

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

## DISEÑO DE MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS PARA LA BÚSQUEDA DE HIDROLASAS FÚNGICAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO

### DESIGN OF SELECTIVE GROWTH MEDIA FOR THE SCREENING OF FUNGAL HYDROLASES OF BIOTECHNOLOGICAL INTEREST

M.A. Camacho-Ruiz<sup>2</sup>, F.N. González-Ramírez<sup>1</sup>, J.C. Mateos-Díaz<sup>1</sup>, J.A. Córdova-López<sup>3</sup>, G.C. Sandoval-Fabián<sup>1</sup>, J.A. Rodríguez-González<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Guadalajara, Jalisco, México, \*e-mail: jrodriguez@ciatej.net.mx

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Química, <sup>3</sup>Departamento de Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México,

#### Resumen

Las hidrolasas son enzimas altamente demandadas por la industria biotecnológica. La biodiversidad de especies fúngicas a explorar es muy vasta, lo cual amplía la posibilidad de encontrar nuevas especies con características enzimáticas deseables. Sin embargo, existen pocos métodos que permitan seleccionar y/o clasificar cepas fúngicas de acuerdo a sus capacidades de producción de distintas enzimas. En este trabajo, se diseñaron medios químicamente definidos mediante los cuales se lograron determinar las capacidades de producción de celulasas, xilanasas, pectinasas y feruloil estereras de una colección de 82 cepas fúngicas. Lo anterior, permitió seleccionar las mejores cepas para cada tipo de enzima en base a sus parámetros de crecimiento. Se encontraron un total de 3 cepas candidatas para la producción de celulasas, 5 para xilanasas, 10 para pectinasas y 3 para feruloil estereras. El cultivo de estas cepas por Sistemas de Fermentación Sólida, confirmó que los mejores candidatos del escrutinio fueron los mayores productores de enzimas, obteniendo valores de 2 U de celulasa/g Materia Seca (MS) para MIII0-2b (*Penicillium*), 327 U de xilanasas/g MS para 3JAC5HP.IV (*Trichoderma*), 48 U de pectinasa/g MS para KKO3M-104 (*Penicillium*) y 5 U de feruloil esterasa/g MS para PCS-6 (*Aspergillus*); estas producciones enzimáticas fueron similares a las reportadas en la literatura. Los resultados obtenidos muestran que este método de búsqueda puede ser empleado para la clasificación de ceparios, la búsqueda nuevos hongos con estas capacidades enzimáticas e incluso adaptarse para la búsqueda de otras actividades de interés biotecnológico (e.g. fitasa, inulinasa, fructanasa, entre otras).

#### Abstract

Hydrolases are enzymes that are highly demanded by the biotechnological industry. Biodiversity of fungal species to be explored is very extensive, which enhances the ability to find new species with desirable enzyme characteristics. However, there are few methods to select and/or classify fungal strains according to their production capacities of different enzymes. In this work, chemically defined media were designed by which they were able to determine the production capacity of cellulases, xylanases, pectinases and feruloyl esterases from a collection of 82 fungal strains. This allowed to select the best strains for each kind of enzyme based on their growth parameters. It was found a total of 3 candidate strains for the production of cellulases, 5 for xylanases, 10 for pectinases and 3 for feruloyl esterases. Cultivation of these strains in Solid Fermentation Systems, confirmed that the best candidates from the screening were the highest producers of enzymes, obtaining values of 2 U of cellulase/g Dry Matter (DM) for MIII0-2b (*Penicillium*), 327 U of xylanase/g of for 3JAC5HP.IV (*Trichoderma*), 48 U of pectinase/g DM for KKO3M-104 (*Penicillium*), and 5 U of feruloyl esterase/g DM for PCS-6 (*Aspergillus*); these enzyme productions being usually similar to those reported in the literature. The results show that this screening method can be used for the classification of strain collections, the search of new fungi with these enzyme capabilities and even be adapted to search other activities of biotechnological interest (e.g. phytase, inulinase, fructanase, among others).

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

---

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las hidrolasas representan casi el 80% de las ventas generadas en el mercado mundial de enzimas, las cuales son empleadas principalmente como enzimas de grado técnico, enzimas para alimentos y en alimentación animal (Thakore, 2005). Estas enzimas industriales son obtenidas principalmente a partir de cultivos de hongos y levaduras (54%), bacterias (34%), tejidos animales (8%) y vegetales (4%).

Los hongos filamentosos son ampliamente conocidos por sus aplicaciones industriales y como productores de metabolitos (*e.g.* ácidos orgánicos y antibióticos) y de altas cantidades de enzimas extracelulares (Peberdy, 2004). Sin embargo, en la actualidad solo se conoce un poco más del 5% de las especies de hongos, la cual se estima en alrededor de 1.5 millones de especies (Hawksworth 1991; Hawksworth y col., 1995), lo que hace atractiva la búsqueda de nuevos hongos con mejores o nuevas propiedades de interés biotecnológico. Cabe señalar, que para la búsqueda de microorganismos productores de enzimas de interés, es necesario el empleo de métodos robustos que permitan identificarlos, algunos de los pocos métodos existentes utilizan sustratos cromogénicos o indicadores de pH (condicionado a crecimiento abundante) que cambian de color por la liberación de un producto o consumo de un sustrato. Sin embargo, se debe encontrar el indicador adecuado para el sustrato empleado, lo cual muchas veces no es tan sencillo de lograr.

Por otro lado, en sus ambientes naturales, los hongos crecen típicamente en una asociación simbiótica con los sustratos sólidos tales como el suelo o material vegetal. La biodegradación o mineralización de estos sustratos complejos requiere de la participación de un gran espectro de diferentes enzimas producidas por diferentes microorganismos (Gupte y Madamwar, 1997; Koroleva y col., 2002); por lo tanto, una forma de evaluar la capacidad de síntesis de ciertas enzimas extracelulares es emplear una fuente de carbono única que puede ser consumida por el hongo, la cual se verá reflejada de acuerdo a su crecimiento en el medio sólido (Holker y col., 1994).

Es debido a lo anterior, que en este trabajo se diseñaron diferentes medios de cultivo definidos en agar con fuentes de carbono únicas, con el fin de identificar las cepas de una colección de hongos que pudieran crecer exclusivamente sobre esos sustratos (carboximetilcelulosa, xilano, pectina y ácido ferúlico) y que fueran candidatos para la producción de actividades enzimáticas de interés biotecnológico (celulasa, xilanasa, pectinasa y feruloil esterasa) empleando sistemas de fermentación en medio sólido.

## METODOLOGÍA

### Cepas

Se empleó una colección de 82 cepas de hongos filamentosos, aislados de materiales lignocelulósicos como bagazo de agave y caña, residuos de la extracción de café tostado, copra de coco, fermentación del cacao, cascara de huevo y madera, principalmente.

### Medios de cultivo selectivos

Para la selección de los microorganismos se prepararon medios químicamente definidos en cajas petri de 2.5 cm de radio, utilizando un medio mínimo basado en el reportado por Rodríguez y col. (2006), cuya composición es la siguiente (g/L): urea (SIGMA), 4; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (SIGMA), 5; MgSO<sub>4</sub> (SIGMA), 1; cloranfenicol (SIGMA), 0.1; agar bacteriológico (SIGMA), 15; a este medio se le agregó como única fuente de carbono alguno de los sustratos que aparecen en la Tabla 1 ajustando el pH inicial del medio a 6.5.

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

Tabla 1. Sustratos empleados en la formulación de los medios selectivos.

Medio	Sustrato	Cantidad (g/L)	Enzima que induce
A	Carboximetilcelulosa (SIGMA)	20	Celulasa
B	Xilano de madera de haya (SIGMA)	20	Xilanasa
C	Pectina cítrica (SIGMA)	20	Pectinasa
D	Acido ferúlico (ALDRICH)*	5	Feruloil esterasa

\*Nota: el ácido ferúlico es conocido también como un agente antimicrobiano, es por esta razón que se empleó a una menor concentración que los otros sustratos.

## Medios de cultivo y condiciones para la producción de hidrolasas por Fermentación en Medio Sólido (FMS)

El medio de impregnación se formuló conforme al medio mínimo basado en la sección anterior más 5 g/L de glucosa como iniciador de crecimiento. Los sustratos y soportes utilizados para la producción de las diferentes hidrolasas se muestran en la Tabla 2. Los medios de cultivo fueron inoculados con  $3 \times 10^7$  esporas/g de materia seca, a una humedad inicial del 75%. El dispositivo de FMS fue montado de acuerdo a lo reportado por Raimbault y Alazard (1980), se colocaron 20 g de mezcla inoculada en biorreactores tubulares y se incubaron en un baño de agua con temperatura controlada a 30°C y aireación constante durante 5 días.

Tabla 2. Soportes y sustratos utilizados para la producción de hidrolasas por FMS.

Actividad	Soporte	Sustrato
Celulasa	Bagazo de agave	Carboximetilcelulosa (CMC), 20 g/L
Xilanasa	Bagazo de agave	Xilano de madera de haya, 20 g/L
Pectinasa	Bagazo de caña	Pectina cítrica, 20 g/L
Feruloil esterasa	Poliuretano de alta densidad	Cascarilla de maíz, Residuos de la extracción de café tostado, 75% (p/p MS)

## Determinación de actividad enzimática

La actividad celulasa, xilanasa y pectinasa fue determinada empleando un ensayo indirecto, en el que los productos de reacción fueron detectados espectrofotométricamente mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Chaplin y Kennedy, 1986), cuya presencia puede detectarse por lectura de la absorbancia en la zona de 540-570nm. Una unidad correspondió a un  $\mu\text{mol}$  de producto liberado por minuto en las condiciones de reacción (50°C y pH 4.6).

La actividad feruloil esterasa fue determinada con el método colorimétrico descrito por Ramírez y col. (2008) empleando etil ferulato como sustrato; este método consiste en la medición de la producción de ácido ferúlico proveniente de la hidrólisis del etil ferulato, utilizando *p*-nitrofenol como indicador de pH, monitoreando el cambio de coloración de la muestra (desaparición de color) por su lectura de absorbancia a 415nm. Una unidad de actividad enzimática correspondió a un  $\mu\text{mol}$  de producto liberado por minuto en las condiciones de reacción (35°C y pH 7.2).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Selección de los mejores hongos productores de hidrolasas

En la Tabla 3 se muestran los parámetros de crecimiento de los mejores hongos de la colección de 82 cepas capaces de crecer en los diferentes medios selectivos. De manera general, 3 hongos fueron los mejores candidatos para la producción de celulasas (medio A), 5 hongos para la producción de xilanasas (medio B), 10 hongos para la producción de pectinasas (medio C) y 3 hongos para la producción de feruloil esterases (medio

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

D). Cabe señalar que cuando se emplearon los medios para la búsqueda de celulasas y feruloil esterases el crecimiento de los hongos fue muy pobre, contrariamente a cuando se emplearon los medios para la búsqueda de xilanasas y pectinasas.

En la Figura 1, se muestran las fotografías macroscópicas de los 3 mejores candidatos para la producción de cada una de las enzimas de interés. Con estas fotografías y con otras al microscopio (fotos no mostradas) se pudo identificar el género de la mayoría de los hongos candidatos. Cabe señalar, que la mayoría de los hongos pertenecientes a estos géneros, ya han sido descritos como buenos productores de celulasas, xilanasas (Adsul y col., 2004; Belghith y col., 2001; Murashima y col., 2002), pectinasas (Favela y col., 2006) y feruloil esterases (Benoit y col., 2008).

Tabla 3. Parámetros de crecimiento en medios selectivos de los mejores hongos productores de hidrolasas en cajas petri a 30°C.

Cepa	Micelio	Lag (días)	K (cm/día)	Género
<b>a) Medio A (Celulasas)</b>				
MIIIO-2b	-	<1	0.5	<i>Penicillium</i>
KKO2M Café	-	<1	0.3	<i>Curvularia</i>
Jugo	-	1	0.5	<i>Rhizopus</i>
<b>b) Medio B (Xilanasas)</b>				
3JAC5HP.IV	++	<1	0.7	<i>Trichoderma</i>
C5-1	+	<1	2.3	<i>Rhizopus</i>
Hongo Verde	+	<1	0.9	<i>Trichoderma</i>
MIII11f-1g	+	<1	0.8	<i>Aspergillus</i>
JoJo 3 Verde	+	<1	0.8	N.D.
<b>c) Medio C (Pectinasas)</b>				
KKO3M-104	++	<1	1.8	<i>Penicillium</i>
CA-16	++	<1	1.6	<i>Rizophus</i>
Hongo Amarillo	++	<1	1.5	<i>Rizophus</i>
PCS-6	++	<1	1.0	<i>Aspergillus</i>
C2	++	<1	0.8	<i>Aspergillus</i>
CA-1	+	<1	1.5	<i>Rizophus</i>
CA-9	+	<1	1.3	<i>Rizophus</i>
MIII7c-3a Amarillo	+	<1	1.2	N.D.
CHJ-3a III	+	1	1.4	<i>Rizophus</i>
SPBL-310	+	2	1.9	<i>Rizophus</i>
<b>d) Medio D (Feruloil esterases)</b>				
PCS-6	-	>2	N.D.	<i>Aspergillus</i>
S10-V1	-	>2	N.D.	<i>Aspergillus</i>
MIIIgc-2b	-	>2	N.D.	<i>Aspergillus</i>

K: velocidad de crecimiento radial; Lag: fase lag de crecimiento; N.D.: no determinado; -: micelio pobre; +: micelio abundante; ++: micelio muy abundante.

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

## Producción de enzimas por FMS

En la Figura 2, se muestran las producciones enzimáticas por fermentación en medio sólido de los hongos candidatos. Como se puede observar en la Figura 2A, se obtuvieron producciones similares de celulasas para los 3 hongos (entre 1.6 y 2 U/g Materia Seca, MS), siendo el hongo KKO2M Café (*Curvularia*) el que las produjo en menor tiempo (46h), sin embargo la actividad celulasa obtenida para los hongos estudiados fue baja respecto a lo que esta reportado en la literatura para hongos filamentosos (Romero y col., 1999; Adsul y col., 2004). Por otro lado, en lo que respecta a la producción de xilanasas (Figura 2B), el mejor hongo fue el 3JAC5HP.IV (*Trichoderma*) con el que produjeron alrededor de 360 U/g MS en tan solo 20h; estas actividades enzimáticas obtenidas por ambas cepas son comparables a las reportadas en la literatura para hongos filamentosos cultivados por FMS (Pang y col., 2006). Respecto a la actividad pectinasa (Figura 2C), se obtuvieron las máximas producciones para los hongos KKO3M-104 (*Penicillium*) y PCS-6 (*Aspergillus*) con alrededor de 48 U/g MS, siendo la producción de pectinasas por PCS-6 obtenida solamente en 24h. Finalmente para la producción de feruloil esterases (Figura 2D), el mejor hongo productor fue PCS-6 (*Aspergillus*) con 5 U/g MS en 72h; este resultado es superior a los reportados en la literatura para la producción de FEs por FMS: 1.2 U/g MS con *A. niger* (Ramírez y col., 2008) y 0.7 U/g MS para *A. tamaritii* (Pérez, 2008).

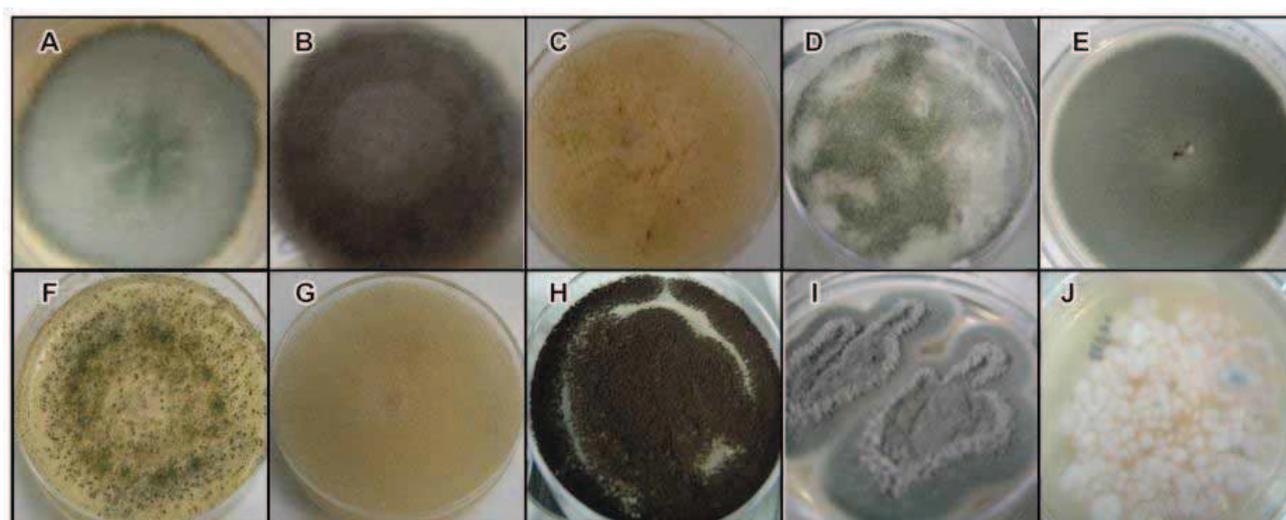


Figura 1. Cultivos en PDA de los hongos seleccionados para la producción de hidrolasas por FMS. A, MIII0-2b (*Penicillium*); B, KKO2M Café (*Curvularia*); C, Jugo (*Rhizopus*); D, 3JAC5HP.IV (*Trichoderma*); E, MIII11f-1g (*Aspergillus*); F, KKO3M-104 (*Penicillium*); G, CA-16 (*Rhizopus*); H, PCS-6 (*Aspergillus*); I, S10-V1 (*Aspergillus*); J, MIIIgc-2b (*Aspergillus*).

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

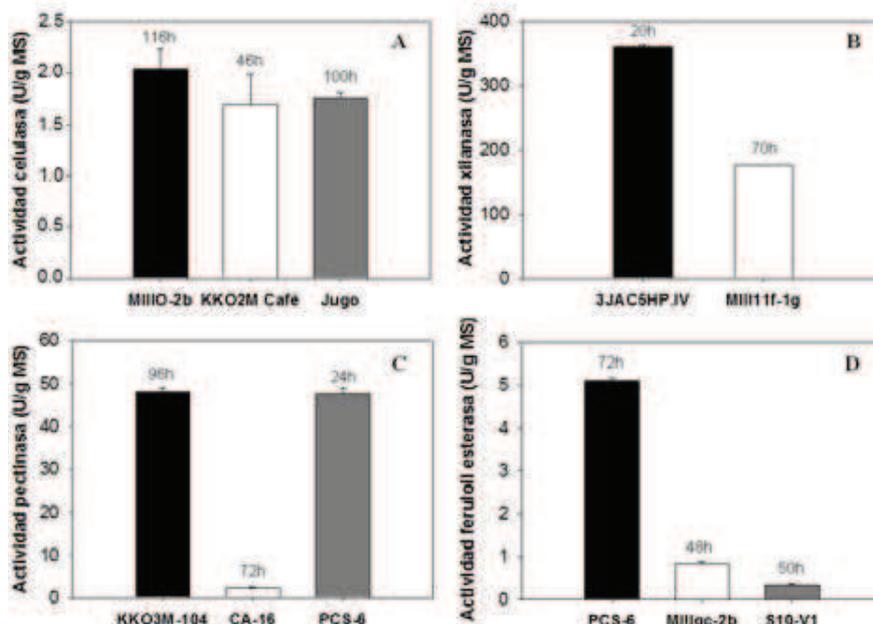


Figura 2. Producción de hidrolasas por FMS de las mejores cepas a diferentes tiempos de incubación. A: producción de celulasas; B: producción de xilanasas; C: producción de pectinasas; D: producción de FEs.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que este método de búsqueda puede ser empleado para la clasificación de las capacidades de producción de enzimas de interés biotecnológico en ceparios existentes y también para la búsqueda nuevos hongos con mejores capacidades de producción enzimática; incluso puede adaptarse para la búsqueda de otras actividades de interés biotecnológico (e.g. fitasa, inulinasa, fructanasa, entre otras).

## AGRADECIMIENTOS

María de los Angeles Camacho Ruiz agradece al CONACyT por el financiamiento de su beca de maestría. Se agradece al CONACyT por el financiamiento del proyecto ciencia básica CB-2008-01-104429.

## REFERENCIAS

1. Adsul, M. G., J. E. Ghule, Singh, R. Shaikh, H. Bastawde, K. B. Gokhale, D. V., and Varma, A. J. (2004). Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers* 57(1): 67-72.
2. Belghith, H., Ellouz-Chaabouni, S. and Gargouri, A. (2001). Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Po16) cellulases. *Journal of Biotechnology* 89(2-3): 257-262.
3. Benoit, I., Danchin, E. G. J., Bleichrodt, R. J. and de Vries, R. P. (2008). Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnology Letters* 30(3): 387-396.
4. Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy (1986). *Carbohydrate analysis a practical approach*, Oxford Univ Pr.
5. Favela-Torres, E., Volke-Sepulveda, T., and Viniegra-Gonzalez, G. (2006). Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technology and Biotechnology* 44(2): 221-227.

# XXXII Encuentro Nacional y 1<sup>er</sup> Congreso Internacional AMIDIQ

3 al 6 de Mayo de 2011, Riviera Maya, Quintana Roo

6. Gupte, A. and Madamwar, D. (1997). Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and  $\beta$ -glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. *Biotechnology Progress* 13(2):166-169.
7. Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95:641-655.
8. Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton, and D. N. Pegler. 1995. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* (8th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. 616p.
9. Hölker, U., Höfer, M. and Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 175-186.
10. Koroleva, O. V., Gavrilova, V. P., Stepanova, E. V., Lebedeva, V. I., Sverdlova, N. I., Landesman, E. O., Yavmetdinov, I. S., Yaropolov, A. I. (2002). Production of lignin modifying enzymes by cocultivated white-rot fungi *Cerrena maxima* and *Coriolus hirsutus* and characterization of laccase from *Cerrena maxima*. *Enzyme and Microbial Technology* 30 (4): 573-580.
11. Murashima, K., T. Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, N., Yaguchi, T. and Kono, T. (2002). Purification and characterization of new endo-1,4- $\beta$ -glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* 30(3): 319-326.
12. Pang, P. K., Darah, I., Poppe, L., Szakacs, G. and Ibrahim, C.O. (2006). Xylanase production by a local isolate, *Trichoderma* spp. FETL c3-2 via solid state fermentation using agricultural wastes as substrates. *Malaysian Journal of Microbiology* 2(1): 7-14.
13. Peberdy, J. F. (1994) Protein secretion in filamentous fungi - trying to understand a highly productive black box. *Trends in Biotechnology* 12 (2): 50-57.
14. Pérez, G. (2008). Producción de enzimas tipo feruloil esterasa por fermentación en medio sólido en pulpa de café. Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México, D.F., Universidad Autónoma Metropolitana. Maestría: 88.
15. Raimbault, M. and D. Alazard (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9: 199-209.
16. Ramirez, L., Arrizon, J., Sandoval, G., Cardador, A., Bello-Mendoza, R., Lappe, P. and Mateos-Diaz, J. C. (2008). "A New Microplate Screening Method for the Simultaneous Activity Quantification of Feruloyl Esterases, Tannases, and Chlorogenate Esterases." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151(2-3): 711-723.
17. Rodriguez, J. A., J. C. Mateos Diaz, Nungaray, J., González, V., Bhagnagar, T., Roussos, S., Cordova, J. and Baratti, J. (2006). "Improving lipases production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation." *Process Biochem.* 41: 2264-2269.
18. Romero, M. D., J. Aguado, Gonzalez, L. and Ladero, M. (1999). "Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw." *Enzyme and Microbial Technology* 25(3-5): 244-250.
19. Thakore, Y. B. (2005). Enzymes for industrial applications. Market Research Report BIO030E. BCC Research: 241.

## Índice