

Aprovechamiento de cáscaras de mango para la producción de β -1-4-endoglucanasa por *Aspergillus sp*: efecto de variables físico químicas y biológicas

Víctor Alfonso Rodríguez Tirado
Universidad Politécnica de Sinaloa
vrodriguez@upsin.edu.mx

Idalia Osuna Ruiz
Universidad Politécnica de Sinaloa
iosuna@upsin.edu.mx

Claudia Amezcua Vega
Universidad Politécnica de Sinaloa
camezcua@upsin.edu.mx

Jesús Aarón Salazar Leyva
Universidad Politécnica de Sinaloa
jsalazar@upsin.edu.mx

Leticia Mónica Sánchez Herrera
Universidad Autónoma de Nayarit
leticia_moni@hotmail.com

Resumen

Se estudió el efecto de factores físicos, químicos y biológicos (tamaño de inóculo, tiempo de incubación, solución de sales, tamaño de partícula, humedad, pH y temperatura) en la β -1-4-endoglucanasa por *Aspergillus sp*. utilizando cáscaras de mango tomy atkins y manila como sustrato. Se desarrolló un diseño experimental de Plackett-Burman encontrándose que para la variedad tomy atkins la temperatura, humedad y pH tuvieron un efecto estadísticamente significativo en la cantidad de enzima producida, mientras que para la variedad manila lo fueron el tiempo de incubación, tamaño del inóculo y el tamaño de partícula. Lo anterior propone una alternativa más para el aprovechamiento integral de este fruto.

Palabras clave: mango manila, mango tomy atkins, *Aspergillus sp.*, β -1-4-endoglucanasa, Plackett-Burman

Introducción

El mango (*Mangifera indica L.*) ocupa el segundo lugar en superficie sembrada entre las frutas de México y el cuarto lugar en volumen de producción (Financiera Rural, 2010), siendo el mango manila la variedad más importante con una producción en 2008 de 395,353.75 toneladas, los lugares subsecuentes en orden de importancia son las variedades ataulfo, tommy atkins, kent y haden (COVECA, 2011). El estado de Sinaloa ocupa el tercer lugar en producción de mango a nivel nacional con una superficie sembrada de más de 26,000 hectáreas y una producción mayor a las 210,000 toneladas, lo que representa el 12.9% de la producción en el país. Los principales municipios productores del estado son Rosario, Escuinapa, Ahome y Mazatlán (Montaño López, 2012). Uno de los problemas que presenta la industria del mango es la gran cantidad de desechos de cáscara y hueso que se generan, lo que provoca un alto índice de contaminación ambiental (Santoyo-Juárez & Martínez-Alvarado, 2013). El aprovechamiento de subproductos y de residuos agrícolas en México y en específico en zonas tropicales es un área con gran potencial económico. En algunas regiones de México es necesario generar nuevos productos industriales con un alto valor agregado para incrementar el desarrollo regional (Tapia-Santos, Pérez-Armendariz, Cavazos-Arroyo, & Mayett-Moreno, 2013). Buenrostro-Figueroa, de la Garza-Toledo, Ibarra-Junquera, & Aguilar, (2010), han reportado que *Aspergillus sp.* tiene la capacidad de producir polisacaridasas utilizando cáscaras de mango como fuente de carbono; entre estas enzimas se encuentran las endoglucanasas, que son enzimas (EC 3.2.1.4) que constituyen una gran porción del grupo de enzimas llamadas celulasas, las cuales ocupan el tercer lugar en ventas a nivel mundial y tienen aplicaciones en muchas aplicaciones biotecnológicas (Saqib, et al., 2012) entre las que se incluyen la manufactura de papeles y textiles, en la industria de alimentos, en la formulación de jabones detergentes y más recientemente en el desarrollo de procesos de producción de biocombustibles utilizando materiales renovables celulósicos y lignocelulósicos de plantas (Baker, et al., 2010). El objetivo de la presente investigación consiste en determinar el efecto de parámetros biológicos (tamaño de inóculo, tiempo de incubación), químicos (concentración de sales, pH) y físicos (tamaño de partícula, humedad y temperatura) en la producción de β -1-4-endoglucanasa producidas por *Aspergillus sp.* utilizando cáscara de mango tommy atkins y manila.

Materiales y métodos

Tratamiento de la materia prima

Los mangos de las variedades tommy atkins y manila fueron lavados, pelados y las cascara fueron deshidratadas a 60°C hasta peso constante. Una vez secas se pulverizaron en un molino eléctrico y posteriormente se tamizaron con mayas de 0.250 mm y otra de 0.075 mm para obtener tamaños de partícula uniforme (soporte).

Obtención de esporas de *Aspergillus sp.*

Esporas liofilizadas de *Aspergillus sp.* fueron inoculadas en cajas Petri con agar papa dextrosa, después de quince días de incubación se añadieron 10 ml de una solución Tween 80 al 0.05% realizándose movimientos circulares para que el líquido se dispersara por toda la caja, cuidadosamente el líquido se transfirió a tubos y se centrifugó a 9500 rpm por 10 min, después se descartó el sobrenadante, se añadió agua destilada y se realizó el conteo de esporas en una cámara de Neubauer.

Diseño experimental

Para estudiar el efecto de los factores biológicos, químicos y físicos en la producción de β -1-4-endoglucanasa se realizaron fermentaciones en soporte sólido con un diseño experimental de Plackett-Burman, donde se evaluó a los siete factores antes mencionados con dos niveles (tabla 1) para cada una de las variedades de mango. Se utilizó el software Statgraphics centution XV[®] versión 15.5.05 para el diseño de las corridas experimentales (tablas 2 y 3) y para el análisis de los resultados.

Tabla 1. Factores físicos, químicos y biológicos evaluados para la producción de β -1-4-endoglucanasa por *Aspergillus sp.* en cáscaras de mango tommy atkins y manila.

Factores	Nivel	
	-1	+1
Tamaño de inóculo (esporas/ml)	1x10 ⁴	1x10 ⁸
Tiempo de incubación (días)	3	6
Solución de sales*	1x	2x
Tamaño de partícula (mm)	0.0075	0.01

Humedad (%)	70	90
Temperatura (°C)	15	35
pH	5.5	9

* Solución de sales 1x [g/L]: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [4.38]; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [0.44]; $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [0.044]; $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [0.009]; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [0.004] y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [0.06]

La variable respuesta fue la actividad enzimática de la β -1-4-endoglucanasa ($\text{UA/g}_{\text{partículas de mango}}$) utilizando hidroximetilcelulosa como sustrato.

Las fermentaciones se realizaron por triplicado y se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml, tapados con torundas de gasa con algodón, a los cuales se les vertieron 3 g de soporte (partículas de cáscara de mango) por cada 7 ml de medio (solución de sales y esporas) y en otros se vertieron 1 g de soporte por cada 9 ml de medio, obteniendo así una humedad del 70% y otra del 90%. Se ajustó el pH utilizando ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio según el valor deseado. Los matraces fueron colocados en incubadoras al valor requerido de temperatura. Al final del tiempo de fermentación a cada matraz se le añadieron 20 ml de agua destilada y se agitaron para lograr una solución homogénea, posteriormente se vertieron 10 ml en tubos de centrifuga y se centrifugaron a 9500 rpm por 10 min. Al sobrenadante (extracto enzimático) se le determinó la actividad enzimática, las cuantificaciones fueron realizadas por triplicado.

Actividad enzimática

Para la determinación de la actividad de la β -1-4-endoglucanasa se tomaron 50 μl de extracto enzimático y se añadieron a 250 μl de solución de sustrato (carboximetilcelulosa al 2% en buffer citratos) permitiéndose la reacción por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se añadieron 500 μl de ácido tricloroacético al 10% interrumpiéndose así la reacción (Ghose, 1987). La cuantificación de glucosa libre fue realizada utilizando un analizador bioquímico YSI 2700D. Una unidad enzimática se considera como la actividad de enzima capaz de liberar 1 μmol de glucosa por minuto en condiciones de ensayo.

Resultados y discusión

Variedad tommy atkins

De acuerdo al diseño experimental de Plackett-Burman utilizado, se realizaron 12 experimentos para evaluar el efecto de los factores en la producción de β -1-4-endoglucanasa por *Aspergillus sp.* utilizando como soporte y sustrato, cáscara de mango tommy atkins, en la tabla 2 se muestran las actividades enzimáticas encontradas.

Tabla 2. Diseño experimental y actividad enzimática de β -1-4-endoglucanasa producidas por *Aspergillus sp.* utilizando cáscara de mango tommy atkins como sustrato.

Experimento	Temperatura (°C)	pH	Tamaño de partícula (mm)	Tamaño del inóculo (esp/ml)	Solución de sales	Tiempo (días)	Humedad (%)	UA/g
1	15	9	0.250	1×10^8	1x	6	90	0.0342
2	15	9	0.250	1×10^4	2x	3	70	0.0451
3	15	9	0.075	1×10^4	1x	6	90	0.0428
4	35	9	0.250	1×10^4	2x	6	70	0.0322
5	35	5.5	0.250	1×10^4	1x	3	90	0.0227
6	35	9	0.075	1×10^8	2x	3	90	0.0129
7	15	5.5	0.075	1×10^4	1x	3	70	0.0555
8	35	5.5	0.075	1×10^4	2x	6	90	0.0059
9	15	5.5	0.075	1×10^8	2x	6	70	0.0594
10	35	5.5	0.250	1×10^8	1x	6	70	0.0315
11	15	5.5	0.250	1×10^8	2x	3	90	0.0409
12	35	9	0.075	1×10^8	1x	3	70	0.0123

El análisis de varianza mostró que la temperatura, humedad y pH tuvieron un $P < 0.05$, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. El valor de R^2 fue de 0.88 y el de R^2 ajustada de 0.7. Los factores que tienen un efecto positivo en la producción de la enzima son el tamaño

de partícula y el tiempo de incubación mientras que los factores que tienen un efecto negativo son la temperatura, humedad, pH, tamaño de inóculo y concentración de sales. La actividad enzimática máxima fue de 0.0594 UA/g, la cual se obtuvo a 15°C, pH de 5.6, tamaño de partícula de 0.1 mm, 1×10^4 esporas/ml, 1.42x de concentración de sales, 5.7 días de incubación y 70% de humedad.

Variedad manila

Con respecto al uso de cáscara de mango manila para la producción de β -1-4-endoglucanasa por *Aspergillus sp.* se realizaron de igual manera 12 corridas experimentales cuyos resultados de actividad enzimática se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Diseño experimental y actividad enzimática de β -1-4-endoglucanasa producidas por *Aspergillus sp.* utilizando cáscara de mango manila como sustrato.

Experimento	Temperatura (°C)	pH	Tamaño de partícula (mm)	Tamaño del inóculo (esp/ml)	Solución de sales	Tiempo (días)	Humedad (%)	UA/g
1	15	9	0.250	1×10^8	1x	6	90	9.081
2	15	9	0.250	1×10^4	2x	3	70	0.125
3	15	9	0.075	1×10^4	1x	6	90	0.265
4	35	9	0.250	1×10^4	2x	6	70	4.247
5	35	5.5	0.250	1×10^4	1x	3	90	0.176
6	35	9	0.075	1×10^8	2x	3	90	0.198
7	15	5.5	0.075	1×10^4	1x	3	70	0.098
8	35	5.5	0.075	1×10^4	2x	6	90	0.194
9	15	5.5	0.075	1×10^8	2x	6	70	4.360
10	35	5.5	0.250	1×10^8	1x	6	70	10.421
11	15	5.5	0.250	1×10^8	2x	3	90	0.045

12	35	9	0.075	1×10^8	1x	3	70	0.361
----	----	---	-------	-----------------	----	---	----	-------

De acuerdo al análisis estadístico para el uso de cáscara de mango manila, se obtuvo que el tiempo de incubación, tamaño del inóculo y el tamaño de partícula tuvieron un $P < 0.05$, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. El valor de R^2 fue de 0.91 y el de R^2 adj de 0.75. Los factores que tienen un efecto positivo en la producción de la enzima son el tiempo de incubación, el tamaño del inóculo, tamaño de partícula y la temperatura; por otra parte los factores que tienen un efecto negativo son la concentración de sales, la humedad y el pH. La actividad enzimática máxima fue de 10.42 UA/g.

Los parámetros que tienen un efecto estadísticamente significativo en la producción de β -1-4-endoglucanasa utilizando cáscara de mango tommy atkins son la temperatura, humedad y pH, siendo los primeros dos factores físicos y el último un factor químico; mientras que para la cáscara de mango manila fueron el tiempo de incubación, tamaño del inóculo y el tamaño de partícula, siendo los primeros dos factores biológicos y el tercero un factor físico. El tamaño de partícula se relaciona directamente con el área o matriz sólida disponible para el crecimiento del hongo. El hongo mostró un buen crecimiento y producción de enzimas por lo que la utilización de cáscaras de ambas variedades puede ser una alternativa para el aprovechamiento de estos desechos.

Conclusiones

Se obtuvieron los factores que afectan la producción de β -1-4-endoglucanasa producidas por *Aspergillus sp.* creciendo en cáscara de mango variedades tommy atkins y manila. El conocimiento de los factores que afectan la producción de esta enzima permitirá realizar estudios de optimización y así contar con una alternativa de uso de los desechos industriales del mango.

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica de Sinaloa por el financiamiento de este estudio. Al Dr. Héctor Manuel Cárdenas Cota y al Centro de Ciencias de Sinaloa por haber proporcionado la cepa de *Aspergillus sp.*

Bibliografía

- Baker, P. W., Kennedy, J., Morrissey, J., O'Gara, F., Dobson, A. D., & Marchesi, J. R. (2010). Endoglucanase activities and growth of marine-derived fungi isolated from the Sponge *Haliclona simulans*. *Journal of Applied Microbiology*, *108*, 1668-1675. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04563.x
- Buenrostro-Figueroa, J. J., de la Garza-Toledo, H., Ibarra-Junquera, V., & Aguilar, C. N. (2010). Aprovechamiento de las cáscaras de mango como soporte para la producción de polisacaridasas. *Acta Química Mexicana*, *2*(3), 1-5. Obtenido de <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM3/Aprovechamiento.pdf>
- COVECA. (2011). *Monografía del mango*. Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria. Xalapa: Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, Gobierno del Estado de Veracruz. Obtenido de <http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/PAGE/COVECAINICIO/IMAGENES/ARCHIVOSPDF/ARCHIVOS DIFUSION/TAB4003236/MONOGRAFIA%20MANGO2011.PDF>
- Financiera Rural. (2010). *Monografía del mango*. Financiera Rural, México, D.F. Obtenido de [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADa%20mango%20\(oct%2010\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADa%20mango%20(oct%2010).pdf)
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, *59*(2), 257-268.
- Montaño López, G. (2012). La producción y el valor de mango en México. *Agroentorno*, 38-40.
- Santoyo-Juárez, J. A., & Martínez-Alvarado, C. O. (2013). *Nuevas variedades de mango con potencial para el sur de Sinaloa*. Fundación Produce Sinaloa A.C. Culiacán. Obtenido de <http://www.fps.org.mx/divulgacion/attachments/article/815/Nuevas%20variedades%20de%20mango%20con%20potencial%20para%20el%20sur%20de%20Sinaloa.pdf>
- Saqib, A., Farooq, A., Iqbal, M., Ul Hassan, J., Hayat, U., & Baig, S. (2012). A thermostable crude endoglucanase produced by *Aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. *Enzyme Research*, 1-6. doi:10.1155/2012/196853
- Tapia-Santos, M., Pérez-Armendariz, B., Cavazos-Arroyo, J., & Mayett-Moreno, Y. (2013). Obtención de aceite de semilla de mango manila (*Mangifera indica* L.) como una alternativa para aprovechar

subproductos agroindustriales en regiones tropicales. (S. M. A.C., Ed.) *Revista Mexicana de Agronegocios*, XVII(32), 258-266. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/141/14125584009.pdf>