, MSM + xylan and MSM + sweet potato peel. The results showed that strain BX1 showed the ability to produce xylanases in a bioprocess designed in 2 stages, first a batch with MSM + sweet potato (5 % w/v) medium in order to generate biomass, and then this biomass was harvested and used in a batch with MSM + xylan (0.5 % w/v) medium to induce xylanase production. This enzyme activity was localized in the extracellular fraction.

Keywords: Sweet potato residues, xylanases, bioprocess.

Introducción

El xilano es el mayor constituyente de la hemicelulosa, siendo la hemicelulosa el segundo polisacárido renovable más abundante de la naturaleza después de la celulosa. Las xilanasas son un grupo de enzimas extracelulares que actúan sinérgicamente sobre el xilano. Debido a la heterogeneidad del xilano, su hidrólisis requiere de la acción de un sistema complejo de enzimas el cual comprende a aquellas que actúan sobre la cadena principal: endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8), exo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.156) y β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), como las que desprenden los grupos laterales unidos a los residuos de xilosa: α -glucuronidasas (EC 3.2.1.131), α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), feruloilesterasas (EC 3.1.1.73), acetil-xilanoesterasas (EC 3.1.1.6) y galactosidasas (EC 3.2.1.22) (Mendonça et al. 2023). Principalmente se han caracterizado varias enzimas xilanólíticas de origen fúngico, tales como *Phanerochaete*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum*, *Penicillium*, *Nonomuraea*, *Streptomyces*, *Actinomadura*. En menor medida se han estudiado la producción de xilanasas en bacterias, en los géneros *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*. Particularmente las xilanasas bacterianas presentan actividades óptimas a neutro o alcalino, entre pH 5 y 9, lo que las hace aplicables a muchos usos industriales. Mientras que la aplicación de xilanasas fúngicas requiere pasos adicionales en los procesos debido a que sus actividades óptimas se encuentran en el rango de pH ácido. Además, las estabildades y actividades de las xilanasas producida a partir de fuentes bacterianas presentan amplio rango de temperatura de 30 a 60 °C (Alokika & Singh 2019). Por lo tanto la exploración de xilanasas de origen bacteriano resulta promisorio para las diversas aplicaciones industriales.

Las enzimas xilanólíticas se emplean en numerosos procesos industriales, como en blanqueo de pulpa Kraft, aditivo en panificados y en alimentos para animales, bioconversión de lignocelulosas en materias primas y combustibles. La aplicación comercial de xilanasas en varios de los procesos industriales ha tenido un éxito limitado debido a varios factores. Estos incluyen la inaccesibilidad del sustrato por parte de las xilanasas debido a limitaciones físicas, la limitada hidrólisis de xilanos debido a su naturaleza ramificada, inestabilidad térmica, rango de pH acotado, inhibición por el producto final y costo de producción de enzimas (Veeresh & Jin 2012; Chakdar et al. 2016). Este último problema puede ser superado en cierta medida por el uso de sustratos de bajo costo, por lo que es necesario continuar en la búsqueda de nuevas fuentes y la optimización de los bioprocesos. Además, la utilización de residuos agroindustriales tiene incidencia en la preservación del medio ambiente, al considerar el desarrollo de tecnologías orientadas hacia una transformación sustentable de los recursos naturales. La búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil adquisición que puedan ser utilizados como sustratos fermentables (fuentes de C o N) constituye uno de los retos más interesantes de la biotecnología actual (Liguori et al. 2013; Conde Molina et al. 2021). En este sentido, en la región de San Pedro, Buenos Aires, Argentina, la producción de batata genera una cantidad considerable de residuos debido a que aproximadamente el 40% de la producción total no cumple con los requisitos para su comercialización y se descarta. Esta situación plantea una oportunidad para el aprovechamiento de estos residuos agroindustriales como materia prima en procesos biotecnológicos.

En este contexto, el presente trabajo se centra en el desarrollo de un bioproceso que emplee residuos de la raíz de batata como sustrato para la producción de xilanasas bacterianas. La región de San Pedro, con su considerable producción de batata y la presencia de industrias papeleras y de alimentos, ofrece un escenario propicio para el estudio y aprovechamiento de estos residuos agroindustriales en la producción de enzimas de interés industrial. El objetivo de este estudio es contribuir al avance hacia una bioeconomía sustentable, promoviendo la valorización de residuos y el desarrollo de tecnologías biotecnológicas que permitan la producción local de xilanasas y reduzcan la dependencia de importaciones en Argentina.

Desarrollo

Aislamiento de bacteria productora de xilanasas

Inicialmente se aisló una cepa bacteriana con capacidad de crecer en un medio de cultivo formulado con extracto de raíz de batata. Para ello se enterraron cáscaras de batata en suelo fértil, incubando la preparación a 22 °C. Luego de 15 días se colocó 1 g del suelo en un erlenmeyer de 250 mL que contenía 50 mL de medio salino mínimo (MSM) con 5 %p/v de extracto de raíz de batata. Esta preparación se mantuvo a 135 rpm y 25°C durante 3 días. A continuación, se utilizó 1 mL del cultivo obtenido para inocular un nuevo MSM + batata fresco, y

nuevamente se incubó a 135 rpm y 25°C durante 3 días (Conde Molina et al. 2019). Luego se tomó una alícuota del cultivo resultante y se sembró en placas de Petri conteniendo medio sólido de MSM + xilano. Las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días (Figura 1). De esta manera se obtuvieron colonias aisladas de una cepa bacteriana con doble capacidad, de crecer en un medio de cultivo formulado con extracto de batata y de producir xilanasas. Dicha cepa bacteriana se denominó BX1. La cepa BX1 se criopreservó con glicerol (15 %v/v) para su estudio.



Figura 1. Procedimiento de aislamiento de una cepa bacteriana con doble capacidad, de crecer en un medio de cultivo formulado con extracto de batata y de producir xilanasas.

Caracterización de bacteria productora de xilanasas

La cepa BX1 se caracterizó según la morfología de las colonias en placas con medio sólido Luria-Bertani luego de 48 hs de incubación a 25 °C. La morfología celular y tinción de Gram se determinaron por microscopía óptica.

El crecimiento de la cepa BX1 y su actividad de xilanasas se estudió en cultivos líquidos formulados con MSM + batata (5 %p/v), con MSM + xilano (0,5 %p/v) y con MSM + cáscara de batata (5 %p/v), según se indica en la tabla 1. Los experimentos que se realizaron en 2 etapas, es decir considerando el batch 1 y el batch 2, implican que el total de la biomasa del batch 1 fue cosechada mediante centrifugación en esterilidad para inocular el batch 2. Los cultivos se incubaron a 25 ° y 135 rpm, acorde a las condiciones de aislamiento.

Tabla 1. Condiciones de formulación de los medios de cultivos.

	Batch 1	Batch 2
Experimento 1	MSM + batata	-
Experimento 2	MSM + xilano	-
Experimento 3	MSM + batata	MSM + xilano
Experimento 4	MSM + batata	MSM + cáscara de batata

A partir de los cultivos se realizaron determinaciones de biomasa, actividad de xilanasas y pH. La biomasa bacteriana se estimó mediante densidad óptica (DO) a 600 nm. La actividad de xilanasas se determinó empleando como sustrato el xilano de haya (1%) a 50 °C (buffer citrato de sodio 50 mM, pH 6), los azúcares reductores

liberados se determinaron por el método de Nelson-Somogyi (McCleary & McGeough 2015). El pH se midió empleando un pHmetro.

Adicionalmente, con el fin de identificar la localización de actividad de xilanasas de la cepa BX1 se analizaron tres fracciones de los cultivos. Para ello, una alícuota de cultivo se centrifugó (13.500 rpm, 18 °C, 15 min) y se obtuvo el sobrenadante, sobre el cual se ensayó la actividad de xilanasas extracelular. Por otro lado, el pellet celular se resuspendió en buffer citrato de sodio (50 mM, pH 6) para ensayar la actividad de xilanasas asociada a la célula. Asimismo, otra fracción de pellet celular resuspendida en buffer citrato de sodio (50 mM, pH 6) fue tratada en el sonicador durante 15 min, con el fin de lisar las células y obtener un homogenato celular, sobre cuya fracción se ensayó la actividad de xilanasas intracelular.

Estudio de la cepa BX1

A partir del aislamiento de la cepa bacteriana con doble capacidad, de crecer en un medio de cultivo formulado con extracto de batata y de producir xilanasas, denominada BX1, se determinaron las características morfológicas de la misma. Las colonias de BX1 crecidas en placas con medio sólido mostraron ser de forma irregular, de elevación convexa, de borde ondulado, de textura suave brillante y de color blanquecina. La morfología celular fue coco y el tipo de pared celular Gram negativa (Figura 2).

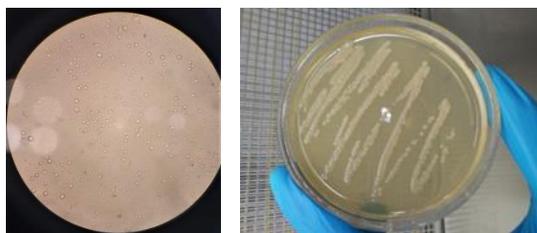


Figura 2. Caracterización morfológica de la cepa BX1.

La capacidad de la cepa BX1 para producir xilanasas se estudió en conjunto con el crecimiento bacteriano (Figura 3). En base a los ensayos realizados pudimos observar que la cepa BX1 generó una biomasa muy importante (DO=9) en un medio formulado con MSM + batata a los 5 días, pero no se detectó actividad de xilanasas durante el tiempo de incubación (experimento 1). Por otro lado en un medio formulado con MSM + xilano, la bacteria presentó muy bajo crecimiento (DO=1,4) y no se detectó actividad de xilanasas (Experimento 2). Probablemente la baja cantidad de biomasa generada en MSM + xilano se debió a la baja concentración de xilano (0,5% p/v), y en consecuencia la actividad de xilanasas ha sido tan baja que no pudo detectarse.

A partir de estos resultados se realizó el Experimento 3, que constó de dos etapas. El primer batch se realizó con el propósito de generar biomasa de BX1 en MSM + batata, siendo este un medio de bajo costo. Luego la biomasa resultante se cosechó y se empleó para inocular un segundo batch en MSM+ xilano con el fin inducir la producción de xilanasas. De esta manera fue posible detectar actividad de xilanasas de 7 U/mL a partir de los 7 días del total del proceso (Figura 3). Es importante destacar que esta actividad se localizó en la fracción extracelular del cultivo, mientras que en las fracciones intracelular y asociada a la célula no se detectó actividad enzimática.

Siendo que el sustrato de xilano es un inductor de alto costo, a continuación diseñamos el Experimento 4. El mismo se basó en simular el Experimento 3, pero reemplazando el xilano por cáscara de batata. Esto se basó en el hecho de que la cáscara contiene hemicelulosa. Los resultados mostraron que la cáscara de batata no fue capaz de inducir la producción de xilanasas en las condiciones ensayadas (Figura 3). En contraparte, se han reportado una amplia variedad de residuos lignocelulósicos con resultados favorables en la producción de xilanasas, tales como bagazo de caña de azúcar, paja de arroz, salvado de arroz, salvado de trigo, paja de trigo, melaza de caña, orujo de manzana, paja de sorgo y cáscara de cebada (Chakdar et al. 2016).

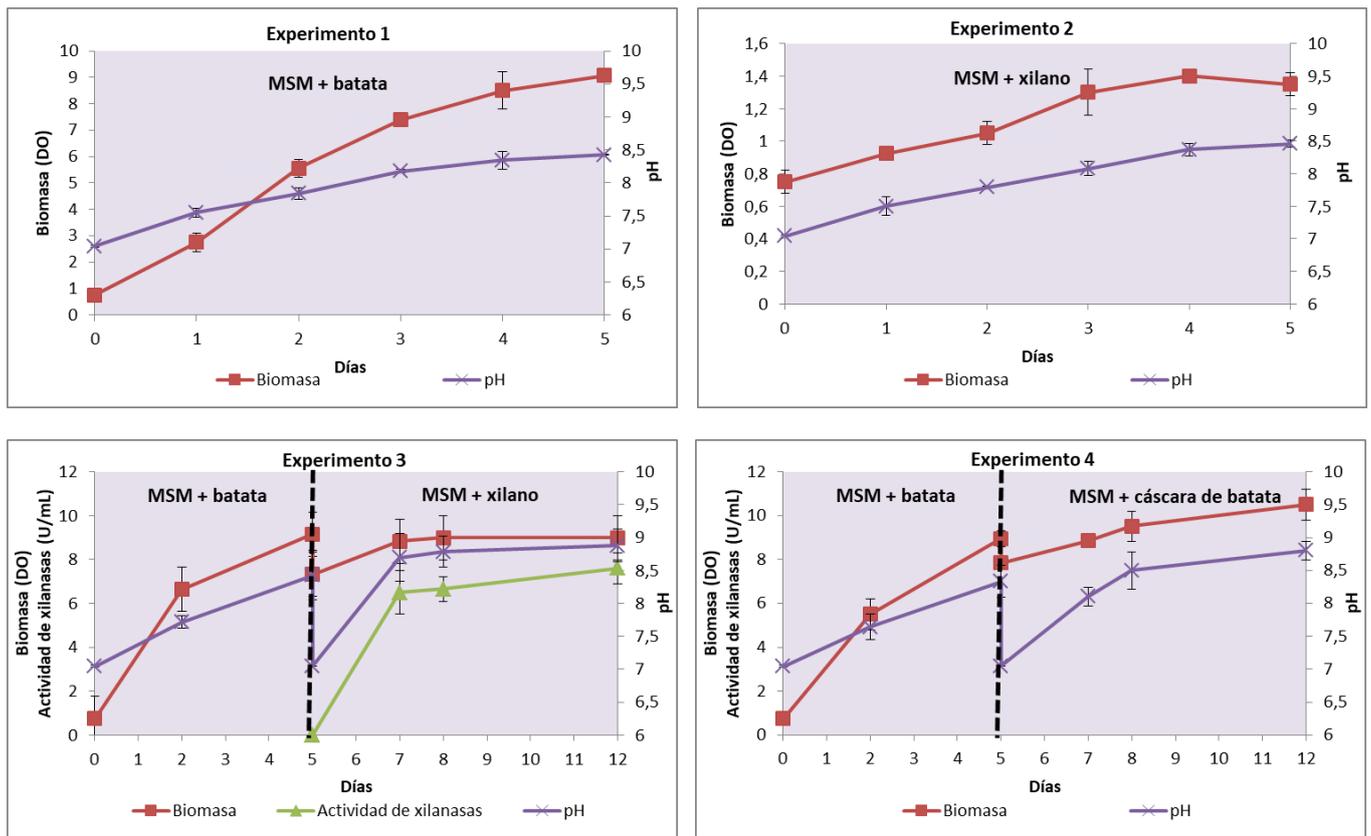


Figura 3. Evaluación de la producción biomasa y de xilanasas de la cepa BX1 en distintas condiciones de cultivos.

Conclusiones

Los resultados mostraron que la bacteria aislada, BX1, presentó la capacidad de producir xilanasas en un bioproceso diseñado en 2 etapas, primero un batch en medio MSM + batata (5 %p/v) para generar biomasa, y luego un batch en medio MSM + xilano (0,5 %p/v) para inducir la producción de xilanasas. La actividad de dicha xilanasas se localizó en el medio extracelular. El bioproceso requiere abordar estrategias de inducción de xilanasas mediante sustratos de bajo costo tales como los residuos agroindustriales, para lograr el reemplazo del xilano puro, con el fin de disminuir costos de materias primas y potenciar la producción de xilanasas. Asimismo, dado el potencial de aplicación de la cepa en estudio BX1, se requerirá avanzar en técnicas de biología molecular para la identificación genética de la bacteria.

Referencias

- Alokika & Singh, B. (2019). "Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(21-22), 8763-8784.
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P.L., & Srivastava, A.K. (2016). "Bacterial xylanases: biology to biotechnology". *3 Biotech*, 6(2):150.
- Conde Molina, D., Liporace, F. & Quevedo C. (2019). "Development of bioremediation strategies based on the improvement of biomass production from isolated strains in hydrocarbon contaminated soils and their application in bioremediation technologies". *Brazilian Journal Development*, 5, 7,10708-10727.

- Conde Molina, D., Novelli Poisson, G.F., Kronberg, F., Galvagno, M.A. (2021). "Valorization of an Andean crop (Yacon) through the production of a yeast cell-bound phytase". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 102116.
- Liguori, R., Amore, A. & Faraco V. (2013). "Waste valorization by biotechnological conversion into added value products". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97, 6129-6147.
- McCleary, B.V. & McGeough, P. A. (2015). "Comparison of polysaccharide substrates and reducing sugar methods for the measurement of endo-1,4- β -Xylanase". *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 177, 1152–1163.
- Mendonça, M., Barroca, M., Collins, T. (2023). "Endo-1,4- β -xylanase-containing glycoside hydrolase families: characteristics, singularities and similarities". *Biotechnology Advances*, 65, 108148.
- Veeresh, J., Jin, C.W. (2012). "Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications". *Biotechnology Advances*, 30, 1219–1227.