

## Selección de Microorganismos Productores de Enzimas Hidrolíticas por Screening en Placa

*Teyssier Eva, Ramírez Castillo María Leticia, Valdez Castro Lucila  
Universidad Politécnica de Puebla, Laboratorio de Investigación y Posgrado,  
3er Carril del Ejido Serrano S/N, San Mateo Cuanalá, Juan C. Bonilla, CP 72640, México  
E-mail: evalhdztesy@yahoo.com.mx*

### Abstract

*Para conocer las mejores cepas productoras de enzimas hidrolíticas se les realizó un barrido de crecimiento a 15 cepas con medio que contenía un solo tipo de fuente de carbono (carboximetilcelulosa, papel filtro, pectina, almidón o inulina). Al cabo de 5 días de crecimiento se reveló el halo de clarificación por adición de lugol y se midió para determinar el índice de potencia. La comparación de todas las cepas logró diferenciar cepas potencialmente productoras de enzimas hidrolíticas de acuerdo a los resultados obtenidos de actividades enzimáticas o índice de potencia de celulasas, pectinasa, amilasa e inulinasa. Las cepas que dieron los mejores resultados fueron CPHD11 y CPHT5 y CPHD13 se seleccionó por representar a la media de la población.*

**Palabras clave:** *Screening, Enzimas hidrolíticas, Índice de potencia.*

### 1. Introducción

Recientemente, la biotecnología es la opción más aceptada para resolver algunos problemas ambientales, de manera económica y amigable con el ambiente. Quizás, la mejor manera para lograrlo es mediante el uso de interacciones naturales de microorganismos con el problema que se presenta [1]. Por ejemplo, existen microorganismos que crecen de manera natural sobre material celulítico, lo cual se considera una contaminación que afecta a la industria papelera, de madera o agroindustrial. Por un lado, es una oportunidad para producir de manera controlada enzimas que degradan los residuos orgánicos para remediar el medio ambiente de alguna materia celulítica contaminante y por otro, se economizan algunos procesos en la industria [2].

México es un país agrícola por excelencia, con alrededor de 317 diferentes cultivos, un porcentaje elevado de estos son destinados a la alimentación; generando una gran cantidad de desechos orgánicos que comprenden cáscara, pulpas, semillas y otros desechos no aprovechados pero que son susceptibles de ser utilizados. El Estado de Puebla ocupa el doceavo lugar de las 32 entidades en Valor de Producción Agrícola ya que se cultivan 125 de los 317 cultivos nacionales [3].

Por otro lado, las enzimas celulósicas, hemicelulósicas y lignolíticas, son de importancia industrial ya que tienen numerosas aplicaciones y potencial biotecnológico para las industrias química, de combustible, alimenticia, cervecera y vitivinícola, de alimento para animales, textil, agrícola, entre otras [4,5].

Cuando se desea implementar un nuevo sistema de degradación se recomienda seleccionar al mejor microorganismo de acuerdo a su capacidad de invasión y degradación; la mejor opción son hongos filamentosos debido a que forman hifas y producen exoenzimas [2].

Los subproductos y residuos provenientes de diferentes agroindustrias, contienen cantidades importantes de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina, lo que los hace un sustrato atractivo para la producción de enzimas de aplicación industrial; destacando las enzimas celulasas, hemicelulasas, xilanasas y pectinasas [5,7].

Es importante considerar que para seleccionar el mejor microorganismo es necesario estudiar una amplia gama de hongos de la misma zona geográfica, donde éstos pudiesen aplicar en el futuro, dado que los taxones distribuidos localmente pueden mostrar un rendimiento mejorado, habiendo adaptado al clima y tipos de sustratos locales [7] aunque por otro lado,

no se han estudiado a profundidad a pesar de su importancia económica y potencial biotecnológico.

Es por ello que en este trabajo se realizó, a partir de un grupo de hongos filamentosos aislados de residuos orgánicos, la selección de microorganismos capaces de producir enzimas hidrolíticas a partir de un screening en placa considerando una fuente específica de carbono.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Microorganismos

Los microorganismos utilizados, 15 cepas de hongos, pertenecen al cepario de la Universidad Politécnica de Puebla, los cuales fueron aislados previamente de material lignocelulósico y hemicelulósico y se conservan en glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico, a menos que se indique lo contrario y todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 2.2. Medio de cultivo

El medio utilizado estaba constituido por ( $\text{gL}^{-1}$ ):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.4;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05; agar bacteriológico, 15; y fuente de carbono (FC), 1.0; carboximetilcelulosa, papel filtro, pectina, almidón o inulina; el pH fue ajustado a 5.5 con NaOH y/o HCl. El medio se esterilizó a  $121^{\circ}\text{C}$  1.2 lb de presión durante 15 minutos, se vertió en cajas Petri 100x15 mm y se sembró por picadura al centro de la caja. Todas las cepas fueron sembradas en los cinco diferentes medios y después de 3-5 días de incubación se revelaron [1].

### 2.3. Revelado

Al final del tiempo de incubación, el micelio se raspó y se revelaron las cajas con 5 mL de lugol, grado farmacia en una dilución 1:8, se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y el sobrante se removió [2]. Para determinar el índice de potencia (IP) o actividad enzimática se midió el diámetro de la zona clara y el diámetro del micelio y se aplicó la Ec. 1 [8].

$$IP = \frac{\text{Diámetro de halo}}{\text{Diámetro de micelio}} \quad \text{Ec. (1)}$$

### 2.4 Microcultivo

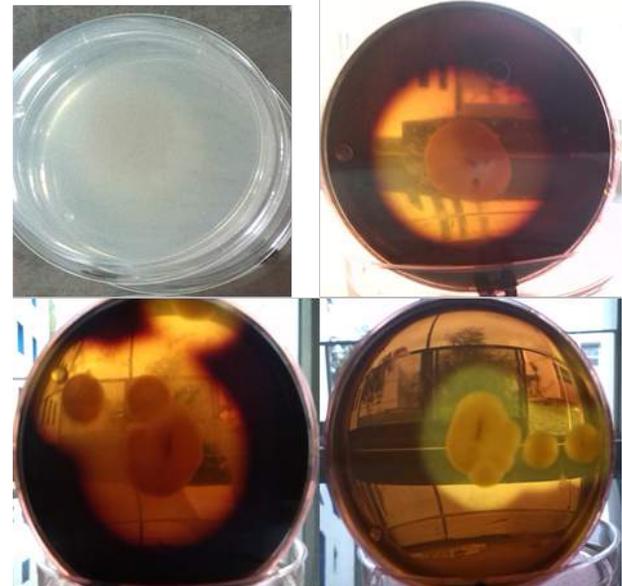
En cajas Petri de 100x15 mm, de manera subsecuente se colocó el siguiente material estéril: una varilla de vidrio en forma de V, un portaobjetos, un cuadro de agar de  $1\text{ cm}^2$ , sembrado por picadura

a los lados al montarse en el microcultivo, un cubreobjetos y 5 mL de agua estéril para mantener la humedad dentro de la caja.

Después de 3 días de cultivo a  $28^{\circ}\text{C}$  se separaron el portaobjetos y cubreobjetos del agar, se añadió una gota de azul de lactofenol y se cubrieron cada uno con su respectivo portaobjetos y cubreobjetos. Las vistas microscópicas se obtuvieron por medio del microscopio marca Leica en el objetivo 40X.

## 3. Resultados y discusiones

Se probaron cinco FC (carboximetilcelulosa, papel filtro, pectina, almidón e inulina), debido a las enzimas hidrolíticas de interés, celulasa, pectinasa, amilasa e inulinasa, respectivamente. En la Figura 1 se observan los halos de degradación del sustrato; en algunas FC el halo puede verse a simple vista, por ejemplo en almidón y carboximetilcelulosa, pero en otras es necesario el revelado.



**Figura 1. Revelado con lugol del halo formado por la degradación del sustrato vía las enzimas hidrolíticas.**

De acuerdo a la FC que contenía el medio, el microorganismo excretaba la enzima adecuada para poder crecer y esto a su vez permitió determinar el potencial de emisión de cada enzima en cada microorganismo.

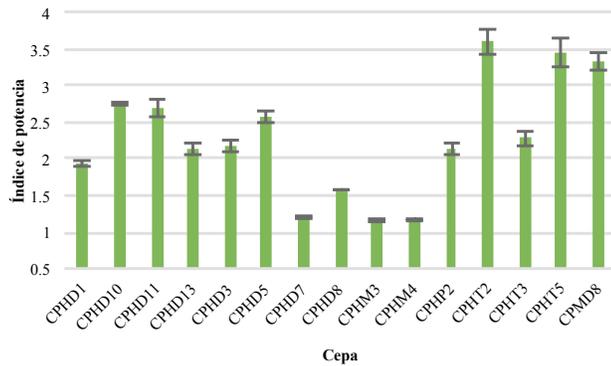
### 3.1. Excreción de celulasas

La producción de celulasa se midió en dos tipos de FC: carboximetilcelulosa y papel filtro. En la primera la celulasa producida se conoce como

endoglucanasa y la otra como actividad celular total [6].

### 3.1.1. Celulasas a partir de carboximetilcelulosa.

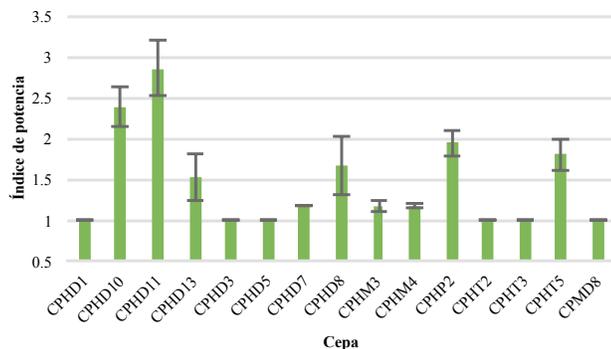
La producción de enzima endoglucanasa en las cepas nombradas como CPHD7, CPHM3 y CPHM4 fue menor a 1.5 de IP y las cepas que mayor IP presentaron fueron CPHT2, CPHT5 y CPMD8 (Figura 2), colocando a estas últimas como una buena opción para la producción de endoglucanasa en medios sintéticos con carboximetilcelulosa. Esta FC es inductor de la producción de enzima endoglucanasa.



**Figura 1.** Índices de potencia que indican el nivel de excreción de celulasa en medio con carboximetilcelulosa.

### 3.1.2. Celulasas a partir de papel filtro.

La actividad celular total obtenida en las 15 cepas difiere de los valores observados en la Figura 2, ya que las cepas CPHT2 y CPMD8 que mostraron mayor IP anteriormente, en este caso presentaron valores menores para celulasas totales, Figura 3.



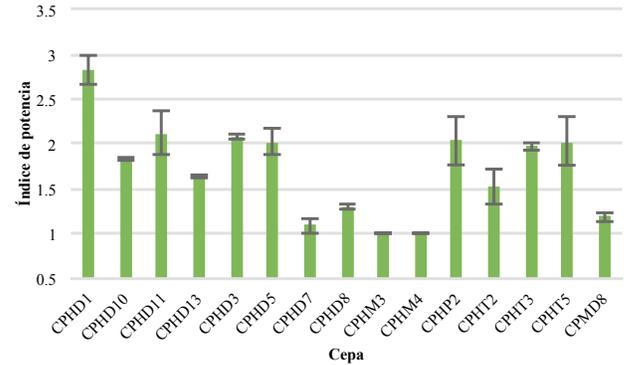
**Figura 2.** Índices de potencia que indican el nivel de excreción de celulasa en medio con papel filtro.

Por otro lado, las cepas CPHD10 y CPHD11 que obtuvieron un valor medio de 2.76 y 2.69, respectivamente, en la producción de endoglucanasa, ahora presentaron 2.38 y 2.86, respectivamente,

siendo estas cepas las de mayor valor de IP para celulasa.

### 3.2. Excreción de pectinasa

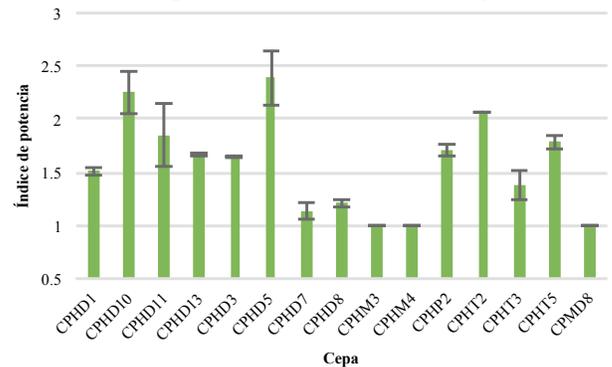
La Figura 4 muestra claramente que la cepa CPHD1 fue la que mejor secreción de pectinasa presenta y que las cepas CPHM3, CPHM4, CPHD7 y CPMD8 fueron las de menor valor de IP.



**Figura 3.** Índices de potencia que indican el nivel de excreción de pectinasa en medio con pectina como única fuente de carbono.

### 3.3. Excreción de amilasa

Aquellas enzimas que son producidas en presencia de almidón se conocen como  $\alpha$ -amilasas. De las quince cepas que se probaron en este medio como FC, tres fueron las cepas que mayor IP mostraron de acuerdo a la Figura 5: CPHD10, CPHD5 y CPHT2.

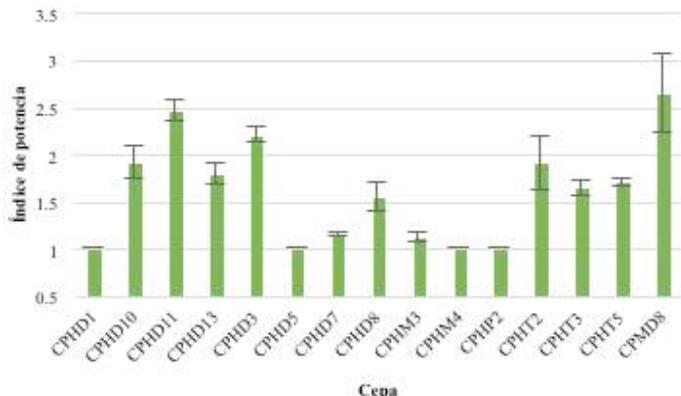


**Figura 4.** Índices de potencia que indican el nivel de excreción de amilasa en medio con almidón.

En cuanto a las cepas restantes, la cepa CPHD11, mostró una desviación estándar más elevada que las demás, lo que podría ubicarla entre las primeras. Por otro lado, las cepas en las que menor actividad se observó fueron CPHD7, CPHD8, CPHM3, CPHM4 y CPMD8. Por lo que para producir amilasa se puede utilizar a la cepa CPHD5, por ser la que mayor valor obtuvo en la media para IP.

### 3.4. Excreción de inulinasa

El medio de cultivo que contenía inulina promovió la producción de inulinasa, colocando a las cepas CPMD8, CPHD11 y CPHD3 como las mejores opciones para producir en mayor cantidad tal enzima (Figura 6). Por otro lado, las cepas CPHD1, CPHD5, CPHD7, CPHM3, CPHM4 y CPHP2 no se recomiendan para la producción de esta enzima.



**Figura 1.** Índice de potencia que indica el nivel de excreción de inulinasa en medio con inulina.

### 3.5. Selección e identificación macroscópica de cepas con potencial biotecnológico

Debido al potencial biotecnológico que representan las enzimas producidas por hongos filamentosos se eligieron tres microorganismos que presentaron mayor producción de enzimas hidrolíticas en la mayoría de los sustratos (Figura 7). Así, las cepas CPHD11 y CPHT5 fueron elegidas por presentar valores altos de IP en las enzimas

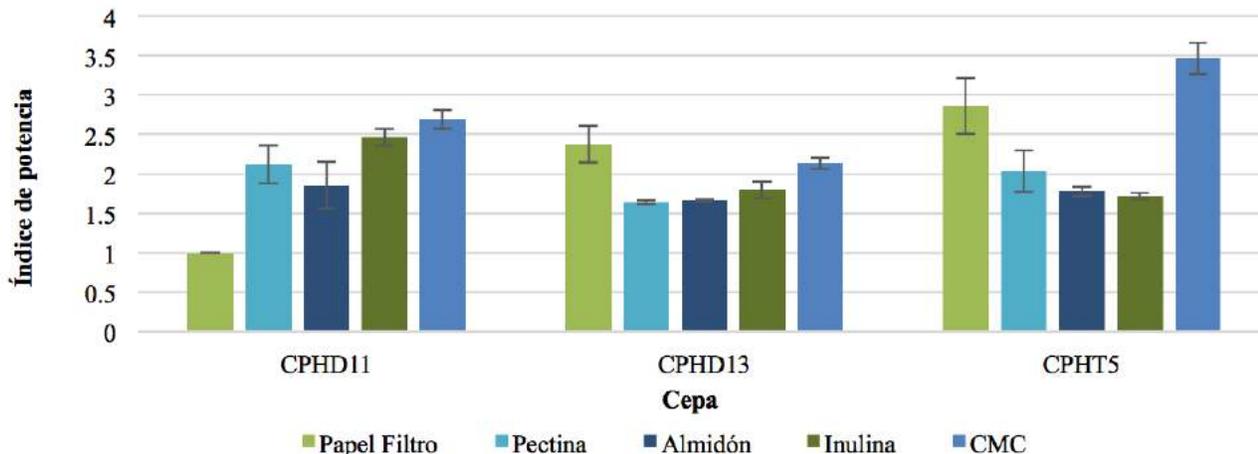
endoglucanasa, celulasa total e inulinasa y CPHD13 se eligió por representar la media de la población.

En la Figura 7 las cepas CPHD11 y CPHT5 difieren en la producción de celulasa total (FC papel filtro), ya que la primera presentó un valor de 1 y la segunda 2.8, ubicando a la cepa CPHD13 entre ambas al obtener 2.4 de IP. En cuanto a la secreción de endoglucanasa (FC CMC), el valor más alto lo mostró, nuevamente, CPHT5 y el más bajo CPHD13.

El IP obtenido en medio con pectina como FC es muy similar en las tres cepas, así como en almidón. Por último, la excreción de inulinasa fue para CPHD13 y CPHT5 muy similar, de 1.79 y 1.71 respectivamente, pero la cepa CPHD11 obtuvo 2.46.

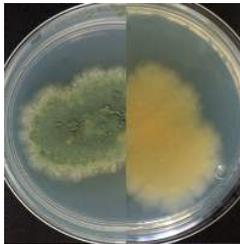
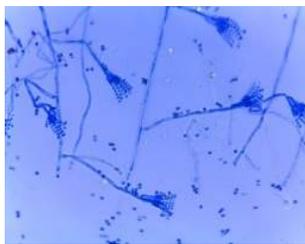
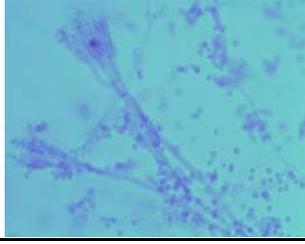
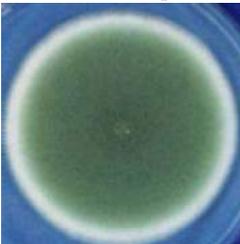
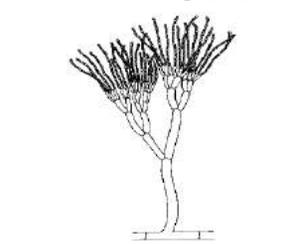
Para identificar parcialmente los microorganismos seleccionados, se utilizó el método de microcultivo realizándose vistas microscópicas de las estructuras características de cada género. Por otro lado, también se tenía el aspecto macroscópico, el cual ayudó a diferenciarlas por su aspecto al crecer en cajas con medio de PDA a 28° C durante 3 días (Tabla 1).

Las imágenes que se obtuvieron de las microestructuras fúngicas pertenecen presumiblemente al género *Penicillium* por la presencia de estructuras en forma de pincel y la conformación de su fiálide y conidios (Tabla 1). Sin embargo no son el mismo microorganismo ya que los valores de sus índices de potencia varían, indicando posible diferenciación.



**Figura 1.** Índices de potencia de las tres cepas seleccionadas para la producción de enzimas a partir de residuos sólidos.

**Tabla 1.** Aspecto macroscópico (crecimiento en PDA) y microscópico (microcultivos vistos a 40X) de cepas elegidas por su potencial biotecnológico.

Aspecto macroscópico	Aspecto microscópico
Cepa CPHD11	
	
Cepa CPHT5	
	
Cepa CPHD13	
	
<i>Penicillium</i> sp. [9]	<i>Penicillium</i> sp. [10]
	

#### 4. Conclusiones

El método de screening en caja permite tener un mejor panorama de las características del cepario que se posee y la potencialidad de producción de los microorganismos para un metabolito o enzima de interés. En el caso de este trabajo, para la producción de enzimas hidrolíticas de hongos.

Así por ejemplo, la producción de celulasa a partir de carboximetilcelulosa como FC puede realizarse si se emplean las cepas CPHT2, CPHT5 o CPMD8 de manera indistinta; pero si la FC es papel filtro, utilizar CPHD11 sería la mejor opción. Para

producir enzima amilasa se pueden usar las cepas CPHD5 o CPHD10 de manera indistinta. En cuanto a la obtención de pectinasa con medio de pectina, se recomienda utilizar la cepa CPHD1. Inulinasa puede ser producida por CPHMD8 o CPHD11 en medio con inulina.

De igual manera se pueden elegir cepas que produzcan varias enzimas. En este trabajo se obtuvieron 4 cepas que son buenas productoras de más de una enzima: CPMD8 puede emplearse para producir endoglucanasa e inulinasa, CPHT2 para endoglucanasa y amilasa, CPHD10 para celulasa total y amilasa y CPHD11 para celulasa total e inulinasa. Esta metodología fue adecuada para seleccionar tres cepas (CPHD11, CPHD13 y CPHT5), presumiblemente del género *Penicillium* que son potencialmente productoras de este tipo de enzimas. La identificación por técnicas de Biología Molecular permitirá confirmar el género.

#### Referencias

- [1] Mikán, V. J. F. y Castellanos, S. D. E. (2004) Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6(1):58-71.
- [2] Doolotkeldieva, T. y Bobusheva, S. (2011) Screening of wild-type fungal isolates for cellulolytic activity. *Microbiology Insights*, 4(1):1-10.
- [3] SIAP (2015) Servicio de Información Agropecuaria de la SAGARPA. Disponible en: [www.siap.gob.mx/](http://www.siap.gob.mx/) Accesado: 03 julio 2015.
- [4] Anwar, Z., Gulfranz, M. e Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 30(1):1-11.
- [5] Manjarrés, K., Piñeros, Y. y Rodríguez-Sandoval, E (2011). Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. en fase sólida sobre residuos de palma. *Bioagro*, 23(1):19-26.
- [6] Barragán, H. B., Téllez, D. Y. A. y Laguna, T. A (2008). Utilización de residuos agroindustriales *Revista Sistemas Ambientales*, 2(1):44-50.
- [7] Guillén, Y., Palfner, G. y Machuca, A. (2011) Screening for lignocellulolytic enzymes and meta tolerance in isolates of wood-rot fungi from Chile *Interciencia*, 36(11): 860-868.
- [8] Picart, P., Diaz, P. y Pastor, F. I. (2007). Cellulase: from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. *Letters in Applied Microbiology* 45(1):108-113.
- [9] Tiwari, K. L., Kumar, J. y Kumar, A. (2011) Morphological and molecular study of different *Penicillium* species. *Middle-East Journal of Scientific Research* 7(7): 203-210