

PRODUCCIÓN DE CELULASAS POR HONGOS TERMÓFILOS AISLADOS DE LOS AZUFRES, MICHOACAN

Gutiérrez Rodríguez Yahir Arioc¹, Rodríguez-Gómez Divanery²

¹ Coordinación de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato | yahirarioc@gmail.com

² Coordinación de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato | Divanery.rodriguez@itesi.edu.mx¹

Resumen

La celulosa es producida por las plantas formando hasta el 40% de su pared celular, consiste en un polisacárido formado por una cadena larga compuesta por moléculas de β -glucosa. La producción de celulasas por parte de hongos filamentosos ha sido ampliamente estudiada para su aplicación industrial diversa. Las enzimas producidas por hongos termófilos pueden ser termoestables. El objetivo de esta investigación fue caracterizar la velocidad de crecimiento y la producción de celulasas a diferentes temperaturas (25, 37 y 45°C) para dos cepas de hongos (LDIM 252 y 253) previamente aisladas de la región norte del estado de Michoacán. Se evaluaron las cepas a diferentes temperaturas para dos pruebas, la de evaluación de la velocidad de crecimiento radial en placas de Petri con medio de agar papa dextrosa y la de producción de celulasas en caja Petri con agar carboximetilcelulosa. Las mayores velocidades de crecimiento (0.014 mm/h) obtenidas fueron a 37 y 45°C, para la cepa LDIM 252 y LDIM 253, respectivamente. Además se encontró mayor índice de producción de celulasas a 45°C comparado con lo encontrado a 37 y 28°C en las dos cepas, con valores superiores a 3, considerados de cepas altamente productoras de celulasas.

Abstract

The cellulose is produced by plants, forming up to 40% of its cell wall; it consists on a polysaccharide formed by long-chains of β -glucose molecules. Cellulase production by filamentous fungi has been widely explored for its industrial application. Furthermore, the enzymes produced by thermophilus microorganisms have the property (and advantage) of being thermostable. Therefore, the aim of this project is to evaluate the radial growth rate and cellulase production index at different temperatures (25, 37 and 45°C) for two fungal strains (LDIM 252 y 253) previously isolated from the northern region of the state of Michoacán. Radial growth rate of these microorganisms was evaluated on Petri plates containing potato dextrose agar and cellulase production was evaluated on media containing carboxymethylcellulose. The highest radial growth rates (0.014 mm/h) were obtained at 37 and 45°C for strain LDIM 252 and 253, respectively. Meanwhile the highest enzymatic index obtained for both strains were at 45°C, it was higher than 3, therefore considered as higher cellulase producer strains.

Palabras Clave

Celulasas, termófilo, velocidad de crecimiento, índice enzimático

INTRODUCCIÓN

La celulosa es uno de los componentes más abundantes en la tierra, ésta es producida por las plantas formando hasta el 40 % de su pared celular, tiene una estructura química que consiste en un polisacárido formado por una cadena larga y lineal de residuos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$ dando este su característica de hidrolizarse con dificultad, en la naturaleza. Muchos microorganismos tales como hongos y bacterias pueden producir enzimas capaces de hidrolizarla como parte de su metabolismo, dicha hidrólisis es debida a la acción de tres diferentes enzimas que en su conjunto ejercen una acción integral (endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa). En la actualidad las enzimas son de gran interés industrial pues aceleran la velocidad de una reacción química, además de su especificidad, disminuyen costos de producción, promoviendo así la transformación de diferentes moléculas en productos específicos. Entre los microorganismos, los termófilos son de interés por su capacidad para producir enzimas celulíticas termoestables, las cuales son en general estables bajo condiciones severas, incluso en niveles de pH altamente ácidos o alcalinos, así como temperaturas de hasta 90 °C [1]. Por tanto el objetivo de este trabajo fue encontrar las mejores temperatura de crecimiento y producción de celulasas de hongos probablemente termófilos aislados de los Azufres de Michoacán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se trabajó con dos cepas de hongos que fueron anteriormente aislados a partir de la región de los Azufres en el estado de Michoacán, estas cepas se etiquetaron como: LDIM 252 y LDIM 253 y se encuentran en el cepario de Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato.

Morfología presuntiva

Las cepas se sembraron en agar PDA y mantenidas por 72 h a 28°C. Una vez crecidas, se realizaron montajes con azul de lactofenol para su observación microscópica con objetivo de 40X.

Velocidad de crecimiento radial

A partir de colonias en crecimiento activo fueron extraídos discos de agar con micelio de 5 mm de diámetro, los que se transfirieron a placas de Petri con agar PDA de 10 cm de diámetro. Las placas de Petri se incubaron a 28, 37 y 45 °C durante 96 h. Se midió el diámetro de la colonia cada 24 h. Finalizado el período de evaluación se graficaron los datos de radio contra tiempo y se ajustaron para obtener la pendiente como velocidad del crecimiento (mm día^{-1}) [2]

Producción de celulasas

Se prepararon cajas de Petri conteniendo el medio con carboximetil celulosa y se siguió la metodología reportada por Florencio y colaboradores [3] para la prueba con Rojo Congo. La inoculación fue realizada con el uso de sacabocado de 5 mm de diámetro usado para transferir una muestra de micelio del medio de agar PDA al centro de las cajas que contienen el medio CMC. Las cajas inoculadas se incubaron durante 96 h a 28, 37, 45 °C. Pasado este tiempo se midió el diámetro de la colonia. Posteriormente se reveló el halo de hidrólisis con el reactivo de Rojo Congo [3]. Para el cálculo subsecuente del índice enzimático (EI) se usó la expresión:

$$EI = \frac{\text{diámetro de la zona de hidrólisis}}{\text{Diámetro de la Colonia}}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología presuntiva

Al microscopio óptico se observaron estructuras del hongo con características concluyentes del genero *Aspergillus*, según se muestra en la Figura 1.

Velocidad de crecimiento radial

En la Figura 2 se muestran los resultados de la velocidad de crecimiento radial de las dos cepas a las diferentes temperaturas. Las mayores velocidades obtenidas para cada cepa fueron: 0.014 mm/h a 37°C para la cepa LDIM 252 y de 0.013 mm/h a 45°C para la cepa LDIM 253.

Producción de celulasas

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos del IE para las cepas LDIM 252 y 253 donde se obtuvo una mayor producción enzimática en las dos cepas a 45°C, con índices superiores a 3. El halo producido por la hidrólisis de la celulosa (Figura 3) está directamente relacionada a la región de acción de las enzimas celulolíticas, ya que el tinte solamente permanece unida a las regiones donde hay enlaces β -1,4-D-glucanohidrolasa. Se considera un IE superior a 1.5 es producido por cepas con alto potencial celulolítico.

CONCLUSIONES

Las cepas LDIM 252 y 253 pertenecen al género *Aspergillus*. Además la cepa LDIM 253 presentó mayor crecimiento y producción de celulasas a 45°C mientras que la cepa LDIM 252 creció mejor a 37°C pero su mayor índice de producción de celulasas se encontró a 45°C.

AGRADECIMIENTOS

PRODEP-SEP por el financiamiento.

REFERENCIAS

- [1] Rodríguez Alegría M.E., Castillo Rosales E. (2015). Enzimas aplicadas en procesos industriales. <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art96/>
- [2] Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G., & Viniegra-González, G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 513-518.
- [3] Florencio C., Couri S. & Farinas C.S. (2012) Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Res.* DOI: 10.1155/2012/793708

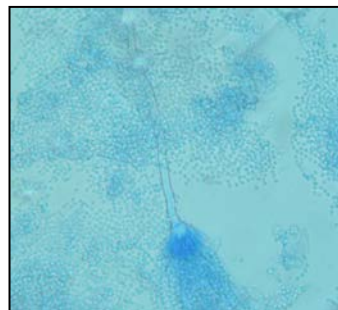


FIGURA 1: muestra del genero *aspergillus* observada a 40X usando lactofenol como colorante de contraste

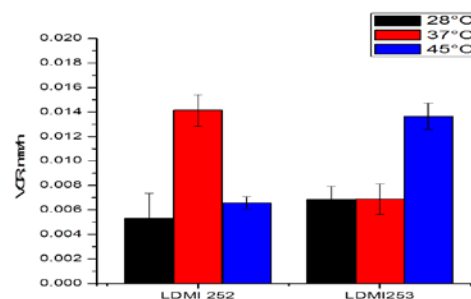


FIGURA 2: (VCR) Tabla comparativa T vs VCR(nm/h) cepas LDIM 252 y LDIM 253



FIGURA 3: Observación de un halo de inhibición alrededor de una colonia de la cepa LDIM 253

Tabla 1 :El (índice enzimático) de la cepas LDIM 252 y LDIM 253 a 28°C,37°C,45°C.Mostrando un índice superior a la temperatura de 45°C

CEPA	TEMPERATURA °C		
	28	37	45
LDIM 252	1.81±0.18	1.3±0.04	3.31±0.7
LDIM 253	1.67±0.15	1.30±0.02	3.02±0.35