



***Neurospora sitophila* grown in media supplemented with dibutyl phthalate in submerged fermentation: Kinetics of growth and esterase activity**

***Neurospora sitophila* crecido en medios adicionados con dibutil ftalato en fermentación sumergida: Cinética de crecimiento y actividad de esterasa**

Dania Fernanda Sánchez-Sánchez², Carmen Sánchez^{1*}

¹Laboratory of Biotechnology, Research Centre for Biological Sciences, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlaxcala C.P. 90062, Mexico.

²Maestría en Biotecnología y Manejo de Recursos Naturales, Research Centre for Biological Sciences, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlaxcala C.P. 90062, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: carmen.sanchezh@uatx.mx (C. Sánchez)

Article history:

Received: 27 November 2018 / Received in revised form: 17 January 2019 /

Accepted: 19 January 2019 / Published online: 20 January 2019.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.1.61>

ABSTRACT

Phthalate esters are compounds used primarily as plasticizers and additives to provide flexibility and malleability to plastic products. Dibutyl phthalate (DBP) is one of the most used as an additive in adhesives, inks for printers and cosmetic products. In this work, we evaluate the specific growth rate (μ), maximum biomass (X_{max}), pH, glucose consumption and specific activity of esterases of *Neurospora sitophila* in media added with different concentrations of DBP (1500 and 2000 mg/L) in liquid fermentation. *N. sitophila* showed a higher specific growth rate in the medium added with 1500 mg of DBP/L than in the medium added with 2000 mg of DBP/L. The highest biomass production was observed in medium added with 2000 mg of DBP/L. The highest specific activity of esterases was showed in medium containing 1500 mg of DBP/L. This research suggests that *N. sitophila* is able to use high concentrations of DBP as a source of carbon and energy.

Keywords: Dibutyl phthalate, esterase, *Neurospora sitophila*, submerged fermentation.

RESUMEN

Los ésteres de ftalato son compuestos usados principalmente como plastificantes y aditivos para proveer de flexibilidad y maleabilidad a los productos plásticos. Dentro de los ftalatos más empleados se encuentra el dibutil ftalato (DBF), el cual se utiliza como un aditivo en adhesivos, tintas para impresoras y en productos cosméticos. En este trabajo se evaluaron la velocidad específica de crecimiento (μ), biomasa máxima (X_{max}), pH, consumo de glucosa y actividad específica de esterasas de *Neurospora sitophila* en medios adicionados con diferentes concentraciones de DBF (1500 y 2000 mg/L) en fermentación sumergida. *N. sitophila* presentó una mayor velocidad específica de crecimiento en el medio adicionado con 1500 mg de DBF/L que en el medio adicionado con 2000 mg de DBF/L. El medio adicionado con 2000 mg de DBF/L presentó la mayor producción de biomasa. La mayor actividad específica de esterasas fue observada en el medio conteniendo 1500 mg de DBF/L. Esta investigación sugiere que *N. sitophila* es capaz de emplear altas concentraciones de DBF como fuente de carbono y energía.

Palabras clave: Dibutil ftalato, esterasas, fermentación sumergida, *Neurospora sitophila*.

1. INTRODUCCIÓN

Los ftalatos son ésteres o diésteres del ácido ftálico (ácido 1,2-bencenodicarboxílico), estos son ampliamente utilizados como plastificantes. Su estructura química básica es el ácido benceno dicarboxílico con dos cadenas laterales, que pueden ser grupos alquilo, bencilo, fenilo, cicloalquilo o alcoxi. Los ftalatos son líquidos claros de aspecto aceitoso, poco solubles en agua y con baja volatilidad. Estos compuestos tienen varias aplicaciones, dependiendo de la forma química particular, aunque su mayor uso es como aditivos plastificantes. El uso indiscriminado de estos productos ha ocasionado que los ftalatos sean considerados un contaminante abundante. Los ftalatos no forman parte de la cadena molecular que constituye el plástico, causando que este sea liberado de la matriz plástica, y se introduzca al medio ambiente, ocasionando contaminación ambiental (Meng *et al.*, 2015). Se han encontrado ftalatos en los sedimentos, agua y aire, mismos que pueden ser levemente irritantes cuando se aplican a la piel o los ojos de los animales (Liang *et al.*, 2008). Los ftalatos más utilizados son el di (2- etilhexil) ftalato (DEHF), seguido del ftalato de dibutilo (DBF). El DBF es un ftalato de cadena corta que se puede biodegradar y mineralizar fácilmente. Numerosos estudios han demostrado que los microorganismos desempeñan los papeles principales en la degradación de ftalatos. Las enzimas de los

microorganismos pueden transformar contaminantes y son potencialmente adecuadas para restaurar ambientes contaminados (Rao *et al.*, 2010). Las esterasas son enzimas de tipo hidrolasas, que catalizan la ruptura y formación de enlaces éster (presentes en los ftalatos). Estas enzimas pueden catalizar tres tipos de reacción: esterificación, interesterificación y transesterificación (Bhardwaj *et al.* 2012). Los hongos juegan un papel principal debido al eficiente sistema enzimático que poseen para excretar esterasas. Se ha reportado que las enzimas esterasas son capaces de hidrolizar enlaces éster y que los productos de degradación obtenidos no son tóxicos (Kim *et al.*, 2002, Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2014). Algunas especies de hongos como *Fusarium oxysporum* (Kim *et al.*, 2003), *Fusarium culmorum* (Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2016), *Pleurotus ostreatus* (Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2018), *Trichoderma harzianum* (Aguilar-Alvarado *et al.*, 2015) entre otros, han sido reportados como organismos capaces de degradar ftalatos. Por lo tanto, es importante encontrar organismos con la capacidad de producir esterasas que puedan ser empleados para la degradación de los ftalatos, a través de la ruptura de los enlaces éster presentes en estos compuestos. Existen investigaciones sobre la degradación de ftalatos con *Neurospora sitophila*, y se ha demostrado que es capaz de crecer en medios adicionados con ftalato. Existen investigaciones sobre el crecimiento micelial y actividad enzimática de hongos aislados de la industria de reciclado de papel crecidos en presencia de DEHF (Aguilar Alvarado, *et al.* 2015). En este trabajo se evaluó la velocidad específica de crecimiento (μ), biomasa máxima (X_{max}), pH, consumo de glucosa y la actividad específica de esterasas de *N. sitophila* en medios adicionados con DBF en fermentación sumergida.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Organismo

Se utilizó una cepa de *N. sitophila* del cepario del laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. La cepa se cultivó en cajas Petri con agar extracto de malta (EMA) marca Bioxon® a 25°C, después de 5 días de crecimiento fue almacenada a 4°C hasta su utilización posterior.

2.2. Medio de cultivo y condiciones de crecimiento

Fueron empleados tres medios de cultivo líquidos: 1) Medio mineral (MM) como medio control, 2) 1500 mg de DBF/L+ MM 3) 2000 mg de DBF/L+ MM, cada medio fue adicionado con 10 g de glucosa y 5 g de extracto de levadura por litro, como fuente de carbono y de nitrógeno, respectivamente. El MM contuvo lo siguiente (en g/L), KH_2PO_4 0.6, $MgSO_4$ 0.5, K_2HPO_4 0.4, $CuSO_4$ 0.25, $FeSO_4$ 0.05, $MnSO_4$ 0.05 y $ZnSO_4$ 0.001. Los medios conteniendo 1500 y 2000mg de DBF/L fueron adicionados con 100 μ L de Tween 80 por litro. El pH de los tres medios de cultivo fue ajustado a 6.5 empleando soluciones de NaOH 0.1M y HCl

0.1M según requeridas. Se agregaron 50 mL de medio de cultivo a matraces Erlenmeyer de 125 mL y se esterizaron durante 15 min a 120°C, después fueron inoculados con 3 fragmentos de micelio de 10 mm de diámetro tomados de la periferia de la colonia de la cepa de 5 días de crecimiento. Los medios fueron incubados a 25°C por 5 días en una incubadora con agitación orbital a 120 rpm. Para todos los medios se tomaron muestras del sobrenadante, cada 8 horas durante 5 días. Todos los experimentos se realizaron por separado y por triplicado.

2.3. Producción de biomasa, parámetros cinéticos, consumo de glucosa y medición de pH

La biomasa separada del sobrenadante por filtración (usando papel filtro con tamaño de poro de 20-25 μm) fue cuantificada por el método de peso seco. Se determinó la biomasa máxima (X_{max}) y se calculó la tasa específica de crecimiento (μ) a partir de cambios en el peso usando la ecuación logística como se ha reportado previamente (Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2016). Las evaluaciones de los parámetros cinéticos de la ecuación logística se realizaron utilizando un programa de ajuste de mínimos cuadrados no lineal (Solver, Excel, Microsoft). El consumo de glucosa se determinó empleando solución ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, SIGMA) (Miller, 1959). En este caso, la mezcla de reacción contuvo 2 mL de DNS, 950 μL de agua destilada y 50 μL del sobrenadante. La mezcla se colocó a ebullición durante 5min y después se pasó a un baño frío por 5 min para detener la reacción. El consumo de glucosa se determinó por cambios en la absorbancia a 575 nm usando un espectrofotómetro marca VELAB^{MR}. Se midió el pH del sobrenadante de las muestras, utilizando un potenciómetro digital marca CODUCTRONIC PC45.

2.4. Actividad enzimática de esterasas

La actividad de esterasas se midió por cambios en la absorbancia a 405 nm utilizando como sustrato *p*-nitrofenilbutirato (pNPB) (Alves-Macedo & Fontes-Pio, 2005). La mezcla de reacción contuvo 100 μL de sobrenadante y 900 μL de una solución de: 1.76% (v/v) pNPB, 1.11% (v/v) acetonitrilo, 0.04% (v/v) Tritón X-100 y 11.11% (v/v) agua destilada (aforada con buffer de fosfatos 0.01M a pH 7.5). La mezcla de reacción fue incubada a 37°C durante 5 min, para posteriormente tomar lectura usando un espectrofotómetro marca VELAB^{MR}. La actividad enzimática fue expresada en U/L, donde una unidad enzimática de actividad de esterasas es definida como la cantidad máxima de enzima que produce un incremento de 1 unidad de absorbancia por minuto en la mezcla de reacción (Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2016).

2.5. Parámetros de rendimiento enzimático

El rendimiento de la enzima por unidad de biomasa producida por el hongo (Y_{EX}) se estimó como la relación entre la actividad enzimática máxima obtenida durante el crecimiento exponencial (E_{max}) y X_{max} (ver sección 2.3). La productividad enzimática ($P = E_{max}/\text{time}$) se evaluó en el momento en que la actividad enzimática era máxima. La tasa específica de producción de enzimas se calculó a partir de la ecuación: $q_p = (\mu) (Y_{EX})$ (Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2016).

3. RESULTADOS

3.1. Producción de biomasa, consumo de glucosa y parámetros cinéticos de crecimiento

En la figura 1 se muestra el consumo de glucosa y la producción de biomasa de *N. sitophila* se observó la mayor producción de biomasa en los medios adicionados con 1500 y 2000 mg de DBF/L. *N. sitophila* presentó mayor producción de biomasa en el medio adicionado con 2000 mg de DBF/L que en el medio adicionado con 1500 mg de DBF/L. La fase estacionaria se observó a las 54 h y 72 h para los medios con 1500 y 2000 mg de DBF/L, respectivamente. El medio control y el medio adicionado con 1500 mg de DBF/L presentaron un rápido consumo de glucosa, en comparación con el medio adicionado con 2000 mg de DBF/L

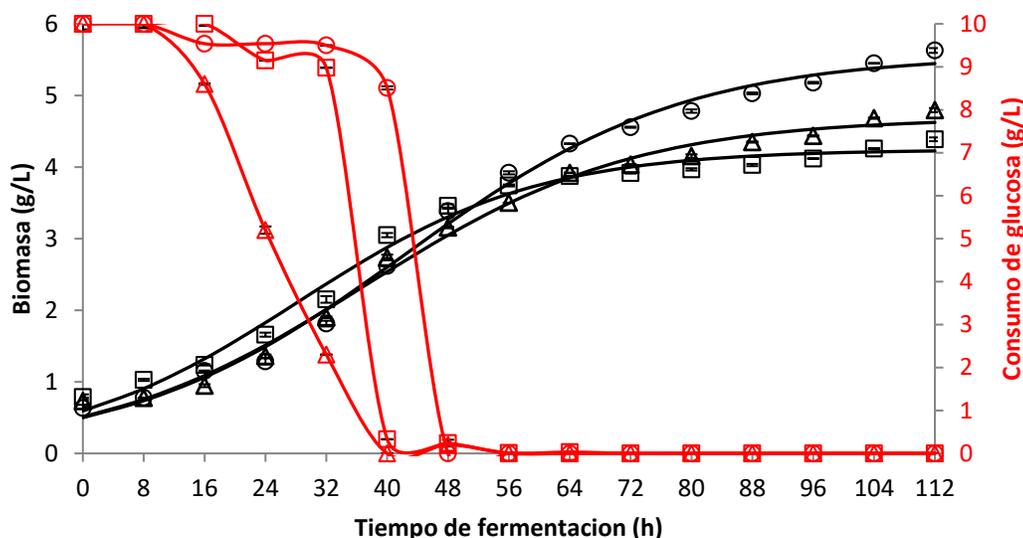


Fig. 1. Producción de biomasa (--) y consumo de glucosa (--) de *N. sitophila* en medio control (Δ), 1500 mg de DBF/L (□) y 2000 mg de DBF/L (○) en fermentación sumergida.

La glucosa fue consumida por *N. sitophila* a las 40 h de crecimiento en el medio control y a las 48 h en los medios adicionados con 1500 y 2000 mg de DBF/L. La mayor producción de biomasa (X_{max}) se obtuvo en los medio adicionados con

DBF. La mayor tasa específica de crecimiento (μ) se obtuvo en el medio control en comparación con los medios adicionados con 1500 y 2000 mg de DBF/L, el mayor rendimiento de biomasa $Y_{X/S}$ fue observado en el medio con 2000 mg de DBF/L (Tabla 1). El pH de los medios adicionados con 1500 y 2000 mg de DBF/L disminuyó a las 56 y 48h a 5.7 y 5.4, respectivamente. A las 80 h se incrementó el pH de los medios adicionados con DBF manteniéndose en 6.2 y 6.3 (Fig. 2).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de crecimiento de *N. sitophila* en el medio control y en los medios adicionados con 1500 mg de DBF/L y 2000 mg de DBF/L en fermentación sumergida.

Parámetros	Medio de cultivo		
	Control	DBF (mg/L)	
		1500	2000
μ (h^{-1})	0.10 ^b (0.006)	0.07 ^a (0.006)	0.05 ^a (0.007)
X_{max} (g/L)	4.25 ^c (0.08)	5.00 ^b (0.07)	5.56 ^a (0.09)
$Y_{X/S}$ (gX/gS)	0.43 ^b (0.006)	0.50 ^b (0.02)	0.55 ^a (0.006)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$). Números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres réplicas en el experimento.

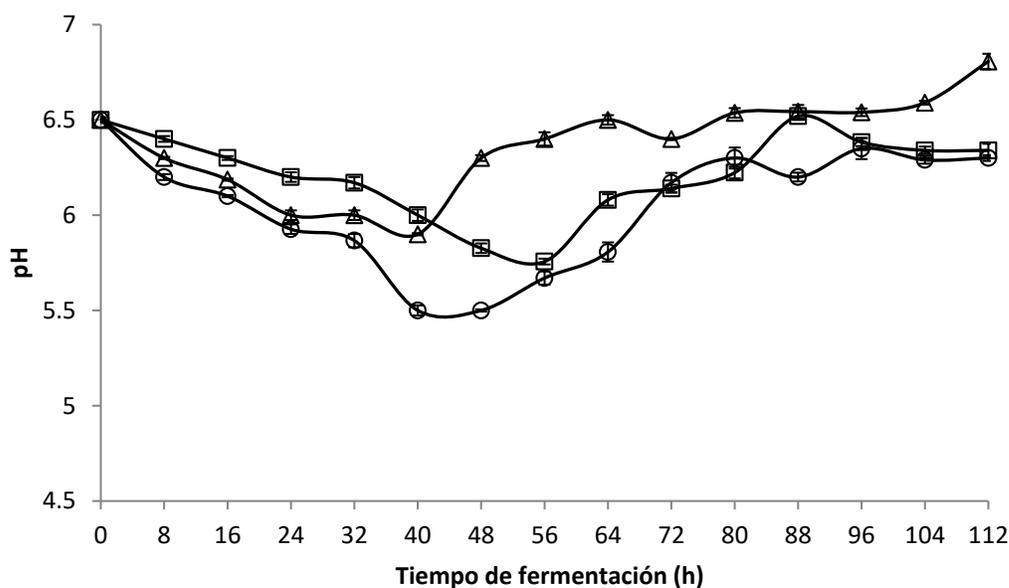


Fig. 2. pH de *N. sitophila* en medio, control (Δ), 1500 mg de DBF/L (\square) y 2000 mg de DBF/L (\circ) en fermentación sumergida.

3.2. Actividad enzimática de esterazas

La figura 3 muestra las actividades enzimáticas de *N. sitophila* en los tres medios de cultivo. Una elevada actividad enzimática se observó en los medios adicionados con DBF durante el desarrollo de la fase exponencial en comparación con el medio control. La mayor actividad enzimática de esterazas (228.3 U/L) fue observada en el medio adicionado con 1500 mg de DBF/L a las 104 h de fermentación. En la Tabla 2 se muestra que el medio adicionado con 1500 mg de DBF/L presentó los valores más altos de E_{max} y $Y_{E/X}$ en comparación con el resto de los medios. La mayor P se presentó en los medios con 1500 y 2000 mg de DBF/L.

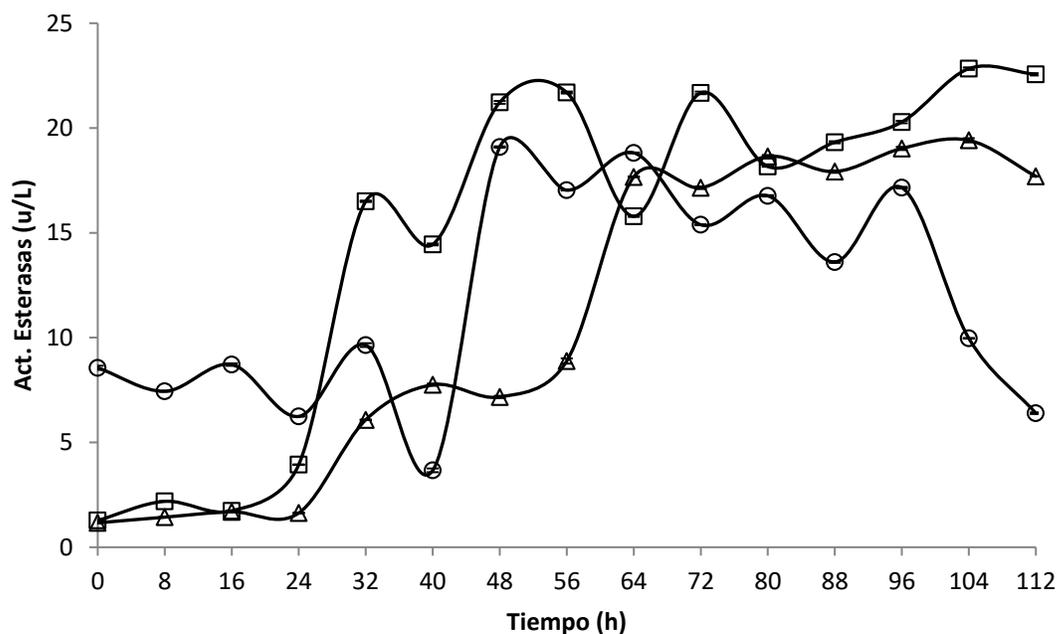


Fig. 3. Actividad enzimática de esterazas de *N. sitophila* en medio control (Δ), 1500 mg de DBF/L (\square) y 2000 mg de DBF/L (\circ) en fermentación sumergida.

Tabla 2. Parámetros de rendimiento enzimáticos de esterasas de *N. sitophila* en fermentación sumergida.

Parámetros de rendimiento enzimático	Medio de cultivo		
	Control	1500	2000
E_{max} (U/L)	19.41 ^b (0.09)	22.83 ^a (0.05)	19.09 ^b (0.03)
$Y_{E/X}$ (U/gX)	4.56 ^b (2.23)	4.56 ^b (7.24)	3.43 ^a (1.63)
P (U/L/h)	0.187 ^c (0.09)	0.219 ^b (0.05)	0.398 ^a (0.03)

Medias con diferente letra (a, b, c) muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$). Números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres réplicas en el experimento.

4. DISCUSIONES

De acuerdo con los experimentos realizados se demuestra que la adición de altas concentraciones de DBF (1500 y 2000 mg de DBF/L) no afecta el crecimiento de *N. sitophila*. La X_{max} fue obtenida en los medios adicionados con DBF, demostrando así que *N. sitophila* es tolerante a la presencia de ftalato. Aguilar-Alvarado *et al.* (2015) evaluaron la velocidad de crecimiento radial (u_r) y la biomasa micelial de *N. sitophila* en medios adicionados con concentraciones de 0, 500, 750, 1000, 1200 y 1500 mg de DEHF/L, y observaron que *N. sitophila* presentó una elevada u_r en el medio adicionado con 1500 mg de DEHF/L, y un alto crecimiento micelial en el medio adicionado con 1200 mg de DEHF/L. Ahuactzin-Pérez *et al.* (2014) reportaron que *N. sitophila* presentó mayor biomasa en los medios adicionados con 500 y 1000 mg de DBF que en el medio control. En este trabajo se observó un consumo de glucosa ligeramente mayor en el medio control que en los medios que contenían DBF. En los medios adicionados con DBF, la glucosa fue consumida en su totalidad después de las 40 h y a la mitad de la fase exponencial lo que sugiere que *N. sitophila* empleó el DBF como fuente de carbono hasta alcanzar la fase estacionaria. El uso del ftalato como fuente de carbono depende del microorganismo utilizado y de la complejidad de la estructura del ftalato (Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2018). Se ha reportado que los ftalatos con cadenas de éster más cortas como DBF pueden ser más fáciles de biodegradar y mineralizar que los ftalatos con cadenas de éster largas como DEHF (Liang *et al.*,

2008). La disminución del pH en los medios conteniendo DBF fue durante las primeras 40 h de fermentación alcanzando un mínimo de pH de 5.75 y 5.5 para 1500 y 2000 mg de DBF/L, respectivamente, lo que sugiere la presencia de compuestos ácidos, debido a la degradación del sustrato. Lee *et al.* (2004) encontraron una tendencia similar a la reportada por Ahuactzin-Pérez *et al.* (2018) en cambios del pH en estudios realizados con hongos de pudrición blanca. Esto se debe a la producción de ácido *o*-fenilacético, ácido *o*-anísico y diferentes ácidos grasos durante la biodegradación de los ftalatos (Staples *et al.*, 1997). La mayor E_{max} obtenida en los medios adicionados con DBF indicó que la producción de esterasa fue inducida por la presencia de este ftalato. Gao & Chi (2015) reportaron que las esterasas intracelulares y extracelulares desempeñaron un papel clave en la degradación de DBF. Elevada E_{max} se obtuvo en el medio con 1500 mg de DBF/L al inicio de la fase estacionaria. Córdoba-Sosa *et al.* (2014) reportaron que las altas concentraciones de DEHF (1500 mg/L) inducían la producción de esterasas, lo que aumentaba el crecimiento de *P. ostreatus*. Alvarado-Aguilar *et al.* (2015) reportaron elevada E_{max} en el medio adicionado con 1200 mg de DEHF/L seguido por el medio de 1500 mg de DEHF/L. Córdoba-Sosa *et al.* (2014) reportaron que la actividad de esterasas de *P. ostreatus* fue mucho mayor que la actividad de la lacasas al inicio de la fase estacionaria en un medio que contenía 1500 mg de DEHF/L en fermentación sumergida. En el presente trabajo, *N. sitophila* mostró una mayor producción de biomasa y de esterasas en los medios adicionados con 1500 y 2500 mg de DBF/L. Estos resultados muestran que *N. sitophila* es capaz de tolerar altas concentraciones de DBF, lo que lo convierte en un organismo con un gran potencial para la biorremediación de ambientes contaminados con altas concentraciones de DBF.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Aguilar-Alvarado Y., Báez-Sánchez M., Martínez-Carrera D. C., Ahuactzin-Pérez, M., Cuamatzi-Muñoz, M., & Sánchez, C. 2015. Mycelial growth and enzymatic activities of fungi isolated from recycled paper wastes grown on di (2-ethylhexyl) phthalate. Polish Journal of Environmental Studies. 24(5): 1897-1902.

Ahuactzin-Pérez M., Torres JL., Rodríguez-Pastrana BR., Soriano-Santos J., Díaz-Godínez G., Díaz R., Tlecuítl-Beristain S., & Sánchez C., 2014. Fungal biodegradation of dibutyl phthalate and toxicity of its breakdown products on the

basis of fungal and bacterial growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30: 2811-2819.

Ahuactzin-Pérez M., Tecuítl-Beristain S., García-Dávila J., González-Pérez M., Gutiérrez-Ruíz M. C. & Sánchez, C. 2016. Degradation of di(2-ethyl hexyl) phthalate by *Fusarium culmorum*: Kinetics, enzymatic activities and biodegradation pathway based on quantum chemical modeling pathway based on quantum chemical modeling. *Science of the Total Environment*. 566- 567: 1186-1193.

Ahuactzin-Pérez, M., Tlecuítl-Beristain, S., García-Dávila, J., González-Pérez, M., Gutiérrez-Ruíz, M.C., Sánchez, C., 2018. A novel biodegradation pathway of the endocrine-disruptor di(2-ethyl hexyl) phthalate by *Pleurotus ostreatus* based on quantum chemical investigation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 147, 494-499.

Alves-Macedo G., Fontes-Pio T., 2005. A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36: 388-394.

Bhardwaj H., Gupta R., Tiwari A. 2012 Microbial population associated with plastic degradation. *Scientific reports*, 1(5): 272.

Córdoba-Sosa, G., Torres, J.L., Ahuactzin-Pérez, M., Díaz-Godínez, G., Díaz, R., Sánchez, C., 2014. Growth of *Pleurotus ostreatus* ATCC 3526 in different concentrations of di(2- ethylhexyl) phthalate in submerged fermentation. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*. 4, 96-103.

Gao J, & Chi J., 2015. Biodegradation of phthalate acid esters by different marine microalgal species. *Marine Pollution Bulletin*. 99 (1-2):70-75.

Karpushova A., Brummer F., Barth S., Lange S., & Schmid R.D. 2005. Cloning, recombinant expression and biochemical characterisation of novel esterases from *Bacillus sp.* Associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67: 59-69.

Kim Y.H., Lee J., Ahn J.Y., Gu M.B., Moon S.H. 2002. Enhanced degradation of an endocrine-disrupting chemical, butyl benzyl phthalate, *Fusarium oxysporum* f. pisi cutinase. *Environmental Microbiology*, 68:4684-4688.

Kim, Y.H., Lee, J., Moon, S.H., 2003. Degradation of an endocrine disrupting chemical, DEHP [di-(2-ethylhexyl)-phthalate], by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63: 75-80.

Lee S. M., Koo B.W., Lee S. S., Kim M. K., Choi D. H., Hong E. J., Jeung E. B., Choi I. G. (2004) Biodegradation of dibutyl phthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity. *Enzyme and Microbial Technology*. 35:417-423.

Liang D.W., Zhang T., Fang H.H., He J., 2008. Phthalates biodegradation in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80:183-198.

Meng X., Niu G., Yang W., Cao X. (2015). Di (2-ethylhexyl) phthalate biodegradation and denitrification by a *Pseudoxanthomonas sp.* strain. *Bioresource Technology*. 180: 356-359.

Miller, G., 1959. Use of dinitrosalicilic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.

Rao MA., Scelza R., Scotti R., Gianfreda L. 2010. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 10(3): 333-353.

Staples, C.A., Peterson, D.R., Parkerton, T.F., Adams, W.J., 1997. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere*. 35: 667-749.