

Original

Efecto del xilano y la cascarilla de arroz sobre la actividad feruloil esterasa en *Penicillium Rubens*

Débora E. Hernández-Pérez¹  B.Sc; Carlos Gil-Durán²  Ph.D;
Renato Chávez-Rosales²  Ph.D; Ramón O. García-Rico^{1*}  Ph.D.

¹Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología. Grupo GIMBIO. Ciudadela Universitaria Km 1 Vía Bucaramanga, Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia.

²Universidad de Santiago de Chile. Departamento de Biología, Facultad de Química y Biología. Avenida Libertador General Bernardo O'Higgins 3363, Universidad de Santiago de Chile. Santiago, Chile.

*Correspondencia: rovigar@hotmail.com

Recibido: Marzo 2020; Aceptado: Agosto 2020; Publicado: Noviembre 2020.

RESUMEN

Objetivo. Analizar el efecto del xilano y la cascarilla de arroz como únicas fuentes de carbono, sobre la actividad feruloil esterasa y la expresión de los genes *faeA* y *faeB* de *Penicillium rubens* (Wisconsin 54-1255), en fermentación sumergida. **Materiales y métodos.** Las fermentaciones se realizaron durante 24, 48 y 72 h (28°C/250 rpm), en matraces con medio Sakamoto modificado. La actividad FAE se determinó usando el sustrato sintético Etil 4-hidroxi-3-metoxicinamato. La transcripción de *faeA* y *faeB* fue determinada por RT-PCR. Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en gel y se analizaron por densitometría. **Resultados.** El análisis de la expresión génica evidenció que el uso del xilano tuvo un efecto positivo en la expresión de ambos genes. La mayor actividad transcripcional, tanto de *faeA* como de *faeB*, se observó a las 48 h. Por su parte, la cascarilla de arroz produjo resultados negativos. Los datos obtenidos al determinar la actividad feruloil esterasa, respaldaron los resultados observados en el análisis de expresión génica. **Conclusión.** A diferencia del xilano, la cascarilla de arroz no demostró un efecto inductor sobre la actividad feruloil esterasa en *P. rubens*.

Palabras clave: Represión catabólica; actividad enzimática; expresión génica; fermentación; *Penicillium*; activación transcripcional (*Fuentes: MeSH, NLM, CAB*).

ABSTRACT

Objective. Analyzed the effect of xylan and rice husk as sole sources of carbon on the FAE activity and expression of *faeA* and *faeB* genes of *Penicillium rubens* (Wisconsin 54-1255), in submerged fermentation. **Materials and methods.** The fermentations were carried out for 24, 48, and 72 h (28°C/250 rpm), in flasks with a modified Sakamoto medium. FAE activity was determined using the synthetic substrate Ethyl 4-hydroxy-3-methoxycinnamate. The transcription of *faeA* and *faeB* was analyzed by RT-PCR. The PCR products were resolved by electrophoresis and analyzed by densitometry. **Results.** The analysis of gene expression showed that the use of xylan had a positive

Como citar (Vancouver).

Hernández-Pérez DE, Gil-Durán C, Chávez-Rosales R, García-Rico RO. Efecto del xilano y la cascarilla de arroz sobre la actividad feruloil esterasa en *Penicillium Rubens*. Rev MVZ Córdoba. 2021; 26(1):e1959. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1959>



©El (los) autor (es), Revista MVZ Córdoba 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

effect on the expression of both genes. The highest transcriptional activity of both *faeA* and *faeB* was detected at 48 h. On the other hand, rice husk showed negative results. The data obtained when the FAE activity was determined, supported the results observed in the gene expression analysis.

Conclusion. Different from xylan the rice husk did not demonstrate an inducer effect on the feruloil esterase activity in *P. rubens*.

Keywords: Catabolite repression; enzyme activity; gene expression; fermentation; *Penicillium*; transcriptional activation (*Sources: MeSH, NLM, CAB*).

INTRODUCCIÓN

Las feruloil esterases (EC. 3.1.1.73) pertenecen a las hidrolasas de éster carboxílico y son las enzimas clave en la escisión de los enlaces éster entre el ácido hidroxicinámico y la galactosa o arabinosilanos, en la hemicelulosa. Este grupo de esterases también es conocido por sus siglas: FAE (ferulic acid esterases). La hidrólisis de los enlaces éster en las paredes celulares de las plantas usando enzimas FAE permite que los polisacáridos y diferentes compuestos fenólicos como los ácidos hidroxicinámicos se liberen fácilmente (1). Los ácidos hidroxicinámicos son productos químicos de alto valor debido a sus diversas propiedades biológicas, de los cuales el ácido ferúlico es el más abundante y ampliamente distribuido (2). Muchos estudios han informado sobre las aplicaciones del ácido ferúlico en la industria alimentaria, biomédica y farmacéutica debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, anticancerígenas y antiinflamatorias (2,3). En consecuencia, el uso de enzimas FAE es muy importante en diferentes procesos biotecnológicos como: la hidrólisis enzimática para la producción de bioetanol, la deslignificación biológica de plantas para la producción de papel, la esterificación del ácido hidroxicinámico, así como la digestibilidad y el aumento de la recuperación de residuos vegetales derivados de la agroindustria (1,3).

La producción de feruloil esterases a partir de microorganismos y su aplicación biotecnológica han sido objeto de investigación en los últimos años. Actualmente, los hongos filamentosos son el grupo de microorganismos más empleado en la búsqueda y producción de estas enzimas. Sin embargo, la cantidad de secuencias fúngicas depositadas en las bases de datos aún es baja (4). En algunos casos, se ha informado la actividad enzimática e incluso se han purificado las enzimas sin llegar a conocer las secuencias de los genes que las codifican. Esta es la situación de *Penicillium rubens* (anteriormente clasificado como *P. chrysogenum*), uno de los hongos más

valiosos para la industria de la biotecnología (5). Afortunadamente, el carácter público de los genomas fúngicos ha facilitado la búsqueda de secuencias codificantes de enzimas FAE mediante minería genómica. Después de una búsqueda, basada en similitud, en el genoma de *P. rubens* (Wisconsin 54-1255), se encontraron dos secuencias codificantes de feruloil esterases que fueron denominadas *faeA* y *faeB*. Se encontró que *faeA* contiene un marco de lectura abierto (ORF-Pc20g07010) de 933 pb, con un solo intrón (89 pb), que codifica una proteína de 280 aminoácidos llamada PrFaeA (CAP86030). Por otro lado, *faeB* incluye un marco de lectura abierto (ORF-Pc12g08300) de 1643 pb, con un intrón de 58 pb, que codifica para una proteína de 527 aminoácidos denominada PrFaeB (CAP80457). Ambas proteínas fúngicas fueron verificadas bioinformáticamente, determinando que pertenecen a las enzimas FAE tipo A y B, respectivamente.

Teniendo en cuenta que la cascarilla es uno de los subproductos generados en gran cantidad durante la producción de arroz y que es rica en hemicelulosas y compuestos fenólicos (6), se ha considerado evaluar su uso como sustrato en la producción de enzimas FAE por *P. rubens* (Wisconsin 54-1255) en condiciones de fermentación sumergida. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo analizar el efecto de la cascarilla de arroz sobre la actividad enzimática feruloil esterase y sobre la transcripción de los genes codificadores para las feruloil esterases PrFaeA y PrFaeB, en comparación con el uso de xilano como única fuente de carbono.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fermentación. Se tuvo en cuenta el medio de cultivo descrito por Sakamoto et al (10), con modificaciones (NH₄NO₃: 2 gl – 1; K₂HPO₄: 1 gl – 1; MgSO₄ · 7 H₂O: 0.5 gl – 1; KCl: 0.5 gl – 1; FeSO₄: 0.01 gl – 1; peptona de soja: 1 gl – 1; cascarilla de arroz: 20 gl – 1; agua

destilada). La cascarilla de arroz se sometió a un pretratamiento de molienda y cribado para posteriormente ser sometida a solubilización en autoclave mediante tratamiento térmico con vapor. El medio de cultivo así preparado se llamó RHS (rice-husk-sakamoto). Para preparar el segundo medio de cultivo, la cascarilla de arroz fue reemplazada por xilano (2%). Este medio se denominó XS (xilano-sakamoto). Para la determinación de la actividad enzimática, las fermentaciones se llevaron a cabo durante 24, 48 y 72 h, a 28°C y 250 rpm, en matraces de 250 ml con 50 ml de medio. Para obtener los extractos enzimáticos, el contenido de cada matraz se procesó como lo describe Sakamoto et al (7). La cantidad de proteína presente en cada extracto se midió utilizando el método Bradford. La actividad feruloil esterasa se determinó usando el sustrato sintético 4-hidroxi-3-metoxicinamato de etilo (Sigma-Aldrich) siguiendo el procedimiento propuesto por Sakamoto, et al (7). Para estos experimentos, U se define como la cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μ mol de AF en un tiempo de 1 minuto.

Análisis de la expresión génica. Se realizaron fermentaciones durante 72 h, a 28°C y 250 rpm, en matraces de 500 ml con 100 ml de medio. Las muestras de micelio fueron tomadas, de cada medio de cultivo, a las 24 h, 48 h y 72 h. Las extracciones de ADN y ARN se realizaron según lo indicado por Gil-Durán et al (8). La transcripción de *faeA*, *faeB* y *actA* se analizó por RT-PCR. La síntesis de ADNc se realizó según lo descrito por García-Rico et al (9). La amplificación por PCR se realizó siguiendo estas condiciones: 5 min a 94°C; 30 s a 94°C; 30 s a 58°C; 30 s a 72°C (35 ciclos) y 10 min a 72°C. Los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en los análisis de RT-PCR.

Gen diana	Nombre cebadores	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
<i>faeA</i>	FaeA-Fw	CTCGCTCCATTTGACACCTT	100
	FaeA-Rv	ACAAGTGACTCGACCTGATCT	
<i>faeB</i>	FaeB-Fw	ACCGCCAACCTGAGGTAATC	101
	FaeB-Rv	CTTGTCGAAGCCCTCCTCAT	
<i>actA</i>	ActA-Fw	TCCCCATCTACGAGGGTTTCT	100
	ActA-Rv	CGCTCACGCAGGATCTTCAT	

Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel. Teniendo en cuenta el tamaño de los amplicones, se utilizó como

marcador de peso molecular el DNA Ladder GeneRuler de 50 pb (ThermoFisher). Para el control positivo, se usó ADN genómico de *P. rubens* como molde, mientras que para el control negativo no se utilizó molde. El análisis de densitometría se realizó utilizando el software "MYImageAnalysis" (ThermoFischer) según lo descrito por Torrent et al (10). El gen normalizador fue *actA*.

RESULTADOS

El análisis de la actividad enzimática (actividad FAE) de los medios de cultivo RHS y XS, produjo resultados que contrastan entre sí. Por un lado, se observó que la actividad FAE en el medio RHS fue nula, mientras que en el medio XS se detectó actividad enzimática en todos los tiempos ensayados. El uso de xilano como única fuente de carbono indujo una actividad FAE cuyo punto de máxima actividad se observó a las 48 h, momento en el cual se duplicó la actividad detectada a las 24 h (Figura 1). La actividad enzimática a las 72 h osciló alrededor del 90% de los valores observados a las 48 h.

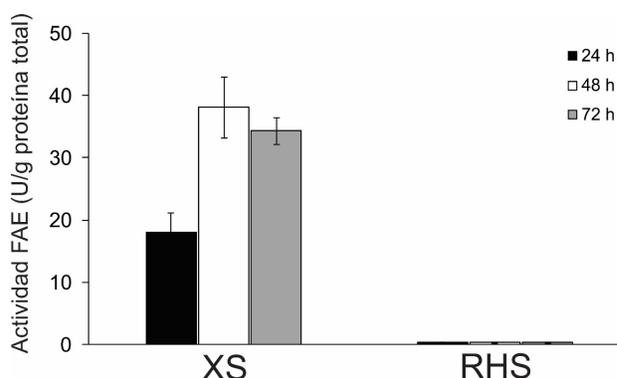


Figura 1. Actividad FAE de los extractos enzimáticos de *P. rubens*.

Se muestran los datos obtenidos a las 24 h, 48 h y 72 h de fermentación sumergida en los medios XS y RHS. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas de dos experimentos independientes ($p < 0.05$). (U) Unidad: cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μ mol de AF en un tiempo de 1 minuto.

De manera similar, el análisis de expresión génica indicó que, a diferencia de la cascarilla de arroz, el uso de xilano produjo un efecto inductor sobre la expresión génica de *faeA* y *faeB*. Cuando los productos de RT-PCR se resolvieron por electroforesis, el amplicón del tamaño esperado (100 pb) solamente se observó

en la fermentación con medio XS (Figura 2). En el medio XS, la actividad transcripcional de *faeA* se detectó desde las 24 h hasta las 72 h de la fermentación, mientras que para *faeB* la expresión se observó claramente solo después de las 48 h de cultivo (Figura 2B).

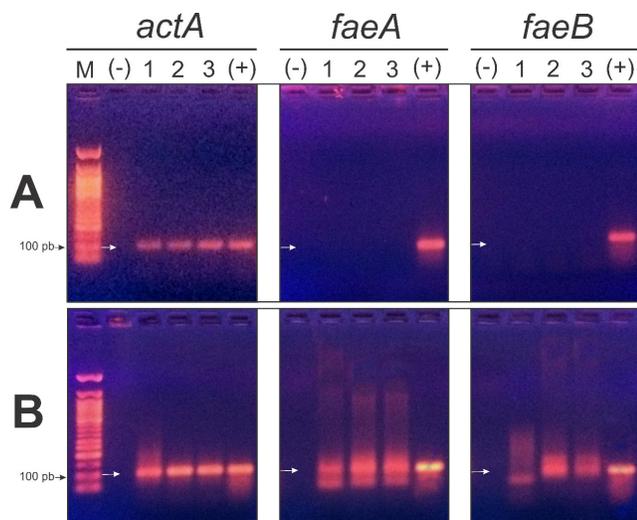


Figura 2. Perfil de expresión de *faeA* y *faeB* con xilano y cascarilla de arroz como únicas fuentes de carbono.

Se muestran los productos de RT-PCR resueltos en gel de agarosa (2%). **A:** medio Sakamoto modificado con cascarilla de arroz (RHS). **B:** Medio con xilano (XS). Para cada gen se indica, de izquierda a derecha: control negativo (-), 24 h (1), 48 h (2), 72 h (3) y control positivo (+). M: marcador de peso molecular (DNA Ladder GeneRuler de 50 pb). La flecha señala la amplificación de un fragmento de 100 pb. Control positivo: el molde fue ADN genómico. Control negativo: no se utilizó molde.

El análisis por densitometría mostró que *faeA* alcanzó su nivel máximo de expresión a las 48 h (Figura 3). A las 72 h, el nivel relativo de actividad transcripcional en el micelio permaneció alrededor del 70% en comparación con los niveles de transcripción de *actA*, utilizado como gen normalizador debido a su carácter constitutivo. A diferencia de *faeA*, la expresión de *faeB* no se detectó a las 24 h. Sin embargo, la mayor actividad transcripcional se observó a las 48 h. Después de 72 h, la expresión relativa de *faeB* disminuyó a menos de la mitad de lo que se observó a las 48 h (Figura 3). Para ambos genes, los niveles más altos de expresión se detectaron a las 48 h de fermentación, lo cual es consistente con lo observado en los análisis de actividad enzimática. Por su parte, la cascarilla de arroz produjo resultados opuestos (Figuras 1 y 2). No se detectó actividad transcripcional,

en los tiempos ensayados, para ninguno de los dos genes. Por lo tanto, el medio Sakamoto modificado con cascarilla de arroz no funcionó como inductor de la actividad feruloil esterasa en *P. rubens*.

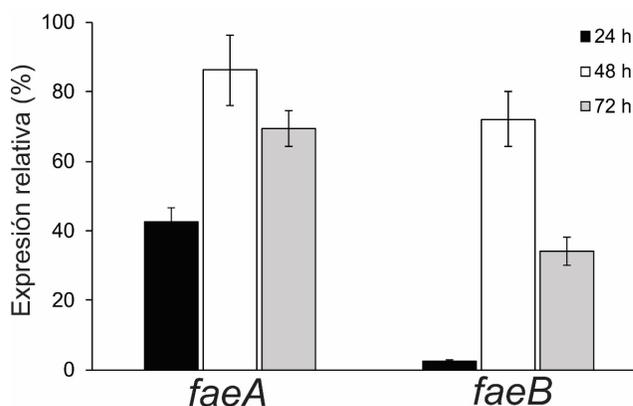


Figura 3. Efecto del xilano como única fuente de carbono sobre la transcripción de *faeA* y *faeB* en *P. rubens*.

En la figura 3, se muestran los datos obtenidos a las 24 h, 48 h y 72 h de fermentación sumergida en medio XS. Los niveles de transcripción de *faeA* y *faeB* se cuantificaron por densitometría. El gen normalizador fue *actA*. Las relaciones *faeA/actA* y *faeB/actA* se expresaron como porcentaje (10).

DISCUSIÓN

En los hongos filamentosos, los genes que codifican para feruloil esterasas están regulados mediante represión por catabolito. Normalmente, este control negativo está mediado por *CreA* que reprime a *XlnR*, un activador transcripcional de genes xilanolíticos (11). Nuestros resultados mostraron que el xilano tuvo un mayor efecto inductor en *faeA* que en *faeB*, durante toda la fermentación. Esta diferencia fue especialmente importante a las 24 h (Figura 2). En *Aspergillus niger*, azúcares como la xilosa y la arabinosa indujeron diferencialmente la expresión de *faeA* en detrimento de *faeB*, después de unas pocas horas de crecimiento (12). Lo anterior concuerda con lo observado en *P. rubens*, especialmente si consideramos que el producto principal de la hidrólisis de xilano es la xilosa. Adicionalmente, la concentración de xilosa tiene un impacto en la expresión génica. A bajas concentraciones, la xilosa funciona como inductor y a altas concentraciones como represor, en un mecanismo mediado por *CreA* (13).

Este comportamiento explicaría la disminución que se observó en la transcripción de *faeA* después de las 48 h, ya que podría obedecer al aumento de xilosa, producto de la actividad hidrolítica. Por otra parte, en *A. niger* el gen *faeB* es inducido por la presencia de compuestos aromáticos como el ácido ferúlico (4). Por lo tanto, en presencia de polisacáridos complejos, la expresión del gen *faeA* condujo a la liberación de estos compuestos aromáticos específicos, propiciando posteriormente la expresión de *faeB*. Adicionalmente, en este trabajo reportamos el efecto nulo que ejerce la cascarilla de arroz sobre la transcripción de los genes que codifican para enzimas FAE. En sustratos naturales, las hemicelulosas son químicamente muy variables. En particular, los arabinoxilanos de las cáscaras de cereales se describen como los más lignificados, con la mayor diversidad de cadenas laterales y, a veces, insolubles en agua (14). Esto permite suponer que algunos componentes como el xilano y el ácido ferúlico pueden ser inaccesibles para operar como inductores en la expresión génica. Finalmente, se debe

considerar la posible generación de compuestos inhibidores durante el pretratamiento de la cascarilla de arroz. En el tratamiento previo con vapor, la degradación parcial de la hemicelulosa puede conducir a la generación de compuestos tóxicos como los derivados del furano (furfural y 5-hidroximetilfurfural) que afectan la actividad enzimática (15).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

Agradecimientos

Grupo de investigación GIMBIO (Universidad de Pamplona) y Laboratorio de Microbiología Básica y Aplicada (Universidad de Santiago de Chile). Hernández, E. agradece a COLCIENCIAS (Convocatoria 753), Chávez, R. a DICYT-USACH y Gil-Durán, C. a CONICYT-PFCHA / Doctorado Nacional / 2014-63140056.

REFERENCIAS

1. Golapan N, Rodríguez D, Saucedo G, Nampoothiri KM. Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresour Technol.* 2015; 193:534-44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.117>
2. Taofiq O, González AM, Barreiro MF, Ferreira IC. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules.* 2017; 22(2):281. <https://doi.org/10.3390/molecules22020281>
3. De Oliveira DM, Mota T, Oliva B, Segato F, Marchiosi, Ferrarese O, et al. Feruloyl esterases: Biocatalysts to overcome biomass recalcitrance and for the production of bioactive compounds. *Bioresour Technol.* 2019; 278:408-423. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.064>
4. Dilokpimol A, Mäkelä M, Mansouri S, Belova O, Waterstraat M, Bunzel M, et al. Expanding the feruloyl esterase gene family of *Aspergillus niger* by characterization of a feruloyl esterase, FaeC. *N Biotechnol.* 2017; 37 (Part B):200-209. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.02.007>
5. Guzmán-Chávez F, Zwahlen RD, Bovenberg RAL, Driessen AJM. Engineering of the Filamentous Fungus *Penicillium chrysogenum* as Cell Factory for Natural Products. *Front Microbiol.* 2018; 9:2768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02768>
6. Goufo P, Ferreirab L, Trindadea H, Rosa E. Distribution of antioxidant compounds in the grain of the Mediterranean rice variety 'Ariete'. *CyTA - Journal of Food.* 2015. 13:140-150. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.923941>

7. Sakamoto T, Nishimura S, Kato T, Sunagawa Y, Tsuchiyama M, Kawasaki H. Efficient Extraction of Ferulic Acid from Sugar Beet Pulp Using the Culture Supernatant of *Penicillium chrysogenum*. *J Appl Glycosci*. 2005; 52:115-120. <https://doi.org/10.5458/jag.52.115>
8. Gil-Durán C, Rojas J, Medina E, Vaca I, García-Rico R, Villagrán S, et al. The *pcz1* Gene, which Encodes a Zn(II)₂Cys₆ Protein, Is Involved in the Control of Growth, Conidiation, and Conidial Germination in the Filamentous Fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS One*. 2015; 10(3):e0120740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120740>
9. García-Rico RO, Gil-Durán C, Rojas JF, Vaca I, Figueroa L, Levicán G, et al. Heterotrimeric G protein alpha subunit controls growth, stress response, extracellular protease activity, and cyclopiazonic acid production in *Penicillium camemberti*. *Fungal Biol*. 2017; 121(9):754-762. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.05.007>
10. Torrent C, Gil-Durán C, Rojas JF, Medina E, Vaca I, Castro P, et al. Role of *sfk1* Gene in the Filamentous Fungus *Penicillium roqueforti*. *Front Microbiol*. 2017; 8:2424. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02424>
11. Tamayo E, Villanueva A, Hasper AA, de Graaff LH, Ramón D, Orejas M. CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*. 2008; 45:984-93. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.03.002>
12. De Vries R, Vankuyk P, Kester H, Visser J. The *Aspergillus niger faeB* gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *Biochem. J*. 2002; 363: 377-386. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3630377>
13. De Vries R, Visser J, Graaff L. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res. Microbiol*. 1999; 150(4):281-285. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(99\)80053-9](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(99)80053-9)
14. Bastos R, Coelho E, Coimbra M. Arabinoxylans from cereal by-products: Insights into structural features, recovery, and applications. Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products. 1nd ed. (United Kingdom): Elsevier Ltd; 2018.
15. Alvira, E. Pejó T, M. Ballesteros, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010; 101: 4851-4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>