

HONGOS PRODUCTORES DE LIPASAS, UNA ALTERNATIVA AMIGABLE PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL EN MÉXICO

LIPASE PRODUCING FUNGI, A FRIENDLY ALTERNATIVE FOR THE PRODUCTION OF BIODIESEL IN MEXICO

Hernández-Gómez, E.^{1*}; Reyes-Reyes, A.L.^{1,2}; Garrido-Ramírez, E.R.¹; Solís-Bonilla, J.L.¹; Nájera-Domínguez, W.¹

¹INIFAP Campo Experimental Rosario Izapa, Km. 18 Carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas, México: 30870. ²INIFAP Campo Experimental Centro de Chiapas, Km. 3 Carretera Ocozocoautla-Cintalapa, Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas, México: 29140.

*Autor de correspondencia: garrido.eduardo@inifap.gob.mx

RESUMEN

La exploración de soluciones para resolver problemas de energía lleva a la búsqueda de alternativas para la producción de biocombustibles que no produzcan impactos negativos al ambiente. El uso de microorganismos del suelo capaces de derivar biocombustibles a través de la producción de lipasas especialmente hongos es una valiosa alternativa. Se recolectaron muestras de suelo en diferentes localidades del estado de Chiapas, México para detectar e identificar morfológica y molecularmente a hongos productores de lipasas. Se determinaron los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, donde el primero presentó conidios en estructura ramificada, fialides y conidios globosos u ovoides, seguido de *Aspergillus niger*, en el que se observaron conidióforos verticales, simples, con terminaciones globosas, fialides y conidios unicelulares. Molecularmente se identificaron los hongos *Aspergillus niger*, *Penicillium griseofulvum*, *A. oryzae*, *P. janthinellum* y *P. verrucosum*, y asociados a producción lipolítica, aunque no se realizaron evaluaciones de su capacidad de producir las enzimas bajo diferentes sistemas de fermentación.

Palabras clave: producción lipolítica, fermentación, suelo.

ABSTRACT

The exploration of solutions to solve energy problems leads to the search for alternatives for the production of biofuels that do not have negative impacts on the environment. The use of soil microorganisms capable of deriving biofuels through lipase production, especially fungi, is a valuable alternative. Soil samples were collected in different localities of the state of Chiapas, México, to detect and identify morphologically and molecularly lipase producing fungi. The genera *Penicillium* and *Aspergillus* were determined, where the first presented conidia in ramified structure, phialides, and globular and ovoid conidia, followed by *Aspergillus niger* where vertical, simple conidiophores, with globular endings, phialides and unicellular conidia were observed. Molecularly, the fungi *Aspergillus niger*, *Penicillium griseofulvum*, *A. oryzae*, *P. janthinellum* and *P. verrucosum* were identified, and associated to lipolytic production, although no evaluations were carried out of their capacity for producing the enzymes under different fermentation systems.

Keywords: lipolytic production, fermentation, soil.

Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 10, octubre. 2017, pp: 10-14.

Recibido: marzo, 2017. **Aceptado:** agosto, 2017.



INTRODUCCIÓN

El mundo comienza a disminuir la dependencia de combustibles fósiles con el impulso al uso de energías renovables; esto ha fomentado el desarrollo de tecnología para el campo energético y aprovechamiento sustentable de recursos naturales (PND, 2013). El crecimiento económico de México sigue estrechamente vinculado a la emisión de compuestos de efecto invernadero, generación excesiva de residuos sólidos, contaminantes a la atmósfera, aguas residuales no tratadas, y pérdida de bosques y selvas. En este contexto, el biodiesel producido a través de cultivos ricos en aceite representa una opción para sustituir a los combustibles de origen fósil (Álvarez *et al.*, 2007). Se estima que el biodiesel derivado de los cultivos oleaginosos, de las grasas animales y aceites comestibles reciclados será insuficiente para satisfacer las demandas del transporte. Por lo anterior, es recomendable contar con diversas fuentes de aceites para una producción sustentable de biodiesel, a fin de abastecer la necesidad de los biocombustibles (Álvarez *et al.*, 2007). Las fuentes de aceites para la producción de biodiesel pueden ser vegetales, animales, aceites reciclados y microorganismos, aunque no todos son de buena calidad para la producción de biocombustibles, pues la calidad del mismo depende de la composición de los ácidos grasos que componen los aceites (Martínez *et al.*, 2011a; Martínez *et al.*, 2011b). Uno de los métodos de producción de biodiesel promisorios surgido recientemente es el uso de microorganismos como fuente de producción de aceites para la posterior transformación en biodiesel. El uso

de hongos como fuentes de aceites para la producción de biodiesel está siendo explorado, actualmente en México, partiendo de microorganismos que poseen la capacidad de producir y acumular grandes cantidades de aceites a partir de diversas fuentes de carbono, tales como los azúcares, sales orgánicas, hidrocarburos, entre otras. Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas) poseen la capacidad de hidrolizar triglicéridos (Schmid y Verger, 1998); pueden ser de origen bacteriano, fúngico, pancreático, hepático y gástrico, y actualmente tienen diversos usos y aplicaciones, pues poseen potencial como catalizadores en medios orgánicos (Pandey *et al.*, 1999), son usadas también como catalizadores en hidrólisis de aceites y grasas para producir ácidos grasos y glicerol nivel industrial, mostrando mejores propiedades en olor, color y sabor en los productos de la industria alimentaria como quesos y mantequilla, y reducción en los costos de producción. De la misma forma, son utilizadas como catalizadores en la formación de esteres a partir de alcoholes y ácidos grasos, de los cuales se obtienen mayores rendimientos en la reacción. Son ocupados como aditivos en los detergentes para degradar restos de sustratos lípidos que puedan estar presentes en la ropa y se asocian con cultivos microbianos en depósitos para eliminar grasas en paredes de tuberías, en tratamientos de aguas residuales, degradación biológica de efluentes industriales como frigoríficos, mataderos, industrias lácteas y alimentarias (Lie y Molin, 1991; Gandhi, 1997; Pandey *et al.*, 1999). Otros usos incluyen los alimentos para animales domésticos, la industria farmacéutica, química fina, cosméticos, oleoquímicos, cueros, pulpa de celulosa, papel, tratamiento de residuos industriales y también en el área la producción de biodiesel (De Castro *et al.*, 2004; Colla *et al.*, 2010). Las lipasas pueden ser obtenidas de diverso origen y su obtención a través de procesos fermentativos de muchos microorganismos, tales como hongos filamentosos, bacterias y levaduras (Jaeger *et al.*, 1994; Rapp y Backhaus, 1992). La gran mayoría de los hongos presenta capacidad de producir lipasas (Cochrane, 1958; Trigiano y Fergus, 1979). Se ha reportado la disponibilidad comercial de lipasas derivadas de 34 diferentes microorganismos, incluyendo 18 a partir de hongos y siete de bacterias (Jaeger *et al.*, 1999). Algunos hongos reportados con capacidad lipolítica son: *Chromobacterium viscosum*, *Mortierella vinacea*, *M. alpine*, *Rizophus chinensis*, *R. orizae*, *R. microspores*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pytium debaryanu*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus ochraceus*, *A. terreus*, *Malbranchea rouxii*, *Malbranchea mucedo*, *Malbranchea anmaniana*, *Malbranchea isabellina*, *Penicillium iilacinum*, *Hensemulo*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Malbranchea*, *Yarrowia lipolítica* (Ratledge, 1989, 2002; Hannson *et al.*, 1989; Certik *et al.*, 1993; Hiruta *et al.*, 1997; Corzo y Reva, 1999; Domínguez *et al.*, 2003; Seraphim *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004; Pérez, 2012; Zago *et al.*, 2014). Actualmente las lipasas son estudiadas para la producción de biocombustibles, los cuales pueden ser alternativos al diésel del petróleo y a partir de aceites vegetales (Fukuda *et al.*, 2001; Goodrum y Eiteman, 1996). La producción de aceites a partir de microorganismos parece ser una alternativa promisoriosa para la producción de materia prima para la producción de biodiesel, considerando la rapidez de crecimiento de microorganismos y la disponibilidad de suelos y condiciones climáticas en comparación con algunos cultivos agrícolas. Lo anterior podría apoyar a resolver problemas ambientales, sociales y económicos. Con base en lo

anterior, se realizó una recolecta de microorganismos lipolíticos del suelo para su identificación morfológica y molecular, susceptibles de incluir en proyectos futuros relacionados con producción de aceites.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron 396 muestras de suelo de once municipios y cuatro localidades de Chiapas, México. Las cepas de hongos encontradas fueron en los municipios de Villaflores, Chiapa de Corzo, Tonalá, Escuintla, Tapachula, y Tuxtla Chico. Se realizaron pruebas preliminares para seleccionar cepas con potencial de producir lipasas, agregando aceite mineral esterilizado al medio de cultivo nutritivo, y se incubó por 16 horas a 30 °C, y poder observar la formación de halo oscuro por medio de luz ultravioleta (Reyes *et al.*, 2014). Los hongos con capacidad lipolítica se aislaron en medio PDA; las colonias desarrolladas se purificaron por el método de puntas de hifas. Para la identificación morfológica se hicieron montajes temporales y permanentes, y mediante microscopio compuesto se observaron estructuras características del género o especie, y con claves taxonómicas y referencias bibliográficas se determinó a nivel de género (Agrios, 2006). Para la identificación molecular, las cepas seleccionadas se transfirieron a medio líquido Papa-Dextrosa, manteniéndose en agitación por 48 h; se recolectó el micelio y se realizó extracción de ADN por el método de Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983). Se utilizó la técnica de la reacción en cadena polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores ITS1/ITS4, el kit de QIAGEN Top Taq Master mix y un termociclador Techne (TC-412). Las condiciones para PCR fueron: tres minutos de desnaturalización inicial a 94 °C, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineación a 50 °C por 30 segundos, y

extensión a 72 °C por un minuto, y una etapa de extensión final por 10 minutos (White, 1990). Los fragmentos amplificados se visualizaron mediante gel de agarosa en TAE al 0.8 %, teñidos con GelRed™. El fragmento de ADN amplificado se envió a MacroGen para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se compararon con

una búsqueda en la base de datos del banco de genes del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) mediante el algoritmo BLAST (Zheng *et al.*, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hongos identificados pertenecen al género *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. El primero presentó micelio de color azul pegado a medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), no algodonoso, esporulación abundante, regularmente conidios en estructura ramificada, fialides y conidios globosos u ovoides (Figura 1). *Aspergillus niger* presenta micelio pegado a PDA, de coloración negra, aéreo, esporulación abundante, conidióforos verticales, simples, con terminaciones globosas, fialides y conidios unicelulares (Figura 2). *Aspergillus* spp. presenta micelio pegado a PDA, de coloración verde claro, aéreo y esporulación abundante. Conidióforos verticales, simples, con terminaciones globosas, fialides y conidios unicelulares (Figura 3).

Para la identificación molecular se amplificó la banda esperada (600pb), a partir de la cual se obtuvieron las secuencias y se identificaron las siguientes especies (Cuadro 1).

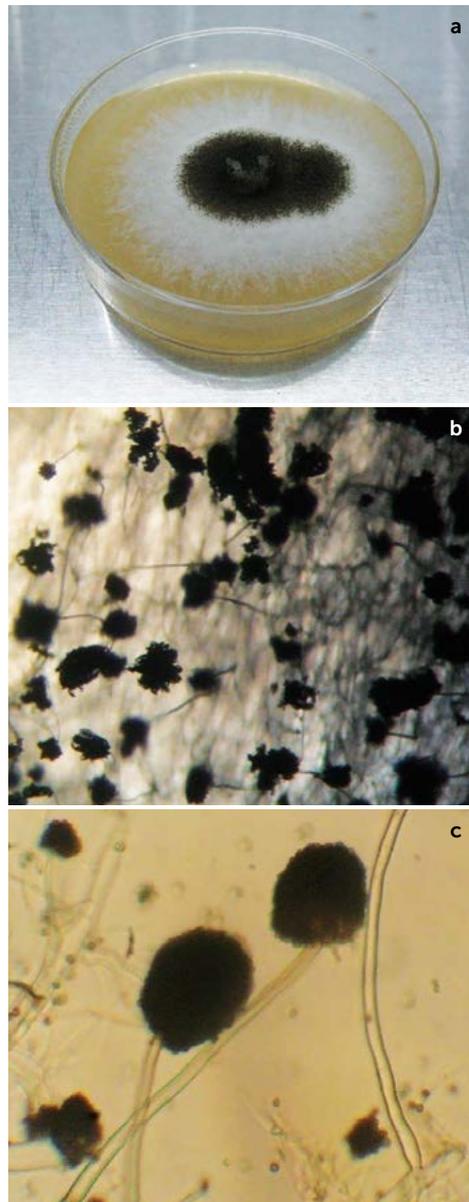


Figura 1. *Aspergillus niger* a: En medio de cultivo PDA, b: Cuerpos fructíferos (4 X), c: Cuerpo fructífero (40X).

CONCLUSIONES

Se identificaron molecularmente los hongos *Aspergillus niger*, *Penicillium griseofulvum*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium janthinellum* y *Penicillium verrucosum*, asociados a producción de lipasas, y se continúa investigando para determinar su capacidad

lipolítica, así como su evaluación bajo diferentes sistemas de fermentación.

AGRADECIMIENTOS

A los fondos fiscales del INIFAP mediante el proyecto "Identificación, selección y caracterización de microorganismos con capacidad lipolítica para producir biodiesel de calidad a partir de aceite de *Jatropha curcas*".

LITERATURA REVISADA

- Agrios G.N. 2006. Plant Pathology. Second Edition. Academic Press. New York, USA. 103 p.
- Álvarez M.H., Blanco M., Fajardo M.A., Sánchez T.P. 2007. Biodiesel a partir de bacterias in XV simposio electrónico internacional. La producción de Biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. Chubut, Argentina.
- Certik M., Baltészova L., Sajbidor J. 1997. Lipid formation and linolenic acid production 'by Mucorales fungi grown on sunflower oil. Appl Microbiol Biotechnol 25: 101-105.
- Cochare V.W. 1958. Physiology of fungi. John Wiley and Sons, Inc., New York. 588. p.
- Colla L.M., Rizzardi J., Pinto M.H., Reinehr C.O., Bertolin T.E., Vieira-Costa J.A. 2010. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. Bioresour Technol. 101 (21): 8308 - 8314.
- Corxo G., Revah S. 1999. Production and Characteristics of the Lipase from *Yarrowia lipolytica* 681, Biores. Technology. 70: 173-180.
- De Castro H.F., Mendes A.A., Dos Santos J.C., De Aguiar C.L. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. Química Nova. 27: 1.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. 1983. A plant DNA miniprep preparation version II. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.
- Domínguez A., Costas M., Longo M., Longo M.A. 2003. Sanromán A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. Biotech. Letters. 25:1225-1229.
- Fukuda H., Kondo A., Noda H. 2001. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering. 92 (5): 405-416.
- Gandhi N.N. 1997. Applications of Lipase. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society. 74 (6): 621-634.
- Goodrum J., Eiteman M. 1996. Physical properties of low molecular weight triglycerides for the development of Bio-diesel fuel models. Bioresource Technology. 56: 55-60.
- Hansson L., Dostalek M., Srenby B. 1989. Fungus *Mucor rouxii* in fed-batch and continuous culture. Appl Microbiol Biotechnol 31: 223-227.

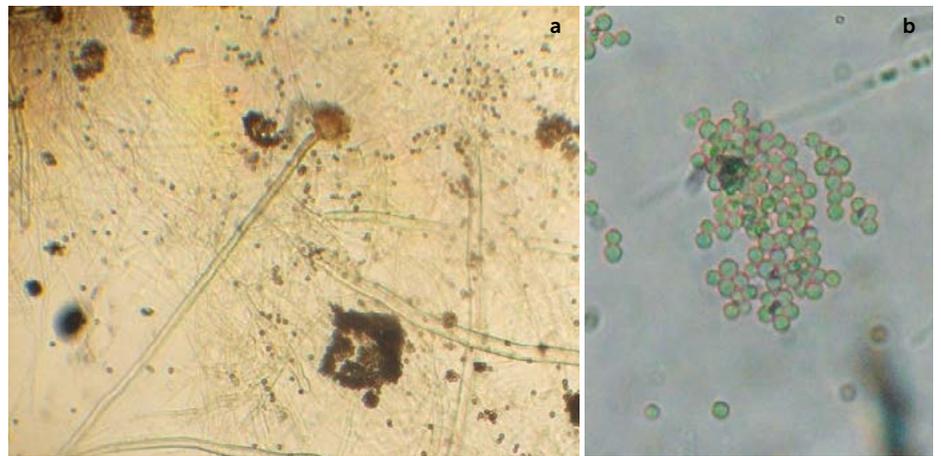


Figura 2. *Aspergillus oryzae*. a: Conidioforo y terminación globosa (10 x), b: Esporas o conidios.

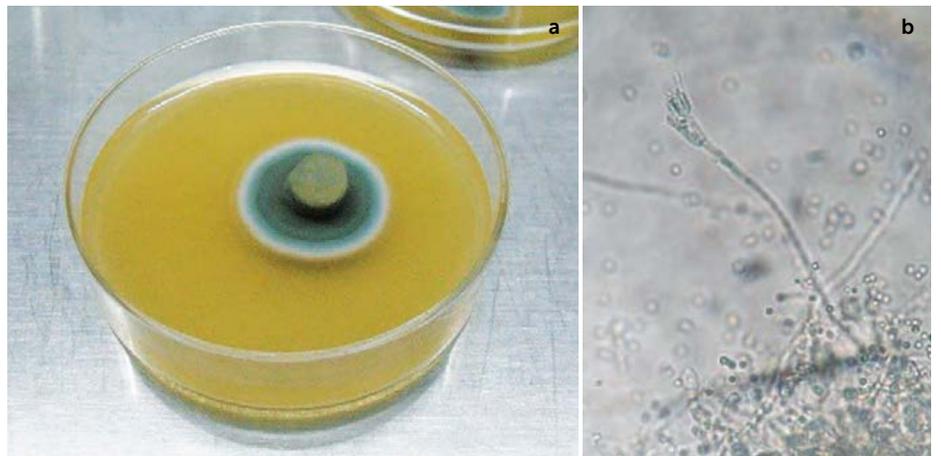


Figura 3. *Penicillium* spp. a: Medio de cultivo V8, b: Cuerpo fructífero (40X).

Cuadro 1. Identificación molecular de hongos con capacidad lipolítica.

Cepa	Especie identificada	Identidad (%)
1	<i>Aspergillus niger</i>	100
2	<i>Penicillium griseofulvum</i>	99
5	<i>Aspergillus oryzae</i>	99
10	<i>Penicillium janthinellum</i>	99
11	<i>Penicillium verrucosum</i>	99

- Hiruta O., Yamamura K., Takebe H., Futamura T., Linuma K., Tanaka H. 1997. Application of Maxblend fermenter for microbial processes. J. Ferment Bioeng 83:79-86.
- Jaeger K.E., Ransak S., Koch H.B., Ferrato F., Dijkstra B.W. 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbiol.Rev. 15: 29-63.
- Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Annu. Rev. Microbiol. 53: 315-351.
- Lie E., Molin G. 1991. Em Bioconversión de waste materials to industrial products. Elsevier Applied Science. New York. p.401.



- Martínez V.B.B., Zamarripa C.A., Solís B.J.L. 2011a. Caracterización química del aceite de semillas de piñón mexicano (*Jatropha curcas* L.) En: VI reunión nacional de investigación agrícola. León, Guanajuato, México. p. 225.
- Martínez V.B.B., Solís B.J.L., Zamarripa C.A. 2011b. Calidad agroindustrial de insumos bioenergéticos para la producción de biodiesel en México. *Agroproductividad*. 4: 8-14
- Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T. 1999. The realm of microbial lipases in Biotechnology. *Biotechnol Appl. Biochem*. Vol.29, p.119-131.
- Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018. Gobierno de la República Mexicana. 184 p.
- Ratledge C., Wynn J.P. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 51:1-51.
- Ratledge C., Wilkinson S.G. 1989. *Microbial Lipids*, Academic Press, London, UK, pp. 555-697.
- Reyes R.A.L., Iracheta D.L., Martínez B.M. 2014. Microorganismos con capacidad lipolítica: una alternativa más eficiente para la producción de biodiesel. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Desplegable informativo Núm. 20.
- Shah S., Sharma S., Gupta M. 2004. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. *Energy & Fuels*. 18: 154-159
- Seraphim P., Michael K., George A. 2004. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high sugar content media. *Bioresour Technol* 95: 287-291.
- Schmid R.D., Verger R. 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37:1608-1633.
- Trigano R.N., Fergus C.L. 1979. Extracellular enzymes of some fungi associated with mushroom culture. *Mycologia*, 71:908-917.
- White T.J., Bruns S.L., Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky T.J. White (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322). New York, NY. Academic Press, Inc.
- Zago E., Botton V., Alberton D., Córdova J., Yamamoto C.I., Côcco L.C., Mitchell D. A., Krieger N. 2014. Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus* microspores. *Energy Fuels*. 28 (8): 5197-5203
- Zheng Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7:203-14.
- Rapp P., Backhaus S. 1992. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 938-943.