

Actividad celulolítica de hongos aislados del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Ramírez A Luz Stella. PhD¹, Isaza B Maria Camila ²

Abstract

Cellulose is the most abundant biopolymer on earth, as it's considered a natural resource with great potential in the biofuel and biotechnology industry. However, it is estimated that approximately 40.000.000 tons of cellulose are produced annually by the agroindustry around the world, meaning that this agro waste accumulates in different environments, causing severe contamination due to the inadequate management it is being given. Currently, the best alternative for agro waste management involves a biological degradation process carried out by cellulolytic microorganisms. Among these microorganisms, cellulolytic fungi are known to produce specific enzymes that catalyze the degradation of ligno-cellulose into several byproducts. Therefore, the main purpose of this investigation was to evaluate the cellulolytic activity of 4 endophytic fungi isolated from the botanical garden located at the Technological University of Pereira. The qualitative cellulolytic activity was evaluated by inoculating the 4 fungi in Czapek's solid medium, followed by staining the fungal colonies with 1% Congo red; the results showed that all 4 fungal genera had cellulolytic activity, which was later determined by measuring the total cellulase activity, using filter paper as a substrate; out of the 4 genera evaluated, *Phanerochaete spp* and *Gano-*

derma spp revealed the highest enzymatic activity values. Overall, the qualitative and quantitative assays revealed the presence of cellulolytic activity, nevertheless, when comparing the results there were certain variations considering that both assays were carried out with different variables that can differ when obtaining the total cellulose concentration.

Keywords: cellulose, cellulase, enzyme assays, fungi, Congo red.

Resumen

La celulosa es un polímero abundante en la tierra y es considerado un recurso natural de gran importancia con un alto potencial para ser empleado en la biotecnología. Se estima que anualmente se producen 40.000.000 t de desechos industriales de celulosa, los cuales se acumulan en el medio ambiente debido al manejo incorrecto que se les está dando. Una de las mejores alternativas para el manejo de residuos agroindustriales involucra un proceso de degradación biológica llevado a cabo por microorganismos celulolíticos. Entre estos, los hongos celulolíticos son reconocidos por su capacidad de producir enzimas específicas que catalizan la degradación de la lignocelulosa a diversos subproductos. Por tal motivo, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad celulolítica de 4 hongos endófitos aislados del jardín

1 Profesora Universidad Tecnológica de Pereira; luramire@utp.edu.co; Grupo de investigación Polifenoles; Línea de investigación Actividad Biológica de Productos Naturales.

2 Universidad Libre Pereira; estudiante de Microbiología. mariac-isazab@unilibre.edu.co.

botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. La actividad celulolítica cualitativa fue evaluada mediante la siembra de los hongos en medio sólido Czapek, seguido de una tinción de las colonias fúngicas con rojo Congo 1%; los resultados mostraron actividad celulolítica en los 4 géneros fúngicos evaluados; la actividad cuantitativa de celulasa total se midió empleando el papel filtro como sustrato; de los 4 hongos estudiados, *Phanerochaete spp* y *Ganoderma spp* mostraron los valores más altos de actividad enzimática. Los ensayos cualitativos y cuantitativos arrojaron la presencia de actividad celulolítica.

Palabras Clave: celulosa, celulasa, pruebas de enzimas, hongos, rojo congo.

Introducción

La celulosa es uno de los biopolímeros más abundantes a nivel mundial y es considerada una fuente con gran potencial en la industria para la producción de materiales como combustibles y químicos. Se estima que la producción anual de celulosa es de 40.000.000 t, indicando que la mayoría de los desechos industriales están conformados por residuos de celulosa, los cuales se acumulan de manera excesiva debido a que no se les da un uso adecuado. Por esto, en los últimos años ha surgido la necesidad de aislar y estudiar los microorganismos celulolíticos, entre ellos los hongos lignocelulolíticos, fundamentales para la transformación de la celulosa en azúcares que son nutrientes esenciales para diversos microorganismos; estos hongos producen diversas enzimas (celulasas, amilasas, proteasas, xilanasas, ligninasas, entre otras); dichas enzimas tienen un amplio rango de aplicación en la agricultura, biotecnología y bioenergía y son consideradas de gran utilidad para la conservación del medio ambiente. (1–6)

Por tal motivo, se pretende evaluar la actividad celulolítica de 4 hongos endófitos presentes en el Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira, con la finalidad de determinar el potencial que tienen dichos hongos para degradar residuos agroindustriales. Este proyecto se desarrolla con el fin de generar información acerca de hongos endófitos con actividad celulolítica, y se espera que sirva de apoyo para futuros proyectos dirigidos a la implementación de estos hongos en procesos de aprovechamiento de subproductos y en otros procesos biotecnológicos.

Metodología

1. Cultivo De Hongos En Medio Sólido

Se sembraron los hongos (*Phanerochaete spp.*, *Stereum spp.*, *Ganoderma spp.*, *Xylaria spp.*) por punción central en el medio de cultivo Czapek's Dox, compuesto por: carboximetilcelulosa 1% extracto de levadura 0,25%, sulfato de amonio 0,05%, peptona 0,25%, cloruro de calcio 0,05%, fosfato monobásico de potasio 0,01%, fosfato dibásico de potasio y agar 1,5%; el pH del medio se ajustó a 7,0 y posterior a la siembra, se incubaron los inóculos a 30°C por 72 h; pasadas las 72 h, se agregaron 20 ml de rojo Congo al 1% (p/v) al interior de las cajas de Petri y se dejó actuar por 15 minutos; pasado este tiempo, se retiró el exceso y se realizó un lavado dos veces con una solución de NaCl 1N, dejándose en reposo por 15 minutos. (7)

La actividad celulolítica se determinó por la presencia o ausencia de halos de inhibición, indicando la hidrólisis de la celulosa; los halos de inhibición fueron medidos en milímetros.

2. Cultivo De Hongos En Medio Líquido

Los hongos que se encontraron capaces de degradar la celulosa, fueron sembrados en el medio líquido Mandel; Se preparó en frascos Erlenmeyer de 250mL, cada uno conteniendo 100 mL del medio compuesto por (g/L): urea, 0.3 g; (NH₄)₂SO₄, 1.4g; KH₂PO₄, 2.0 g; CaCl₂·2H₂O, 0.3 g; MgSO₄·7H₂O, 0.3 g; extracto de levadura, 0.25g; proteasa peptona, 1.0 g y 10 g de CMC y los siguientes minerales en (mg/L): FeSO₄·7H₂O, 5 mg; MnSO₄·4H₂O, 16 mg; ZnCl₂·7H₂O, 17 mg; CoCl₂·6H₂O, 2 mg. El pH del medio se ajustó a 4.8 y se esterilizó. Posterior al proceso de esterili-

zación, se inoculó en cada Erlenmeyer 5mm de muestra del hongo por triplicado; las siembras se incubaron por 5 días a 28°C en shaker a 125 rpm y cumplidos estos días, los cultivos fueron filtrados utilizando papel filtro Whatman No. 1. (8)

3. Actividad Celulolítica

La actividad enzimática de la FPasa y CMCasa fue estudiada en conjunto con la actividad celulolítica. Dicha actividad fue medida determinando la cantidad de azúcares reductores liberados, utilizando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). Una unidad de papel filtro, glucosidasa y carboximetilcelulosa se definió como la cantidad de enzima y fue medido en μmol/min de azúcar reductor (glucosa). (8)

4. Actividad De La Enzima Fpasa

En un tubo de ensayo (por triplicado) se adicionaron: 0.5 mL del filtrado, 1mL de buffer de citrato de sodio al 0.05 M pH 4.8 y una tirilla de papel filtro Whatman No.1 (1 x 6 cm; 50 mg). La mezcla se incubó a 45°C por 45 min; pasado este tiempo, se retiraron las tirillas de papel filtro del tubo de ensayo; como paso siguiente, se pipeteó 1mL de reactivo DNS a cada tubo; a continuación, se sellaron los tubos y se llevaron a baño maría a una temperatura de 95-100°C por 10 minutos; pasados los 10 min, los tubos se transfirieron a un baño frío por 10 minutos; el cambio de color en cada tubo se midió por espectrofotometría a 540 nm. (8)

Resultados y Discusión

Actividad Celulolítica Cualitativa

Los 4 géneros evaluados (*Phanerochaete spp*, *Stereum spp*, *Ganoderma spp* y *Xylaria spp*) mostraron actividad celulolítica con halos de transparencia de 12 mm, 8.5 mm, 6 mm y 9 mm respectivamente. (Tabla 1)

Tabla 1. Determinación de actividad celulolítica de los hongos en medio sólido Czapek's Dox.

Género fúngico	Diámetro de halo de hidrólisis (mm)
<i>Phanerochaete spp</i>	12
<i>Stereum spp</i>	8.5
<i>Ganoderma spp</i>	6
<i>Xylaria spp</i>	9

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA CON ROJO CONGO 1%



Figura 1. Halo de transparencia por *Phanerochaete spp* en medio de cultivo Czapek's Dox con rojo congo 1%.



Figura 2. Halo de transparencia por *Stereum spp* en medio de cultivo Czapek's Dox con rojo congo 1%.



Figura 3. Halo de transparencia por *Ganoderma spp* en medio de cultivo Czapek's Dox con rojo congo 1%.



Figura 4. Halo de transparencia por *Xylaria spp* en medio de cultivo Czapek's Dox con rojo congo 1%.

De acuerdo al artículo publicado por Awadalla *et al.*, 2017, diversas especies fúngicas fueron evaluadas para actividad celulolítica siguiendo el método de Teather y Wood, en donde identificaron que los mayores diámetros de hidrólisis fueron dados por *Aspergillus terreus* (90 mm), *Aspergillus flavipes* (86 mm) y *Aspergillus sydawi* (80 mm).(8) Sin embargo, los diámetros de hidrólisis identificados en este estudio son inferiores a los previamente mencionados, siendo el mayor halo de hidrólisis perteneciente al género *Phanerochaete spp* (12 mm).

De manera similar, se reportaron resultados de actividad celulolítica obtenidos por Campuzano *et al.* 2017, en donde el mayor diámetro de hidrólisis se identificó en el género *Conidiobolus spp* (24.9 mm). (9)

En otra investigación realizada por Guzmán *et al.*, 2014, los hongos que obtuvie-

ran un diámetro de actividad celulolítica mayor a 6 mm fueron seleccionados. (7)

Según diversos autores mencionados anteriormente, las diferencias entre los diámetros de actividad celulolítica probablemente estén ligadas a los tipos de suplementos de nitrógeno y carbono que se adicionan a los medios de cultivo y las condiciones de agitación y aireación.

El género fúngico *Phanerochaete spp* es estudiado con frecuencia debido a su sistema de enzimas que le permiten llevar a cabo procesos de degradación de lignocelulosa. Al ser cultivado en un medio que contenga celulosa como fuente de carbono, este produce 2 enzimas extracelulares que oxidan los extremos reductores de la celobiosa oxiadasa y la celobiosa quinona oxidoreductasa.(10) Por esta misma razón, exhibe los mayores halos de hidrólisis cuando es estudiado en conjunto con otros géneros fúngicos.

Medición de la actividad celulasa total (fpasa)

Se midió la actividad de celulasa total (celobiohidrolasa, endo 1,4 β -glucanasa y β -glucosidasa) utilizando el papel filtro como fuente de sustrato. De los 4 géneros evaluados, *Phanerochaete spp* y *Ganoderma spp* mostraron los máximos valores para actividad enzimática. (Tabla 2)

Tabla 2. Actividad celulasa total (FPasa) de los 4 géneros fúngicos evaluados.

Género fúngico	Absorbancia (540nm)	Azúcares reductores (g/L)	Actividad enzimática (U/mL)
<i>Phanerochaete spp</i>	0.048	0.678	0.167
<i>Stereum spp</i>	0.031	0.384	0.094
<i>Ganoderma spp</i>	0.055	0.799	0.197
<i>Xylaria spp</i>	0.023	0.246	0.06

Un estudio llevado a cabo por Rodríguez *et al.*, 2007, enfocado en la producción de enzimas celulasas por *Trichoderma viride* T12 identificó un valor máximo de 0.374 U/mL para la actividad de FPasa; los autores concluyeron que el valor obtenido era muy bajo comparado a otros valores reportados previamente debido a que el microorganismo utilizado para el estudio había sido modificado genéticamente. (11) Otra investigación por Cedillo *et al.*, encargada de medir la producción de xilanasas y celulasas por *Phanerochaete chrysosporium*, determinó que la mayor actividad de las FPasa (1.4 U/mL) fue dada al utilizar el xilano como única fuente de sustrato; concluyeron que esto podría suponer que es un sustrato capaz de inducir tanto las enzimas xilanolíticas como celulolíticas en *P. chrysosporium*. (12)

En el presente estudio, los valores registrados para la actividad de FPasa no son comparables con otros estudios debido a que la especie de los 4 géneros fúngicos evaluados aún no ha sido determinada. La habilidad de los hongos de la pudrición blanca para degradar la lignocelulosa de-

pende de la especie y del sustrato; adicionalmente, algunas especies de hongos no producen enzimas complementarias necesarias para mediar el proceso de degradación de lignina y celulosa, por lo que es necesario tener conocimiento de la especie fúngica para obtener resultados más precisos.

Adicionalmente, los resultados obtenidos de la actividad celulolítica cualitativa y cuantitativa presentaron diferencias; para el ensayo cualitativo, se utilizó CMC al 1%, considerado un sustrato soluble, mientras que para el ensayo cuantitativo se empleó papel filtro Whatman No. 1, clasificado como sustrato insoluble. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el tipo de sustrato empleado para cada prueba, ya que, de acuerdo con Zhang *et al.*, 2006, la solubilidad o insolubilidad de dichos sustratos en agua es el parámetro que determina los factores para tener en cuenta al realizar el ensayo.

Dado que los dos sustratos utilizados tenían diferentes solubilidades, la accesibilidad de las enzimas al sustrato y el grado de polimerización presentaron diferencias. Los autores mencionados anteriormente plantean que es casi imposible comparar los resultados de ensayos enzimáticos que impliquen diferentes sustratos debido a las variaciones que pueden darse en la concentración total de celulosa, la proporción de endo/exocelulasas, tiempo de reacción y las características del sustrato. (13)

Conclusiones

Ganoderma spp (0.197 U/mL) y *Phanerochaete spp* (0.167 U/mL) registraron los valores más altos de actividad enzimática, indicando el gran potencial que pueden te-

ner estos hongos en cuanto a la actividad celulolítica.

A pesar de que la especie de los 4 géneros fúngicos evaluados aún no ha sido determinada, los resultados obtenidos en este trabajo podrían servir de apoyo para futuros proyectos dirigidos a implementar dichos hongos en procesos de degradación de celulosa.

El género fúngico *Phanerochaete spp* obtuvo el mayor halo de hidrólisis (12mm), comprobando que es un hongo de interés debido a la gran capacidad que tiene para producir enzimas celulolíticas.

Referencias Bibliográficas

1. Christov LP, Szakacs G, Balakrishnan H. Production, partial characterization and use of fungal cellulase free xylanases in pulp bleaching. *Process Biochem* 1999;34(5):511–7.
2. Xia L, Cen P. Cellulase production by solid fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochem*. 1999;34(9):909–12.
3. Miettinen-Oinonen, A. Londesborough J, Joutsjoki V, Lantto R, Vehmaanperä J. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* with applications in the textile industry treatment at neutral pH. *Enzyme Microb Technol*. 2004;34(3–4):332–41.
4. Herculano PN, Porto TS, Moreira KA, Pinto GAS, Souza-Motta CM, Porto AL. Cellulase production by *Aspergillus japonicus* URM5620 using waste from castor bean (*Ricinus communis* L.) under solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;165((3-4)):1057–67.
5. Phitsuwphan P, Laohakunjit, N. Kerdchoechuen O, Kyu KL, Ratanakhanokchai K. Potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia Microbiol (Praha)*. 2013;58(2):163–76.
6. Nathan VK, Rani ME, Rathinasamy G, Dhiraviam KN, Jayavel S. Process optimization and production kinetics for cellulase production by *Trichoderma viride* VKF3. *Springerplus*. 2014;3:92.
7. Guzmán Cedeño ÁM, Zambrano Pazmino DE, Rondón AJ, Laurencio Silva M, Perez Quintana M, Leon Aguilar R, et al. Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí-Ecuador. *Rev la Fac Ciencias Agrar Univ Nac Cuyo* [Internet]. 2014;46(2):177–89. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/refca/v46n2/v46n2a13.pdf>
8. Awadalla OA, Metwally A-E-A, Bedawy M, Rashad R. Cellulolytic activities of some filamentous fungi from soil. *Egypt Soc Exp Biol*. 2017;13(2):367–74.
9. Campuzano F SE, Urquijo T L, Valde-rama J. Evaluación de la actividad celulolítica y quitinolítica de hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de *Rhizoctonia solani* Evaluation of the cellulolytic and chitinolytic activity of rhizosphere. *Nova*. 2017;15(28):45–55.
10. Habu N, Samejima M, Dean JFD, Eriksson KEL. Release of the FAD domain from cellobiose oxidase by proteases from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett*. 1993;327(2):161–4.

11. Rodríguez G. I, Piñeros C. Y. Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Rev La Fac Química Farm.* 2007;14(2):35–42.
12. Cedillo Aguilar A, Peralta Pérez MR, Castañeda Gutiérrez G., Martínez Trujillo A. Efecto de la relación celulosa: hemicelulosa sobre la producción por *phanerochaete chrysosporium* A594. *Soc Mex Biotecnol y Bioingeniería.*
13. Percival Zhang YH, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv.* 2006;24:452–81.