

Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica de *Hyphomycetes* nativos de la provincia de Villa Clara*

Pavel Munero Urbay (1), Luis A. González Díaz (1), Carlos Pérez Navarro (2), María J. Manso Fernández (1) y Francisco Díaz Casas (2).

(1) Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Villa Clara.

(2) Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Villa Clara, Cuba

RESUMEN. Entre los microorganismos capaces de degradar la celulosa en los hábitat del suelo se encuentran los hongos mesófilos y dentro de estos, los *Hyphomycetes* juegan un papel fundamental. Sin embargo, no todas las especies pueden producir elevados niveles de enzimas extracelulares que a su vez no sean afectados por factores físicos y químicos durante el proceso de hidrólisis. En el presente trabajo se aislaron 17 cepas de *Hyphomycetes* celulolíticos a partir de muestras de suelo con hojarasca de la provincia de Villa Clara. Las especies mayormente encontradas en nuestros aislamientos fueron *Penicillium* sp. (41,17 %), *Trichoderma* sp. (29,41 %), y *Aspergillus* sp. (17,64 %). Se evaluó inicialmente la capacidad celulolítica de todas las cepas mediante la prueba de degradación del papel de filtro. De acuerdo con estos resultados se seleccionaron las diez mejores, a las que les fue determinada cuantitativamente las actividades endoglucanasa y exoglucanasa. La cepa que mostró los mayores niveles de actividad fue *Penicillium* sp. UC10, correspondiente a 19,13 y 1,21 UI/mg de proteínas, respectivamente. Respecto a la actividad enzimática por biomasa, la cepa *Trichoderma* sp. UC3 presentó los valores más elevados con 1,10 y 0,18 UI/mg de biomasa para ambas enzimas.

Palabras clave: *Hyphomycetes*, celulosas, *Penicillium*, endoglucanasa, exoglucanasa.

ABSTRACT. Among the microorganisms able to degrade the cellulose in the habitats of soil are the mesophilic mushrooms and between them, the *Hyphomycetes* plays a fundamental role. However not all the species can produce high levels of extracellular enzymes at the same time not affected by physical and chemical factors during the hydrolytic process. In this research were isolated 17 strains of cellulolytic *Hyphomycetes* from soil with trashes samples focus in Villa Clara region. The most common species found in our isolations were *Penicillium* sp. (41,17 %), *Trichoderma* sp. (29,41 %), and *Aspergillus* sp. (17,64 %). Initially, it was evaluated the cellulolytic capacity of all the strains by means of the filter paper degradation test. In accordance with these results the ten better organisms were selected for the quantitative determination of the endoglucanase and exoglucanase activities. The strain that showed the biggest activity levels was *Penicillium* sp. UC10, corresponding to 19,13 and 1,21 IU/mg of proteins, respectively. Regarding the enzymatic activity per biomass quantity, the strain *Trichoderma* sp. UC3 presented the highest values with 1,10 and 0,18 IU/mg of biomass for both enzymes.

Key words: *Hyphomycetes*, cellulases, *Penicillium*, endoglucanase, exoglucanase.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los microorganismos capaces de utilizar la celulosa como sustrato resulta de mucho interés, debido a que este compuesto se encuentra entre los principales polímeros vegetales incorporados a los hábitat del suelo. La degradación total de esta sustancia involucra los tres componentes enzimáticos del denominado complejo celulasa. Este sistema ha sido ampliamente estudiado en hongos mesó-

filos tales como *Trichoderma reesei* (Lynd *et al.*, 2002). Sin embargo, sus actividades hidrolíticas son afectadas por una serie de factores físicos y químicos que limitan la degradación de la celulosa insoluble.

Es por ello que la búsqueda de microorganismos con mejores capacidades celulolíticas, pondría a nuestra disposición nuevas fuentes biológicas de celulosas con posibilidad de ser empleadas en el tratamiento de residuos vegetales,

* Agrocentro (IX Simposio de Sanidad Vegetal en la Agricultura Tropical)

obtención de biomasa y en la sacarificación de compuestos lignocelulósicos que sirven como materia prima en varias industrias (Knauf and Moniruzzaman, 2004). Además de esto dichos organismos pudieran constituir controladores biológicos potenciales, ya que dichas enzimas pertenecientes a la familia de las hidrolasas participan en asociación con otras en la destrucción de varios géneros de hongos fitopatógenos (Elad, Y., 2000). Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente expuestos, nos hemos planteado como primer objetivo para la realización del presente trabajo aislar nuevas cepas de *Hyphomycetes* celulolíticos nativos, identificándolos hasta género y/o especie. A la par de esto también nos propusimos evaluar la capacidad celulolítica de cada una de las cepas aisladas y por último determinar cuantitativamente las actividades enzimáticas endoglucanasa y exoglucanasa del complejo celulasa de estos microorganismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron cuatro muestras de suelo con hojarascas en dos bosques de la provincia de Villa Cara, en el mes de noviembre de 2004. De cada muestra se tomó un gramo y se añadió a frascos que contenían papel de filtro como fuente de carbono en medio mínimo Czapeck pH 5,5. Cada muestra se trabajó por cuadruplicado. Los aislamientos se identificaron según Rudakov (1981) y Egorova (1986), mediante estudios macro y microscópicos en Agar Papa Dextrosa (APD). La evaluación cualitativa de la actividad celulolítica se llevó a cabo por el examen de degradación del papel de filtro. Luego se realizó la selección de las cepas de acuerdo a los criterios utilizados.

Finalmente se procedió a determinar cuantitativamente las actividades celulolíticas de las cepas preseleccionadas. La obtención de los sobrenadantes se realizó en medio Czapeck pH 5,5, suplementado con papel de filtro (50 ñg). Al cabo de 25 días post-incubación a 30 grados Celsius se procedió a centrifugar y filtrar los cultivos. El líquido sobrenadante fue empleado entonces para la determinación de la actividad endo- β -1,4 Glucanasa y exo- β -1,4-Glucanasa.

En estos ensayos se emplearon como sustratos carboximetilcelulosa (CMC) al 1 % y papel de filtro Whatman no. 1 (50 ñg), respectivamente. La técnica empleada fue la de determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-Dinitrosalicílico. Se expresó la actividad enzimática en unidades internacionales (UI) por mL, considerando una unidad como la cantidad de enzima que libera un micromol de glucosa por minuto por mL (Ceroni y Gutiérrez-Correa, 1988 y Steiner *et al.*, 1991). Las proteínas solubles se cuantificaron por el método de Lowry y la biomasa celular por la pérdida de peso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación genérica de las cepas

En la Tabla 1 se presentan los resultados del aislamiento e identificación de las cepas aisladas, apreciándose la prevalencia de los géneros *Trichoderma* y *Penicillium*. Se demuestra que el método de aislamiento empleado permitió obtener cepas celulolíticas desde un primer momento resultando además económico y práctico para estos propósitos.

Tabla 1. Número de cepas de *Hyphomycetes* celulolíticos por géneros, aisladas en las cuatro muestras procesadas

Género	No. de cepas	% del total
<i>Aspergillus</i> sp.	3	17,64
<i>Fusarium</i> sp.	2	11,76
<i>Penicillium</i> sp.	7	41,17
<i>Trichoderma</i> sp.	5	29,41

Evaluación cualitativa de la actividad celulolítica

Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 2, observándose que del total de cepas aisladas, 11 (64,70 %) mostraron una degradación entre buena y muy buena, 4 (23,52 %) de regular, una escasa y una no observable. Estos niveles de degradación son bastante aceptables respecto a los obtenidos por otros investigadores

(Prasertsan *et al.*, 1992 y Saddler, 1982) para hongos celulolíticos y se pueden correlacionar con las determinaciones cuantitativas.

Tabla 2. Actividades celulolíticas cualitativas de las cepas aisladas

Muestra No.	Degradación del papel de filtro				
	MB	B	R	E	N.O.
1	1	1	1		
2	2	1		1	
3	1	3	1		
4	1	1	2		1

Leyenda:

MB: Muy buena, B: Buena, R: Regular, E: Escasa, N.O.: No observable

Determinación cuantitativa de la actividad celulolítica

Las actividades endoglucanasa y exoglucanasa se comportaron entre 2,39-1,81 y 0,212-0,086 UI/ml, respectivamente, (Tablas 3 y 4). Dichos valores evidencian que el medio escogido para las pruebas cuantitativas resultó adecuado. Resultados similares obtuvieron Keskar *et al.* (1992, empleando un medio de composición semejante para el cultivo de *Penicillium janthinellum*.

Tabla 3. Evaluación de las actividades enzimáticas (AE) de la endoglucanasa de 10 cepas de *Hyphomycetes* celulolíticos expresados en UI/mL, sus determinaciones específicas por proteínas (AEP) y por biomasa (AEB) a los 20 días de crecimiento en condiciones de agitación periódica

Cepa	AE (UI/mL)	AEP (UI/mg)	AEB (UI/mg)
<i>Penicillium</i> UC 1	2,20	2,94	0,86
<i>Penicillium</i> UC2	1,97	9,30	0,97
<i>Trichoderma</i> UC3	1,93	8,16	1,10
<i>Trichoderma</i> UC5	1,81	4,93	0,86
<i>Penicillium</i> UC6	2,15	4,05	0,58
<i>Aspergillus</i> UC7	1,88	5,42	0,55
<i>Trichoderma</i> UC8	1,92	4,46	0,99
<i>Penicillium</i> UC10	1,95	19,13	0,90
<i>Aspergillus</i> UC13	2,39	5,28	1,03
<i>Penicillium</i> UC 17	2,11	3,75	0,93

Tabla 4. Evaluación de las actividades enzimáticas (AE) de la exoglucanasa de 10 cepas de *Hyphomycetes* celulolíticos expresados en UI/ml, sus determinaciones específicas por proteínas (AEP) y por biomasa (AEB) a los 20 días de crecimiento en condiciones de agitación periódica

Cepa	AE (UI/mL)	AEP (UI/mg)	AEB (UI/mg)
<i>Penicillium</i> UC 1	0,132	0,92	0,14
<i>Penicillium</i> UC2	0,086	0,73	0,06
<i>Trichoderma</i> UC3	0,153	1,03	0,18
<i>Trichoderma</i> UC5	0,094	0,87	0,06
<i>Penicillium</i> UC6	0,142	1,21	0,12
<i>Aspergillus</i> UC7	0,128	0,68	0,07
<i>Trichoderma</i> UC8	0,114	0,93	0,09
<i>Penicillium</i> UC10	0,167	1,00	0,15
<i>Aspergillus</i> UC13	0,088	0,98	0,05
<i>Penicillium</i> UC 17	0,212	0,54	0,11

En cuanto a la actividad específica por proteínas (AEP), esta constituye una medida de la pureza de una enzima. Por tanto es de mucha importancia contar con cepas con elevadas actividades específicas. En nuestro estudio las cepas *Penicillium* sp. UC10 y *Penicillium* sp. UC2, mostraron los mayores niveles, con 19,3 y 9,0 UI/mg de proteínas referentes a endoglucanasas. Así mismo, la actividad específica por proteínas para las exoglucanasas quedó demostrada en la cepa *Penicillium* sp. UC6 (1,1UI/mg de proteína); no obstante Ceroni y Gutiérrez-Correa en 1988, encontraron valores similares en algunos cultivos fúngicos de su estudio.

Las actividades específicas por biomasa (AEB) de nuestras cepas se muestran también en las tablas 3 y 4. Este es otro de los parámetros a tener en cuenta en la selección de microorganismos celulolíticos, ya que nos relaciona la producción enzimática con el crecimiento microbiano. Nosotros determinamos que las cepas *Trichoderma* sp. UC 3 y *Aspergillus* sp. UC 13, fueron las de mejor actividad endoglucanasa con 1,0 y 1,3 UI/mg de micelio/ml, respectivamente, esto nos demuestra su habilidad para crecer en los sustratos celulósicos.

CONCLUSIONES

1. El aislamiento de *Hyphomycetes* celulolíticos mediante la acumulación de cultivos en

sustrato celulósico es un método directo y adecuado para trabajar muestras provenientes de zonas con altos niveles de degradación.

2. Las cepas que mostraron las mayores actividades enzimáticas fueron las pertenecientes al género *Penicillium*: UC 10 y UC 2, para la endoglucanasa, así como UC 6 para la exoglucanasa.

3. Los métodos cualitativo y cuantitativo mostraron relación entre sus resultados, lo que fue apreciable las tres cepas seleccionadas, las que ocasionaron mayor pérdida de peso del papel de filtro.

RECOMENDACIONES

- Determinar las actividades de otras enzimas hidrolíticas, que nos brinden información sobre el posible uso de algunas cepas en el control de hongos fitopatógenos.
- Concluir la clasificación de las cepas hasta el nivel de especie.

BIBLIOGRAFIA

Ceroni, A. y M. Gutiérrez-Correa (1988): "Producción de celulasas por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres" *Boletín de Lima* 55: 13-20.

Egorova, L.(1986): Hongos del suelo. Instituto de Biología del suelo. Academia de Ciencias. URSS.

Elad, Y. (2000): "Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action". *Crop Protection* 19:709-714.

Keskar, S. S (1992): "Cellulase production by *Penicillium janthinellum*". *World J. Microbiol. and Biotech* 8: 534-535.

Knauf, M. and M. Moniruzzaman (2004): "Lignocellulosic biomass processing: A perspective". *International Sugar Journal* 106(1263).

Lynd, L. R.; P. J. Weimer; W. H. van Zyl and I. S. Pretorius (2002): "Microbial cellulose utilization:

fundamentals and biotechnology". *Microb. Mol. Biol. Rev.* 66: 506-577.

Prasertsan, P. & S. Oi (1992): "Production of cellulolytic enzymes from fungi and use in the saccharification of palm cake and palm fibre". *World J. Microbiol. and Biotech.* 8: 536-538.

Rudakov, O. L. Hongos miceliales (1981): Biología y valor práctico. Instituto de Microbiología, Academia de Ciencias. URSS.

Saddler, J. (1982): "Screening of Highly cellulolytic fungi & the action of their cellulose enzyme systems". *Enzyme Microbiol. Technol.* 4:6 414.

Steiner, J.; C. Socha y Eyzaguirre (1991): Mejoramiento de la producción de celulasas por una cepa nativa de *Penicillium purpurogenum*. XI Congreso Latinoamericano de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. Resúmenes, pp. E 69.