

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

***CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA Y MOLECULAR DE
CEPAS DE HONGOS TERMÓFILOS: ESTUDIOS DE
CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE LIPASAS***

T E S I S

para obtener el grado de
Especialista en Biotecnología

PRESENTA

I.B.I. Ruth Angélica Peña Reyes

Asesor
Dr. Ernesto Favela Torres

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Ernesto Favela Torres', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat abstract.

México, D.F., a 4 de agosto del 2009.

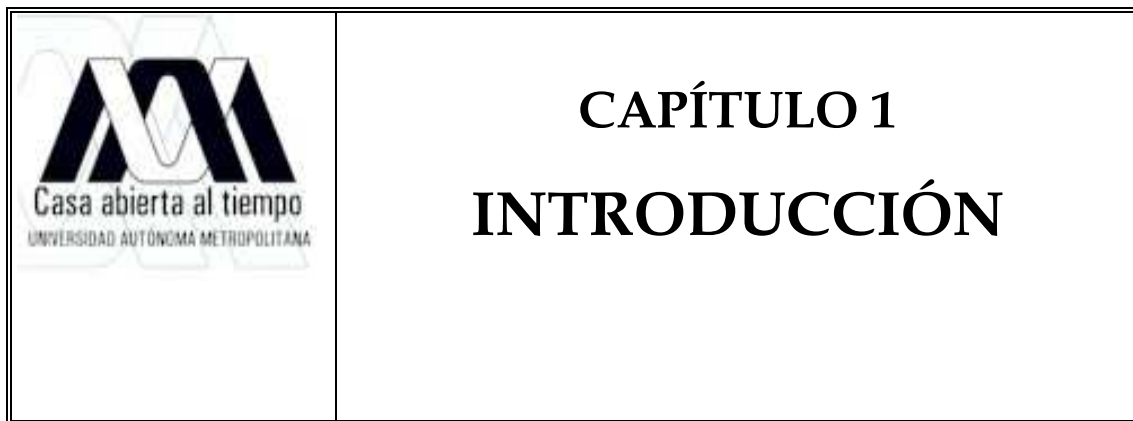
Índice

1. Introducción	7
1.1 El reino de los hongos	7
1.1.1 Generalidades	7
1.1.2 Morfología.....	8
1.1.3 Metabolismo.....	10
1.1.4 Reproducción.....	10
1.2 Identificación de hongos.....	12
1.2.1 Caracterización taxonómica.....	12
1.2.1 Caracterización molecular	12
1.3 Lipasas y Fermentación en medio sólido (FMS)	13
1.3.1 Producción de lipasas.....	14
1.3.2 Producción por fermentación en medio sólido	15
1.3.3 Aplicaciones de lipasas	16
2. Justificación, hipótesis y objetivos	20
2.1 Justificación.....	20
2.2 Hipótesis	20
2.3 Objetivos	20
2.3.1. Objetivo general.....	20
2.3.2. Objetivos específicos.....	21
3. Materiales y métodos.....	23
3.1. Identificación taxonómica.....	23
3.1.1 Preparación de las cajas de Petri para el microcultivo.....	23
3.1.2 Método para el microcultivo.....	23
3.1.3 Observación de estructuras fúngicas al microscopio.....	24

3.1.4 Microcultivo modificado.....	24
3.1.5 Cintillas.....	25
3.2. Identificación por Biología Molecular.....	25
3.2.1 Extracción DNA.....	25
3.3 Microorganismos.....	26
3.4 Medio de propagación de inóculo	27
Esporas como inóculo	27
Micelio como inóculo	27
3.5 Determinación del efecto de la temperatura en el crecimiento.....	27
3.6 Bioensayo para determinar la producción de lipasas.....	27
3.7 Producción de lipasas en fermentación en medio sólido (FMS).....	28
3.7.1 Tratamiento del soporte inerte.	28
3.7.2 Medio de cultivo para la producción de lipasas en FMS.....	28
3.7.3 Fermentación en Medio Sólido (FMS).....	28
3.7.4 Obtención del biocatalizador	29
3.7.5 Cuantificación de actividad lipasa	29
Método de <i>p</i> -NPB.....	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	33
4.1 Identificación taxonómica.....	33
□ 1.6aB.....	33
□ 1.7cB, 1.8cB y 2.1B.....	34
□ 4.4A.....	36
□ 1BcIV, 1.4eB, 1.6bB, 1.10aB, 2.2cB, 2.5aB, 2.7cB, 2.8bB y 2.9aC.....	37
4.2 Identificación molecular	38
4.3 Determinación del efecto de la temperatura en el crecimiento.....	39

Producción y caracterización de lipasas a partir de hongos termotolerantes por fermentación en medio sólido

4.4 Detección de actividad lipasa in vivo	40
4.5 Efecto del tipo y tamaño de inóculo en la producción de lipasas.....	43
4.6 Producción de biocatalizadores.....	45
4.7 Cuantificación de actividad lipasa	48
4.8 Cálculo tamaño de inóculo	49
7. Bibliografía	53
ANEXO A	58
A.1. Medios de cultivo y soluciones para la caracterización taxonómica y molecular	58
A.2 Tratamiento del soporte inerte	59
A.3 Curva estándar de ácidos grasos.....	60
A.4 Curva estándar de p-Nitrofenol.....	61



1. Introducción

1.1 El reino de los hongos

1.1.1 Generalidades

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos (se han descrito aproximadamente 500.000, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1,5 millones de especies) que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos. Un pequeño número son patógenos de animales y plantas.

Inicialmente, los hongos fueron clasificados dentro del Reino *Plantae* ya que fueron considerados organismos inmóviles presentando estructuras que se asientan firmemente en el sustrato sobre el que crecían. Sin embargo, cuando se ha aplicado la biología molecular en los estudios taxonómicos se ha observado que los hongos están más próximos al Reino *Animalia* que al *Plantae*. En el sistema de clasificación de los seres vivos en cinco reinos, los hongos se encuentran clasificados en el Reino *Fungi*, que se divide en cuatro *Phyla* denominados *Ascomycota* (el más extenso que comprende el 50% de los hongos conocidos y aproximadamente el 80% de los hongos patógenos, *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Chytridiomycota*, encontrándose en los tres primeros los hongos patógenos humanos. Los hongos en los que no se conoce su reproducción sexual, constituyen un grupo heterogéneo denominado Deuteromicetos, hongos imperfectos o mitospóricos, que representa el segundo grupo más numeroso y que también incluye patógenos humanos. (Alexopoulos et al., 1996; Burnett, 2003).

1.1.2 Morfología

Los hongos son organismos eucariotas típicos y poseen un núcleo que contiene varios cromosomas (siete en *Candida albicans*, ocho en *Aspergillus nidulans* y dieciséis en *Saccharomyces cerevisiae*) delimitado por una membrana nuclear, con nucléolo rico en ARN y orgánulos citoplásmicos, como mitocondrias, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas 80 S. El citoplasma se encuentra limitado por la membrana citoplásmica, que es una doble capa de lípidos que contiene proteínas y esteroides y que controla la permeabilidad celular y participa en la síntesis de la pared celular. La estructura de las células de los hongos es muy diferente de la de las bacterias que son organismos procariotas. Aunque comparten muchas estructuras, las células de los hongos se diferencian de las de las plantas en la composición de la pared celular y en que carecen de cloroplastos y clorofila, y de las humanas en que tienen pared celular y en la presencia de ergosterol en la membrana citoplásmica. Por el exterior de la membrana citoplásmica, presentan una pared celular que está compuesta fundamentalmente por polisacáridos y por diversas proteínas. Los polisacáridos más importantes son la quitina (polímero de n-acetil glucosamina), el manano (polímero de manosa) y el glucano (polímero de glucosa).

Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfologías: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme (Figura 1). Los hongos filamentosos (miceliares o mohos), representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos. En medios de cultivo sólidos y también sobre cualquier superficie en la que se desarrollen, por ejemplo frutas u otros alimentos, producen colonias algodonosas o pulverulentas que son muy características. Al microscopio óptico, los hongos filamentosos presentan unas estructuras tubulares, formadas por múltiples células, que se denominan hifas. En la mayoría de los hongos filamentosos, las hifas son tabicadas y presentan septos que delimitan las

Producción y caracterización de lipasas a partir de hongos termotolerantes por fermentación en medio sólido diferentes células. Sin embargo, los hongos del *Phylum Zygomycota* presentan hifas que carecen de septos y se denominan cenocíticas o sifonadas.

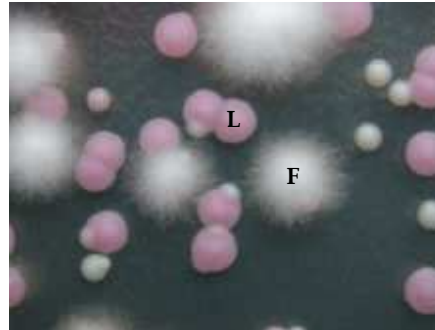


FIG. 1 Aspecto colonial de hongos que presentan crecimiento filamentosos (F) y levaduriforme (L).

Las hifas de los hongos tabicados suelen tener un diámetro inferior ($2-5 \mu\text{m}$) a las de los hongos sifonados ($10-15 \mu\text{m}$). Las hifas normalmente se desarrollan a partir de esporas, aunque también pueden originarse a partir de fragmentos de otras hifas, y crecen gracias al depósito de nuevos materiales en su extremo, ramificándose con mucha frecuencia hasta producir una maraña de filamentos que constituyen el micelio (Figura 2).

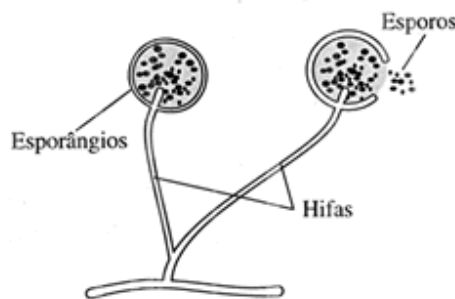


FIG.2 Detalle de una hifa exhibiendo un esporangio, sus hifas y sus esporangios.

En una colonia de un hongo filamentosos se produce una diferenciación en las funciones del micelio, de tal forma que el micelio vegetativo penetra en el sustrato para obtener los nutrientes, mientras que el micelio aéreo se proyecta hacia el exterior de la colonia y produce las estructuras reproductoras.

Los hongos que presentan crecimiento levaduriforme generalmente dan lugar a colonias lisas que recuerdan a las bacterianas en medios de cultivo sólidos. Dichas colonias están formadas por agregados de células individuales (5-30 μm) denominadas levaduras. Los hongos levaduriformes se dividen por gemación o por fisión binaria.

1.1.3 Metabolismo

Los hongos obtienen los nutrientes por absorción y tienen un metabolismo quimioheterótrofo, ya que obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Este hecho condiciona su modo de vida, ya que en la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado del carbono y otros elementos naturales o como patógenos oportunistas de los animales y plantas. Los hongos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de potentes exoenzimas que en algunos casos pueden servirles como factores de virulencia en el hospedador. (Bial - Arístegui, 2002).

En el laboratorio, los hongos crecen fácilmente en la mayoría de los medios de cultivo, necesitando una fuente de carbono orgánica e iones amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno. Los hongos filamentosos son aerobios y los levaduriformes anaerobios facultativos.

1.1.4 Reproducción

La mayoría de los hongos presentan reproducción sexual y asexual. El estado sexual se denomina teleomorfo o meiospórico y el asexual anamorfo o mitospórico. Es relativamente común que un mismo hongo tenga dos nombres, el del estado anamorfo y el del estado teleomorfo, ya que suelen haberse descubierto y nombrado de forma independiente. En un grupo importante de hongos solamente

se conoce la reproducción asexual, bien porque no se conocen las condiciones adecuadas para que se desarrolle la forma sexual o porque ésta se ha perdido a lo largo de la evolución. Aunque la reproducción asexual puede lograrse por fragmentación de las hifas, ya que cada fragmento puede producir una nueva colonia, normalmente los hongos se reproducen, tanto sexual como asexualmente, por medio de esporas. Los hongos producen millones de esporas, cada una con la capacidad para desarrollar una nueva colonia. Las esporas sexuales se producen tras la fusión de los núcleos de dos hifas sexualmente compatibles o de dos levaduras y posterior meiosis. La morfología de las esporas sexuales es muy variada y tiene gran interés para la identificación fúngica, ya que presentan diferencias características. Los hongos del *Phylum Basidiomycota* producen basidiosporas en el exterior de una estructura denominada basidio, los *Ascomycota* producen ascosporas en el interior de una estructura en forma de saco denominada asco y los *Zygomycota* producen zigosporas.

Las esporas asexuales generalmente se producen en hifas especializadas y se denominan de diferente forma según su morfología. Los *Zygomycota* producen esporangiosporas en el interior de una estructura en forma de saco denominada esporangio. Los *Ascomycota* y, en menor grado, los *Basidiomycota*, producen esporas asexuales denominadas conidios que se desarrollan a partir de una estructura denominada conidióforo.

En décadas recientes, este grupo biológico ha despertado el interés de taxónomos, morfológicos, genetistas y ecólogos, entre otros especialistas, por ser excelentes sujetos y modelos de investigación. Presentan una notable diversidad de formas, estructuras, tamaños, colores y olores; se encuentran en todos los tipos de ecosistemas, donde muestran además variedad en sus hábitos y ciclos de vida (Romero, 2006).

1.2 Identificación de hongos

1.2.1 Caracterización taxonómica

Para el examen microscópico de los hongos pueden usarse diferentes métodos. Uno de éstos es el microcultivo o cultivo en portaobjetos. Aunque esta técnica es laboriosa, es ideal para preservar y observar las características microscópicas de las estructuras completas de diversos hongos, lo que permite hacer su identificación definitiva y obtener preparaciones permanentes o semi-permanentes, este método involucra la resiembra o subcultivo de las colonias obtenidas en el cultivo primario.

Para hacer las resiembras debe tomarse una pequeña porción de la colonia con una asa con el extremo doblado en ángulo recto, flameada y enfriada, y sembrarse en la superficie de otro medio de cultivo. Para hacer esta resiembra, el asa debe hundirse en el agar de modo que una parte del inóculo quede por debajo de la superficie del agar. De preferencia debe tomarse para este subcultivo un área de crecimiento primario donde la esporulación sea activa. En el caso de estos cultivos secundarios la observación del crecimiento debe hacerse diariamente ya que habitualmente es más rápido que en el cultivo primario (González, 1995).

1.2.1 Caracterización molecular

La aplicación de marcadores moleculares, permite clarificar las relaciones genéticas de los grupos de hongos fitopatógenos (O'Neill *et al.*, 1997), principalmente cuando los criterios morfológicos de clasificación son variables. El uso de marcadores moleculares permite la identificación de organismos de forma viable y con mayor certeza por estar basado en la composición del ADN.

La amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos tiene una alta sensibilidad para discriminar entre diferentes aislados. La utilización de

Producción y caracterización de lipasas a partir de hongos termotolerantes por fermentación en medio sólido

marcadores moleculares permite además procesar un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo (Alves *et al.*, 2002).

Los análisis moleculares se utilizan en la identificación de hongos, especialmente para géneros dentro de los cuales las especies tienen características morfológicas coincidentes entre ellas. La detección o diagnóstico molecular podría ser más útil a partir de tejido vegetal y/o muestras de suelo directamente, sin embargo, se necesitan de mayores avances, principalmente en el desarrollo de técnicas más confiables y con mayor disponibilidad para la extracción de ADN y/o ARN de tejido vegetal o suelo, para la aplicación práctica de estas tecnologías en laboratorios de diagnóstico (Martin *et al.*, 2000).

Análisis de la región Espaciadora Transcriptora Interna (ITS) del ADN ribosomal rDNA

Los genes del ADN ribosomal (rDNA) en los organismos eucariontes usualmente existen como elementos en bloques repetidos. Cada unidad repetida se compone de secuencias altamente conservadas de una longitud cercana a 6Kb, que contiene además una pequeña región espaciadora altamente polimórfica (ITS por las siglas en inglés) utilizada para estudios filogenéticos y taxonómicos. Los módulos repetidos de rDNA pueden ocurrir en uno o varios cromosomas y el número de copias varía de acuerdo al genoma. La ocurrencia de estas múltiples copias de rDNA abre la posibilidad de mayores regiones polimórficas intraindividuales (Avise, 1994).

1.3 Lipasas y Fermentación en medio sólido (FMS)

Las lipasas (EC 3. 1. 1. 3) hidrolizan triglicéridos a ácidos grasos y glicerol, y bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa. Estas enzimas en solventes

Producción y caracterización de lipasas a partir de hongos termotolerantes por fermentación en medio sólido

orgánicos pueden catalizar varias reacciones que incluyen: esterificación, transesterificación, acilación, aminólisis, alcoholólisis, entre otras (**Rohit y col., 2001**).

Estas enzimas hidrolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y están presentes en los procesos metabólicos degradativos de algunas plantas y animales. Ellas son producidas por un gran número de microorganismos a partir de los cuales se obtienen usualmente para fines comerciales, un ejemplo típico lo son las lipasas producidas por los hongos *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* . (**Coca, 2001**).

Entre las características más importantes para la aplicación industrial de estas enzimas, pueden mencionarse las siguientes: 1) son estables en solventes orgánicos no polares, 2) no requieren cofactores, lo cual hace su empleo más sencillo y económico, 3) son las enzimas más usadas en reacciones de síntesis, y 4) las reacciones que catalizan, se caracterizan por una exquisita especificidad (topo-, regio- y enantio-selectividad). Sin embargo, uno de los problemas que limita su uso industrial, es que la presencia de solventes reduce la actividad de la enzima, por lo que debe usarse en concentraciones mayores, para llevar a cabo catálisis a velocidades razonables.

1.3.1 Producción de lipasas

Las lipasas son enzimas que pueden ser producidas por la mayoría de los organismos del reino microbiano, vegetal y animal. Generalmente, se obtienen empleando cultivos de microorganismos, como bacterias y hongos, siendo los últimos una de las fuentes más importantes a nivel industrial, porque las producen de forma extracelular, facilitando así su extracción y purificación (**Beys, 2005**).

1.3.2 Producción por fermentación en medio sólido

Las lipasas fúngicas se producen habitualmente en procesos de fermentación sumergida, con el uso de medios de cultivo complejos que incluyen ingredientes tales como vitaminas, aminoácidos y fuentes complejas de compuestos orgánicos, como el extracto de levadura, peptona, y semillas. Aproximadamente el 90% de todas las enzimas industriales son producidas por este sistema de fermentación, y la mayoría de los microorganismos utilizados son el resultado de una manipulación genética. Por otra parte, casi todas estas enzimas pueden ser producidas también en fermentación en medio sólido usando microorganismos silvestres (Hölker, 2004).

La fermentación en estado sólido (FMS) se define como el cultivo en ausencia (o casi ausencia) de agua libre. Sin embargo, los sustratos deben poseer suficiente humedad para soportar el crecimiento y el metabolismo de microorganismos. Los soportes empleados pueden ser inertes, o bien, sustratos orgánicos insolubles, que además, pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía (Hölker, 2004, Pandey, 2003).

Entre las ventajas más importantes de las FMS, es la posibilidad de obtener una mayor producción de enzimas en menores tiempos de fermentación, bajos costos operativos y de capital de inversión (Castilho, 2000), disminución de volúmenes de operación, equipos y medios de cultivo sencillos, proceso de recuperación más fácil y menor cantidad de efluentes (Hölker, 2004, Castilho, 2000). Además, en la mayoría de los procesos de FMS, las enzimas son producidas extracelularmente.

A pesar de las numerosas ventajas de este tipo de cultivo sobre los cultivos sumergidos, las principales limitaciones de su uso a gran escala se relacionan con la dificultad para controlar el proceso; particularmente en términos de humedad y

temperatura. Esto se debe principalmente al conflicto para mantener el proceso en condiciones isotérmicas. La liberación de calor metabólico, relacionada con la baja capacidad para transferir el calor de los materiales utilizados como sustrato y/o soporte, impiden la remoción conductiva y/o convectiva del calor metabólico. La acumulación de calor metabólico en el seno de la fermentación, conduce a la inactivación de los microorganismos mesófilos; por lo que, el uso de hongos termófilos, cuya máxima tasa específica de crecimiento se alcanza a temperaturas de incubación comprendidas entre 40 y 50°C, permitirá reducir considerablemente los efectos negativos asociados de la acumulación de calor metabólico sobre su crecimiento (**Hölker, 2004**).

El uso de soportes inertes para los procesos de FMS ha permitido evaluar y optimizar la composición del medio de cultivo para la producción de enzimas y metabolitos; además de que permite la evaluación cuantitativa de los parámetros relacionados con el metabolismo microbiano (crecimiento, consumo de sustrato y formación de productos), así como su posible utilización como biocatalizadores en sistemas no convencionales (solventes orgánicos y/o biocatálisis en fase gaseosa).

1.3.3 Aplicaciones de lipasas

Sus aplicaciones se encuentran en muchas áreas de la biotecnología debido a su capacidad para catalizar diversas reacciones de hidrólisis y síntesis, propiedades enantioselectivas, baja especificidad de sustratos, y estabilidad en diversas condiciones de temperatura y pH (**Beys, 2005**).

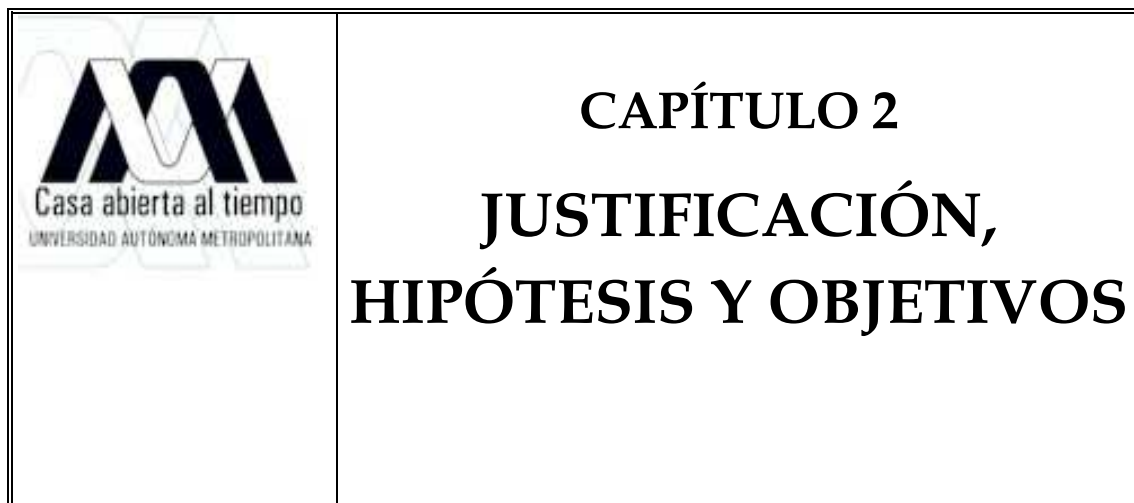
El interés por dichas enzimas se ha acrecentado en los últimos años debido a sus diversas propiedades catalíticas. Ello ha causado que se conviertan en catalizadores valiosos en diferentes aplicaciones industriales, tales como: aditivos en la formulación de detergentes, en la industria alimenticia para la elaboración de

productos dietéticos con bajo nivel de grasas y colesterol, en la industria del papel con el objetivo de eliminar la cera de la pulpa del papel, en la industria farmacéutica en la obtención de moléculas bioactivas, así como en procesos de síntesis química para la obtención de compuestos ópticamente puros (**Hernaiz, 1999**) modificación de grasas y otros lípidos por hidrólisis y esterificación (**Kazlauskas, 1994**).

La principal aplicación de las lipasas se ubica en la industria de los detergentes. Actualmente, también se han incorporado en procesos de la industria alimentaria, para la producción de aromas y en la maduración de quesos; en agroquímica para la producción de insecticidas y otros pesticidas. Sin embargo, su incursión más importante, ha sido en la industria farmacéutica para la resolución de mezclas racémicas de fármacos y sus precursores (naxopreno e ibuprofeno). Otra aplicación importante es la modificación de grasas y aceites, así como la síntesis de biosurfactantes, entre otras (**Van den Burg, 2003**).

La mayoría de las enzimas usadas actualmente en biotransformaciones se obtiene de organismos mesófilos y, a pesar de sus muchas ventajas, su aplicación está restringida a sus límites de estabilidad a la temperatura, pH y fuerza iónica. En respuesta a estas restricciones, los microorganismos termófilos están siendo utilizados para la producción de enzimas termoestables con aplicaciones industriales, tales como, amilasas, proteasas, xilanasas y lipasas, con especial énfasis en la búsqueda e investigación de estas últimas. La termoestabilidad y la actividad óptima a altas temperaturas son propiedades inherentes de las enzimas sintetizadas por micro-organismos termófilos. Diversos factores estructurales se relacionan con la estabilidad de las proteínas termófilas (**Maheshwari, 2000**).

Se ha observado que tanto las enzimas termofílicas como las mesofílicas presentan niveles similares de hidrofobicidad, compactación, estados oligoméricos e interacciones de superficies polares y no polares; mientras que los puentes salinos y los puentes de hidrógeno aumentan en la mayoría de las enzimas termofílicas.



2. Justificación, hipótesis y objetivos

2.1 Justificación

Los microorganismos extremófilos han despertado un gran interés durante los últimos años, debido a la elevada estabilidad térmica, resistencia a desnaturalizantes químicos y pHs extremos de sus enzimas, que las hacen especialmente adecuadas para su uso en procesos de biotransformación en condiciones extremas de pH, salinidad y temperatura. Los microorganismos termófilos crecen a temperaturas superiores a 45°C, y en algunos casos (hipertermófilos) incluso por encima de 90°C. La disponibilidad de lipasas y esterases termofílicas permitiría operar a altas temperaturas, con el lógico incremento de la velocidad de reacción y una más fácil solubilización de los sustratos, aspecto que constituye con frecuencia un factor limitante en algunas aplicaciones de este tipo de enzimas (p.ej. reacciones de síntesis en medios con bajo contenido en agua).

2.2 Hipótesis

No se q poner!!!

2.3 Objetivos

2.3.1. Objetivo general

Identificar hongos termófilos productores de lipasas y obtención de parámetros cinéticos.

2.3.2. Objetivos específicos

- Llevar a cabo el análisis taxonómico y molecular para caracterizar a los hongos.
- Seleccionar las cepas termotolerantes (colección de 15 cepas)
- Seleccionar las cepas productoras de lipasas.
- Estimar parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas seleccionadas y producir los biocatalizadores en FMS.



3. Materiales y métodos

3.1. Identificación taxonómica

Se preparó una caja de Petri con medio de cultivo PDA.

3.1.1 Preparación de las cajas de Petri para el microcultivo

Se cortó un trozo de varilla de vidrio de aproximadamente 12 cm de largo, se calentó por el centro a la flama del mechero (zona azul) y cuando dicha zona estuvo suave se tomó la varilla de los extremos y se dobló hasta formar un ángulo de 30 a 40° y se dejó enfriar.

Se colocó la varilla doblada, un poco de algodón, un portaobjetos y dos cubreobjetos perfectamente limpios dentro de una caja de Petri. Se metió a esterilizar la caja previamente envuelta en papel a 121°C.

3.1.2 Método para el microcultivo

Con ayuda de unas pinzas estériles se colocó el portaobjetos sobre la varilla de vidrio.

En la base de la caja con medio PDA se hizo una cuadrícula con cuadros de aproximadamente 1 cm² y con ayuda de una hoja de bisturí, previamente estéril, se cortó el agar siguiendo las líneas marcadas en la base de la caja de Petri. Con el mismo bisturí se tomó un cuadro de agar y se colocó en el centro del portaobjetos de la caja para el microcultivo

Con el asa doblada en ángulo recto, se tomó una pequeña porción de la colonia del hongo que se va a sembrar y se inoculó por contacto en los 4 lados del cuadro de agar, después con ayuda de unas pinzas previamente esterilizadas se colocó el cubreobjetos sobre el cuadro de agar ya inoculado y con el mango del asa se

Producción y caracterización de lipasas a partir de hongos termotolerantes por fermentación en medio sólido

presiona ligeramente sobre el cubre objetos con el fin de que éste se adhiera al agar. Se colocaron 10 mL de glicerol en el algodón, teniendo en cuenta de no mojar el microcultivo.

Se incubó a 45°C y cada 24 horas se revisaba el crecimiento y esporulación con microscopio óptico.

3.1.3 Observación de estructuras fúngicas al microscopio

En el centro de un portaobjetos limpio se colocó una gota de azul de algodón de lactofenol. Con ayuda de unas pinzas estériles se retiró con mucho cuidado el cubreobjetos del microcultivo y se colocó sobre la gota de colorante en el portaobjetos y presiono ligeramente sobre el cubreobjetos para eliminar las burbujas de aire.

Se observó al microscopio **Olympus XXX** con el objetivo de 10x y 40x y se tomaron las fotografías con la cámara Canon PowerShot S5 IS.

Para conservar la preparación, se sellaron los lados del cubreobjetos con esmalte para uñas incoloro.

3.1.4 Microcultivo modificado

Debido a que el agar se deshidratava muy rápido, se tuvo que modificar la técnica de microcultivo.

No se utilizaron cajas de Petri con varilla de vidrio, en su lugar se utilizaron cajas de Petri con medio PDA a las cuales se les colocaba encima 3 círculos de agar obtenidos con un pequeño tubo de cristal. Dichos círculos fueron inoculados por contacto y después con ayuda de unas pinzas estériles se les coloco un cubre objetos encima.

Se metieron a incubar a 45°C y se observó periódicamente el crecimiento. Después de tres días se observó en el microscopio **Olympus xxx** utilizando la misma metodología que en el microcultivo.

3.1.5 Cintillas

Es un método utilizado para observar estructuras fúngicas, partiendo de una caja de Petri en donde se encuentre el hongo que se desea observar.

Se tomó un pequeño trozo de cinta adhesiva, se hizo un dobléz de una tira de 4 cm con el lado adhesivo hacia afuera y se sostuvo entre los dedos pulgar e índice. El lado adhesivo se presiona firmemente contra la superficie de la colonia del hongo. El micelio aéreo se adhiere a la superficie y puede separarse del resto. Después se colocó la cinta sobre un portaobjetos el cual previamente tenía una gota de azul de lactofenol y se procedió a observar en el microscopio.

3.2. Identificación por Biología Molecular

3.2.1 Extracción DNA

Fueron sembradas las cepas en tubos Corning con 5 mL de medio YPD e incubé por dos días a 45°C con agitación de 180 rpm.

Se recuperó el pellet celular mediante centrifugación a 13,000 rpm por 5 min, el cual se trituró en un mortero con nitrógeno líquido. Los **restos** se colocaron en un tubo Eppendorf al cual se agregó 200µL de cloroformo-fenol, 1 mL de Tris-EDTA y 500 µL de buffer A. Se realizaron 5 ciclos en el vortex (1 minuto en vortex mas un minuto en hielo). Se agregó 200 µL de cloroformo-fenol y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos.

Producción y caracterización de lipasas a partir de hongos termotolerantes por fermentación en medio sólido

Se recuperó el sobrenadante y se agregó un volumen de etanol al 100% y 0.1 volúmenes de acetato de amonio. Se incubó 30 min a -20°C, se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm y se agregó un volumen de etanol al 70%. Se agitó en el vortex y se volvió a centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos, para después decantar y dejar secar los Eppendorf. Se resuspendió el pellet en 40 µL de tris-EDTA.

Se cargaron 10 µL de una muestra de DNA y se corrió un gel de agarosa al 0.8% para verificar la integridad de la muestra, la calidad de la muestra resultó ser buena para realizar un PCR.

Con 2 µL de la muestra de DNA se procedió a realizar una amplificación de una región específica de la región de DNA genómico que codifica para la subunidad pequeña del RNA ribosomal, utilizando los oligonucleótidos 463 y 464 utilizados en otras investigaciones (**Valinsky et. Al. 2002**) con la taq polimerasa platinum de alta fidelidad de invitrogen bajo las condiciones del fabricante. La amplificación se realizó durante 28 ciclos de 95°C 30 segundos, 55°C 30 segundos y 72 °C durante dos minutos, seguido de un ciclo de 72°C durante 7 minutos.

Con esta ampliación se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 800 pb que era el tamaño esperado. Dicha ampliación se mandó secuenciar al LANGEBIO en el CINVESTAV Irapuato.

3.3 Microorganismos

Se utilizaron como modelo tres cepas de hongos termotolerantes pertenecientes al género *Rhizopus sp.*: 13a, 19 y 43aIV; además de 15 cepas de hongos termotolerantes provenientes del laboratorio de Bioprocesos de la Universidad de Guadalajara las cuales fueron extraídas del bagazo de caña. Los microorganismos se conservaron en tubos de ensaye inclinados con medio PDA.

3.4 Medio de propagación de inóculo

Esporas como inóculo

Para la producción de esporas se usaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDA. Se inocularon con 0.5 mL de una suspensión de esporas y se incubaron 7d a 45°C. Posteriormente, se adicionaron de 20 a 50 mL de solución de Tween 80 0.01% y se resuspendieron las esporas con un agitador magnético. La concentración de esporas en la suspensión se determinó con una cámara de Neubauer.

Micelio como inóculo

Para la producción del micelio se prepararon 3 cajas de Petri con 20 mL de PDA. Cada caja se inoculó con un disco de micelio de 0.6 cm de diámetro y se incubaron a 45°C. De la periferia de la colonia se cosecharon discos de micelio de 0.6 cm de diámetro. Los discos se suspendieron en 50 mL de medio de cultivo con perlas de ebullición. Se agitó en vortex durante 2 min. La suspensión resultante fue usada como inóculo.

3.5 Determinación del efecto de la temperatura en el crecimiento

Se prepararon cajas de Petri con medio PDA inoculadas con un disco de micelio sobre el medio. Se incubaron a 30, 45 Y 50°C durante 7 días. Las cepas que crecieron a temperaturas igual o mayor a 45°C fueron seleccionadas.

3.6 Bioensayo para determinar la producción de lipasas.

Se prepararon cajas de Petri con medio PDA adicionado de aceite de oliva (20 g/L) y 10 mL de una solución de Rhodamina B a 1mg/mL. Antes de ser esterilizado, el medio se homogeneizó en Ultra.Turrax por 10 min a 20,000 rpm. Se inoculó con un dsico de micelio en el centro del medio y se incubó a 45°C durante 7 días. La resencia de actividad lipasa se evidenció bajo luz UV por la fluorescencia del complejo fluorescente de la Rhodamina B en presencia de actividad lipasa.

3.7 Producción de lipasas en fermentación en medio sólido (FMS)

3.7.1 Tratamiento del soporte inerte.

Se empleó agrolita como soporte inerte para la fermentación. La agrolita se tamizó en mallas del no. 16 y 20 (Anexo A2) para obtener el tamaño de partícula, de 1.19 y 0.80 mm respectivamente. Este material fue lavado con agua corriente dos veces, y una tercera con agua destilada caliente, se escurrió el exceso de agua y posteriormente se dejó secar durante 24 horas a una temperatura constante de 60 °C.

3.7.2 Medio de cultivo para la producción de lipasas en FMS

El soporte inerte se impregnó con el medio de cultivo, cuya composición es la siguiente (g/L): Urea, 4; aceite de oliva, 40; lactosa, 5; K₂HPO₄, 5; MgSO₄·7H₂O, 1; Alcohol polivinílico, 1.6; solución de oligoelementos, 4 mL/L, pH inicial 6.5. El medio de cultivo se emulsificó en homogenizador Ultra-Turrax a 20,000 rpm durante 10 min. La composición de la solución de oligoelementos es la siguiente (g/L): EDTA, 10; MnCl₂·4H₂O, 1.98; CoSO₄·7H₂O, 2.81; CaCl₂·2H₂O, 1.47; CuCl₂·2H₂O, 0.17; ZnSO₄·7H₂O, 0.29. El pH de la solución se ajustó a 4.0.

3.7.3 Fermentación en Medio Sólido (FMS)

El soporte inerte (50% malla 16 y 50% malla 20) fue impregnado con el medio de cultivo conservando una relación de 3g/g.s.i, posteriormente se inoculó y esta mezcla se colocó en columnas de fermentación ($\varnothing_i = 2.5$ cm y L= 20 cm); mismas que se incubaron en las siguientes condiciones: Tasa de aireación, 40 mL/min; pH_i, 6.5; Humedad inicial, 55%; 20 g de materia húmeda por columna a una temperatura de 45°C.

El crecimiento del cultivo se monitoreó de manera indirecta a través de la evolución en la producción de CO₂, por lo cual, las columnas de fermentación fueron conectadas a un dispositivo descrito por Saucedo-Castañeda (1991). En base

Producción y caracterización de lipasas a partir de hongos termotolerantes por fermentación en medio sólido

a esta información, las fermentaciones se detuvieron cuando se alcanzó la máxima velocidad de producción de CO₂.

3.7.4 Obtención del biocatalizador

La materia fermentada fue deshidratada por una corriente de aire (1 L aire seco por min por gramo de materia húmeda inicial) para así poder obtener los biocatalizadores, además se cuantificó el contenido de humedad (%) en una termobalanza (OHAUS® MB45)

3.7.5 Cuantificación de actividad lipasa

La actividad lipasa se determinó por el método del oleato de cobre y por la hidrólisis de pnitrofenobutirato. A continuación se describen los siguientes métodos.

Método de oleato de cobre. El método consiste en la cuantificación de los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis de los triglicéridos del aceite de oliva por las lipasas, los cuales en presencia de iones de cobre dan origen a la formación de una sal colorida (verde esmeralda) y cuya intensidad fue leída en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 715 nm. **(Rodríguez y col., 2006).**

La concentración de los ácidos grasos presentes en la muestra de reacción se obtuvo a partir de la ecuación de la curva estándar de ácido oleico (0-20) mM (Anexo A3), el cual, representa aproximadamente el 80% de la composición del aceite de oliva **(Badui, 1999).**

Para mantener constante el pH de catálisis, la fase continua de la emulsión consistió de una solución amortiguadora 100 mM (pH 8.0, 45°C) Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ (los iones Ca⁺² estabilizan la estructura de la lipasa), 0.25% de alcohol polivinílico (PVA) como agente emulsificante y 0.3% de goma arábiga como agente estabilizante.

Para preparar la emulsión se pesaron 20 g de aceite de oliva y se le agregaron 100 mL de la solución amortiguadora descrita anteriormente. Este sistema fue

homogeneizado empleando un equipo Ultra-Turrax a 10 000 durante 10 min a 45°C.

Se preparó una solución de acetato de cobre (50 g/L), el cual fue disuelto en agua destilada agitando durante 30 min. Posteriormente, se ajustó el pH a 6.1 con Piridina.

Se pesaron 40 mg del biocatalizador en tubos cónicos (Corning®) de 15 mL, a los cuales se adicionaron 3 mL de emulsión (45 °C), se agitaron en vórtex e incubaron durante 15 min a 45°C. Al fin de este periodo, se adicionaron 0.6 mL de HCl 6M con agitación en vórtex. Posteriormente, se agregaron 3 mL de heptano y se mezclaron con agitación en vórtex durante 30 s con la finalidad de extraer los ácidos grasos liberados del sistema de reacción. Las muestras se centrifugaron a 7 000 rpm por 10 min a 4°C y fueron extraídos 2.5 mL de fase orgánica, a los cuales se adicionaron 0.3 mL del reactivo de acetato de cobre-piridina seguido de agitación en vórtex por 30 s. Finalmente se leyó la absorbancia a 715 nm. Los análisis se realizaron por duplicado.

Por otra parte, para descartar la concentración de los ácidos grasos libres provenientes del aceite de oliva empleado como sustrato, así como de la muestra de fermentación, se realizó la determinación de un blanco. A 3 mL de la emulsión se adicionaron 0.6 mL de HCl 6M para acidificar el medio de reacción que fue incubado por 15 min a 45°C, posteriormente se agregaron 40 mg de biocatalizador enzimático y se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

Método de *p*-NPB

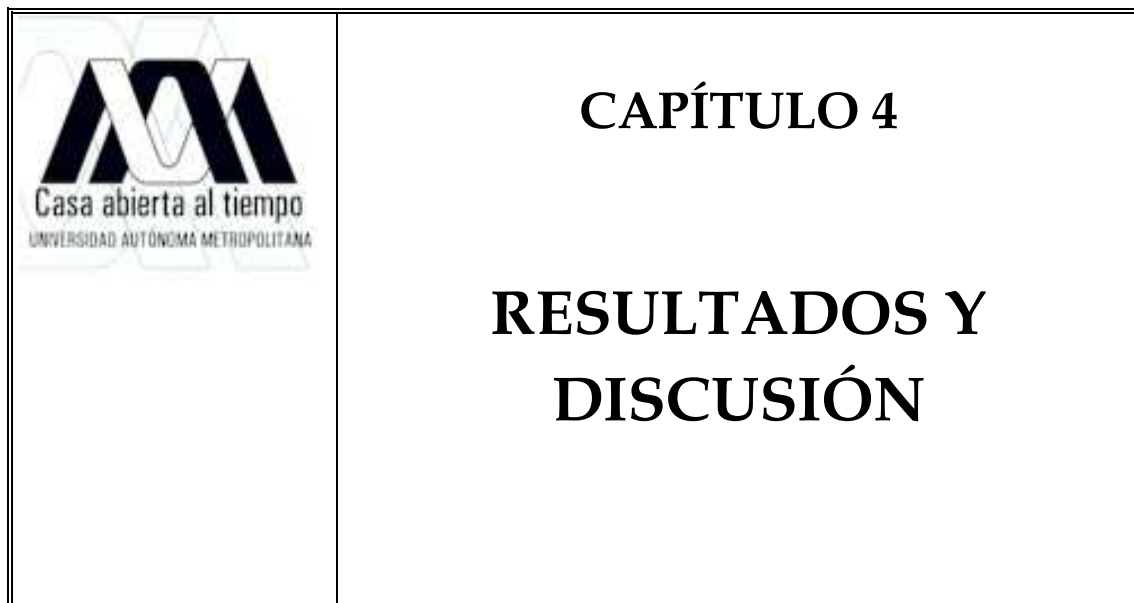
Para poder realizar esta prueba necesitamos obtener el extracto enzimático a partir de nuestros biocatalizadores. Se pone en agitación suave un gramo de biocatalizador con 10 mL de buffer de fosfatos 25 mM pH 7 por 30 minutos y después se filtra con papel Whatman no. 1 (se obtiene volumen 1 V₁); la agrolita se

vuelve a suspender en 10 mL de agrolita y se agita suavemente por 15 minutos nuevamente, para ser filtrado nuevamente con papel Whatman no. 1 (obteniéndose V_2). Se juntan ambos volúmenes (V_T) y se filtran con papel Whatman no. 41. El filtrado resultante se refrigera en alícuotas de 150 μ L en tubos Eppendor a 4°C.

La determinación se llevó a cabo midiendo el incremento en absorbancia a 348 nm (punto isobéptico del *p*NF) producido por la liberación de *p*-nitrofenol (*p*NF) en la hidrólisis de 0.4 mM *p*-nitrofenil butirato (*p*NFB) en un amortiguador 25 mM de fosfatos (pH 7) y 25 °C. Para iniciar la reacción, 0.1-0.2 mL del extracto o suspensión enzimática se adicionaron a 2.5 mL de la solución de sustrato. Una unidad de actividad (UI) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 mmol de *p*NF por minuto bajo las condiciones descritas con anterioridad.

El coeficiente de extinción molar (ϵ) estimado a partir de una curva estándar de *p*NF, construida en un rango de concentración de 0 a 100 mM y bajo las condiciones de ensayo descritas con anterioridad fue de 6.8289 $\text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}$ (Anexo A4).

Para llevar a cabo la reacción de hidrólisis de *p*-NPB se utilizó como sustrato una solución conformada por 800 μ L de sol. Patrón de *p*-NPB por cada 100 mL de buffer Fosfatos 25 mM pH 7, la cual es elaborada momentos antes de llevar a cabo la medición, ya que es muy sensible a la temperatura y se puede hidrolizar; por lo que se tiene que mantener en refrigeración hasta el momento en que se va a utilizar.



4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Identificación taxonómica

- **1.6aB:** Género: *Aspergillus*

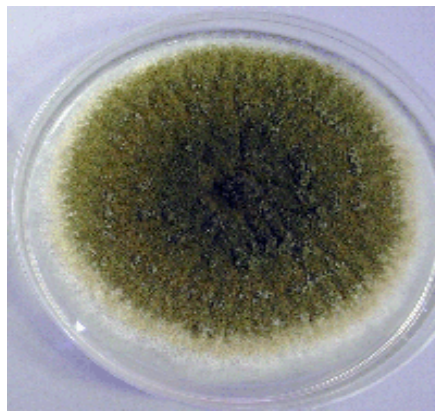


FIG. 3 Colonia de *Aspergillus fumigatus*.

Morfología macroscópica: Colonia lanosa de rápido crecimiento, al principio blanca, que se torna amarilla y se va oscureciendo desde color café hasta llegar a negro. Su reverso es blanquecino o amarillento. Textura granular de color negro.



FIG. 4 a. *Aspergillus fumigatus* tomada de la colección George Barron's Website on Fungi. b. Cepa 1.6aB, objetivo 40x.

Producción y caracterización de lipasas a partir de hongos termotolerantes por fermentación en medio sólido

Morfología microscópica: Hifa diferenciada que soporta la cabeza conidial y que surge como una ramificación perpendicular del micelio. Dicha cabeza es biseriada, las métulas y fiálides (primarias y secundarias) cubren radialmente la vesícula. Hay también restos de conidios alrededor de las fiálides.

- **1.7cB, 1.8cB y 2.1B:** Posibles géneros: *Rhizopus* o *mucor*



FIG. 5 Colonia de *Rhizopus* o *mucor*

Morfología macroscópica: Micelio algodonoso de crecimiento rápido, blanco al principio y posteriormente gris, con reverso blanquecino.



FIG. 6 a. *Rhizopus* spp. tomada de la colección George Barron's Website on Fungi. b. Cepa 1.7cB, objetivo 40x.



FIG. 7 a. *Rhizopus spp.* tomada de la colección George Barron's Website on Fungi. b. Cepa 1.8c, objetivo 40x.

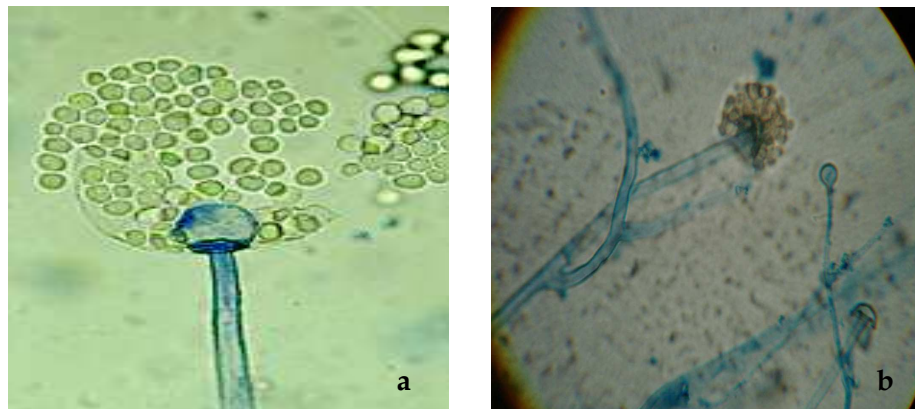


FIG. 8 a. *Mucor spp.* tomada de la colección George Barron's Website on Fungi. b. Cepa 2.1B, objetivo 40x.

Morfología microscópica: Hifas aceptadas, con esporangióforos largos, frecuentementramificados y esporangios redondos, terminales llenos de abundantes esporangiosporas hialinas. La pared del esporangio se rompe fácilmente para liberar las esporas, que son redondas o ligeramente oblongas. La columela queda expuesta al romperse el esporangio. La estructura reproductiva sexual corresponde a un cigosporangio.

▪ **4.4A:** Género: *Helicosporium*



FIG. 9 Colonia de *Helicosporium*

Morfología macroscópica: Colonia de lento crecimiento. Textura aterciopelada amarilla, con producción de exudados naranjas.

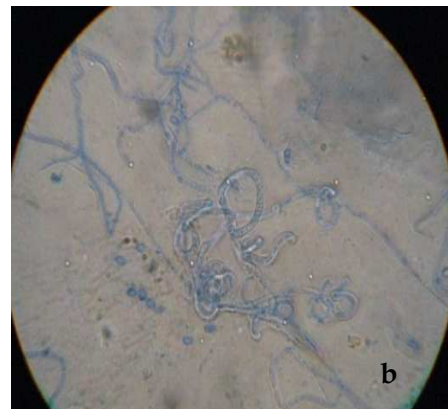


FIG. 10 a. *Helicosporium* spp. tomada de la colección [George Barron's Website on Fungi](#). b. Cepa 4.4A, objetivo 40x.

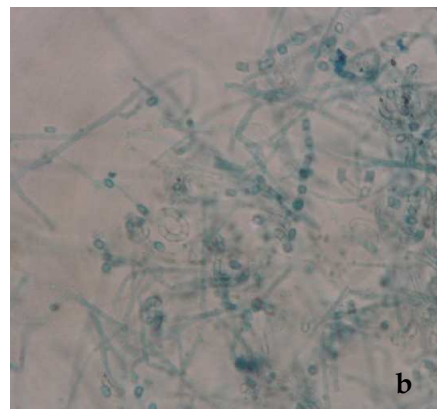
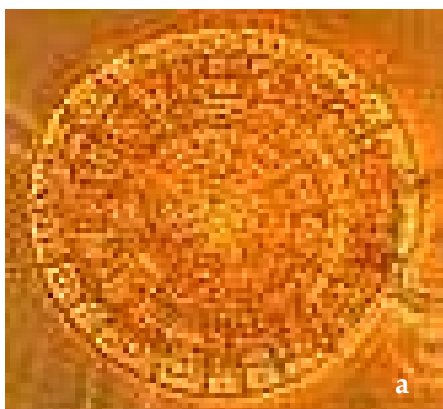


FIG. 11 a. *Helicosporium* spp. tomada de la colección [George Barron's Website on Fungi](#). b. Cepa 4.4A, objetivo 40x.

Producción y caracterización de lipasas a partir de hongos termotolerantes por fermentación en medio sólido

Morfología microscópica: Micelio con ramificaciones, septado, con conidias en forma de hélice en forma lateral y apical.

- 1BcIV, 1.4eB, 1.6bB, 1.10aB, 2.2cB, 2.5aB, 2.7cB, 2.8bB y 2.9aC : Género: *Humicola*



FIG. 12 Colonia de *Humicola*.

Morfología macroscópica: Fondo cremoso, su reverso es blanco al inicio pasando al amarillo. Textura aterciopelada blanca, presenta algunas zonas con superficie rugosa.

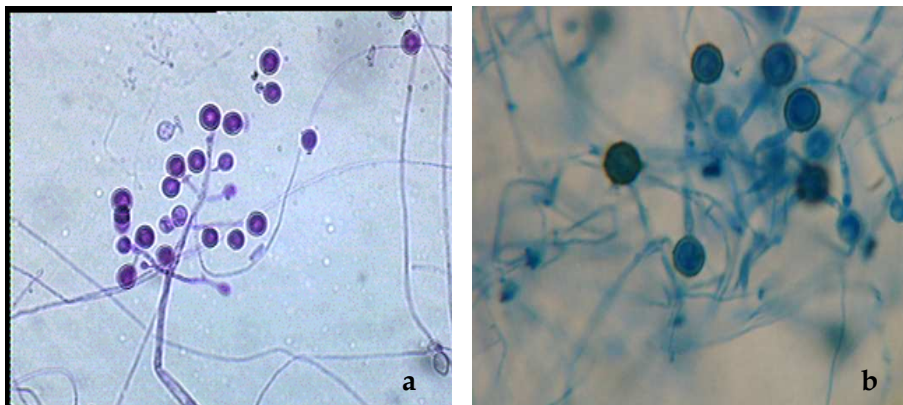


FIG. 13 a. *Humicola* spp. tomada de la colección George Barron's Website on Fungi. b. Cepa 1..10aB, objetivo 40x.

Morfología microscópica: Tiene conidioesporas, micelio simple o rara vez ramificado sin septos; conidia única apical, en forma globosa de color oscuro.

4.2 Identificación molecular

Los análisis de la ITS obtenidos de las secuencias fueron analizados en el Laboratorio de Micología y Fitopatología de la U.A.N.L. por la Dra. Elva Aréchiga Carvajal; obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 1. Resultados del análisis molecular

Cepa	Blast
1.6aB	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain FS160
1.7cB, 1.8cB y 2.1B	<i>Rhizomucor pusillus</i> strain NRRL28626 18S
1BcIV, 1.4eB, 1.6bB, 1.10aB, 2.2cB, 2.5aB, 2.7cB, 2.8bB y 2.9aC	<i>Thermomyces lanuginosus</i> strain ATCC 200065 18S ribosomal. Misma cepa diferentes aislados
4.4A	No pudo ser determinado

Con lo anterior podemos comprobar que la mayoría de las cepas que identificamos taxonómicamente se comprobó su género por biología molecular.

La cepa 1.6aB se comprobó que su género *Aspergillus*, además de saber la especie (*fumigatus*). Debido a que dicha cepa es considerada como muy peligrosa, ya no se va a utilizar para trabajar con ella.

Las cepas 1.7cB, 1.8cB y 2.1B son *Rhizomucor pusillus*, lo cual aclara las dudas que nos dejó el análisis taxonómico, ya que hay mucha similitud entre *Rhizopus* y *Mucor*, y el resultado obtenido nos revela que esta cepa tiene características de ambas.

Las cepas 1BcIV, 1.4eB, 1.6bB, 1.10aB, 2.2cB, 2.5aB, 2.7cB, 2.8bB y 2.9aC resultan ser aislados de la misma cepa, la *Thermomyces lanuginosus*, que es el nombre alternativo del género *Humicola spp.* con lo cual también se confirma el resultado taxonómico.

La cepa 4.4A fue la única que al ser analizada y comparadas con otras secuencias no mostro similitud con ninguna otra cepa, por lo que solo nos quedamos con el resultado del estudio taxonómico (*Helicosporium spp.*) por lo cual tendremos que realizar otras pruebas bioquímicas y microbiológicas para comprobar el género y obtener la especie.

4.3 Determinación del efecto de la temperatura en el crecimiento

Tabla 2. Cepas sembradas a diferentes temperaturas

Cepa	30°C	45°C	50°C
43aIV	+++	+++	NR
1BcIV	-	+++	-
1.4eB	-	+	+
1.6aB	+	+++	+
1.6bB	+	+++	+
1.7cB	-	+	+
1.8cB	-	++	+
1.10aB	-	++	+
2.1B	-	+	+
2.2cB	-	++	+
2.5aB	-	+	-
2.7cB	-	+	-
2.8bB	-	+	+
2.9aB	-	+	+
4.4A	-	+	-
5.1B	-	-	-

NR) No realizado (+) Poco crecimiento (+++) Buen crecimiento
(-) No crecimiento (++) Crecimiento moderado

Las 15 cepas utilizadas fueron sembradas a tres temperaturas (30, 45 y 50°C), siendo a 45°C en donde se obtuvo un mayor crecimiento de la mayoría de la cepas; solo la cepa 5.1B no creció a ninguna temperatura, por lo que se descartó para el análisis.

A 50°C hubo poco crecimiento en solo algunas de las cepas, mientras que a 30°C no hubo crecimiento en general.

La cepa 43aIV que fue utilizada como modelo solo fue sembrada a 30 y 45°C, obteniéndose buenos resultados en ambas temperaturas.

4.4 Detección de actividad lipasa in vivo

Después de 48 horas de incubación se observaron las cajas de Petri con medio con solución Rodamina bajo una lámpara UV (con protección especial utilizando guantes y lentes) para observar los halos de hidrólisis formados los cuales se midieron en tres direcciones diferentes; lo mismo se hizo con las colonias.

Con estos valores, se utilizó la siguiente relación para conocer el Índice de Hidrólisis Radial (IHR):

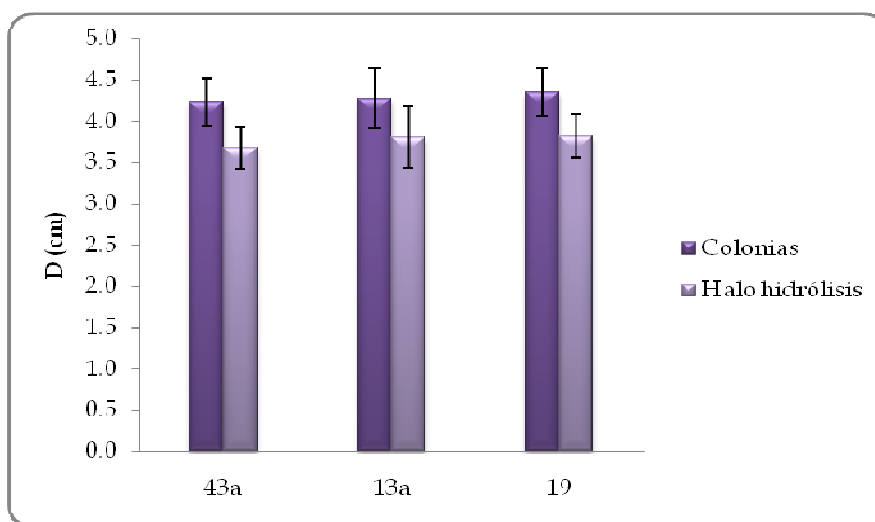
$$IHR = \frac{r_H}{r_C}$$

donde r_H es el promedio de los radios fluorescentes y r_C el radio de las colonias.

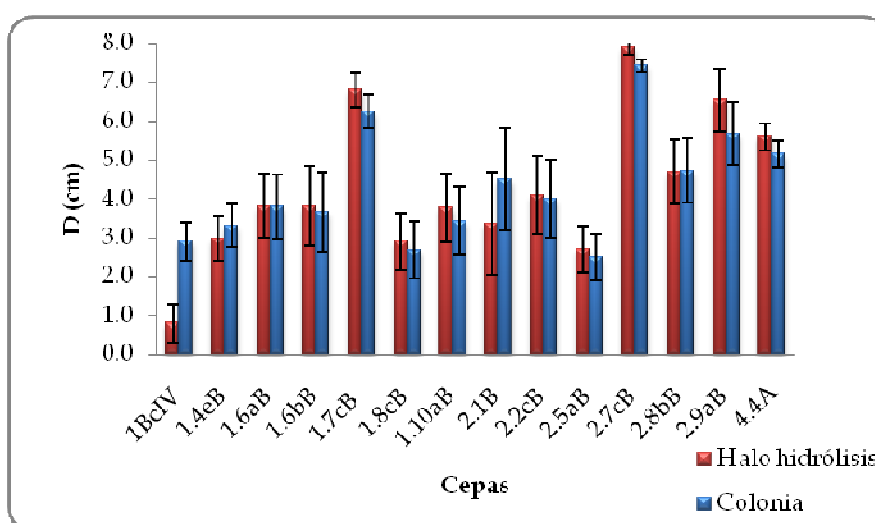
Esto se realizó primero para las cepas modelo (13a, 19 y 43a), y después para las 14 cepas estudiadas.

Tabla 3. IHR de las cepas modelo

Cepa	IHR
43aIV	1.15
13a	1.12
19	1.14



Gráfica 1. Determinación cualitativa de actividad lipas de cepas modelo.



Gráfica 2. Determinación cualitativa de actividad lipas de cepas estudiadas

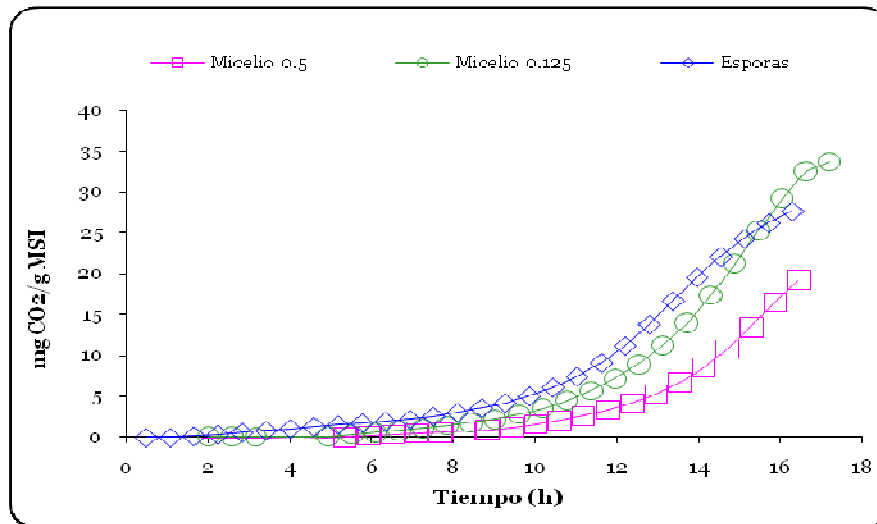
Tabla 4. IH_R de las cepas estudiadas

Cepa	IH_R
1BcIV	0.28
1.4eB	0.90
1.6aB	1.01
1.6bB	1.04
1.7cB	1.09
1.8cB	1.08
1.10aB	1.10
2.1B	0.75
2.2cB	1.02
2.5aB	1.08
2.7cB	1.06
2.8bB	0.99
2.9aB	1.15
4.4A	1.09

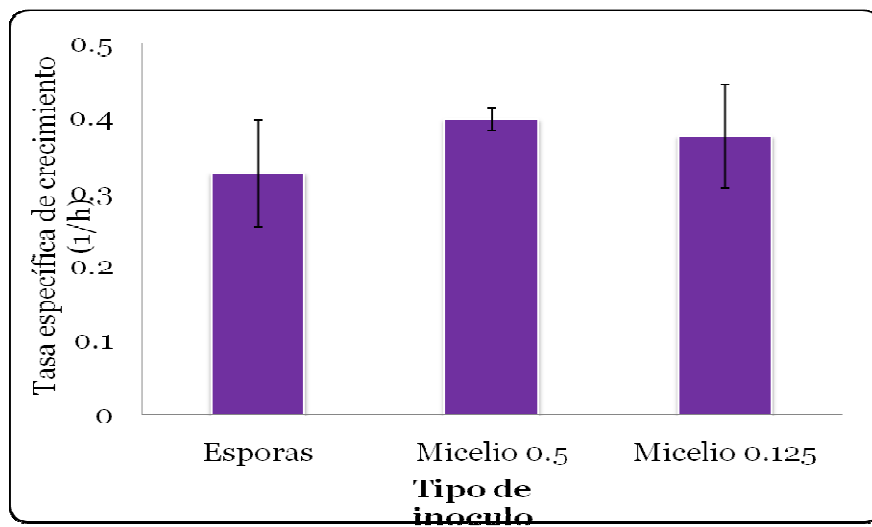
Comparando los datos de la tabla 3 con la 4, se puede observar que las cepas modelo tienen un mayor IH_R , comparada solo con la cepa 2.9aB; lo cual nos indica que son las cepas que aprovechan mejor los nutrientes convirtiendolos en el metabolito que requerimos, en lugar de convertirlo en biomasa. Esto ocurre con las cepas que tienen valores mayores a 1; en el resto de los casos, nos indica que los nutrientes se van mas a la producción de biomasa que de las lipasas, lo cual no es el caso ideal.

Estos datos nos sirven para darnos cuenta de que nuestras cepas realmente producen lipasas, y aunque no es un método cuantitativo, nos sirve para darnos una idea de que cepas producen mayor cantidad de lipasas que otras.

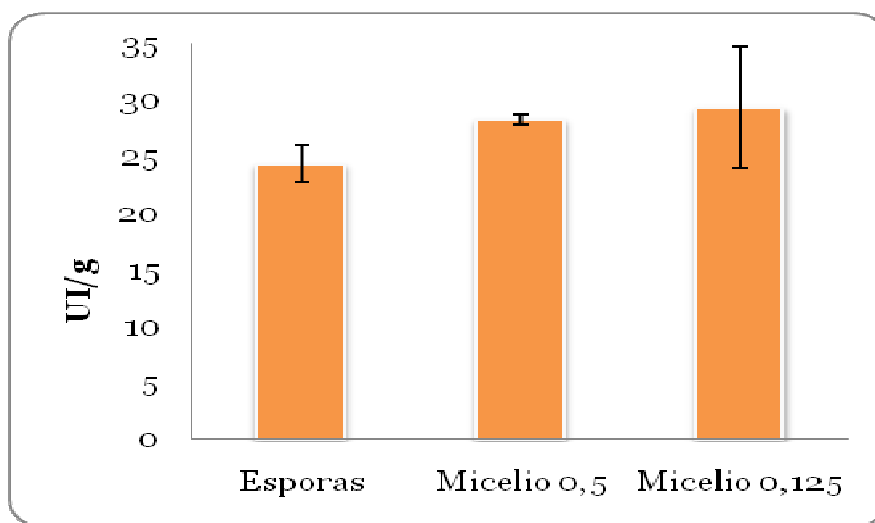
4.5 Efecto del tipo y tamaño de inóculo en la producción de lipasas



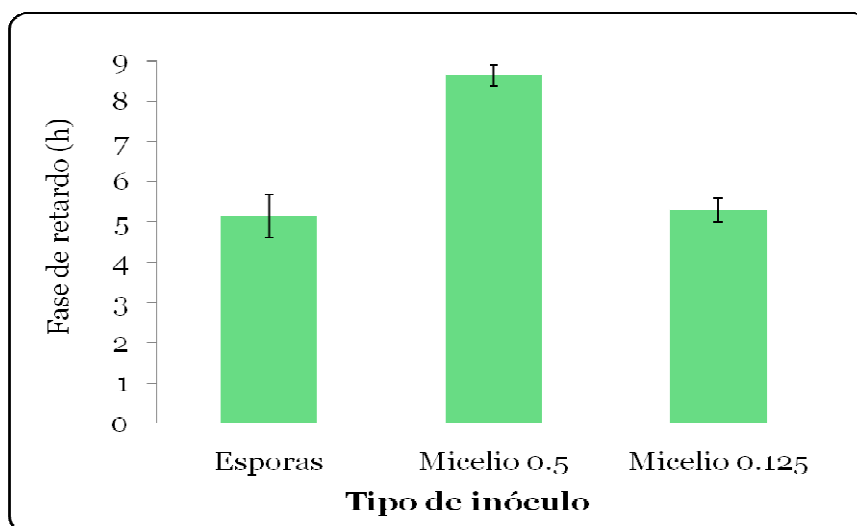
Gráfica 3. Velocidad de producción de CO₂ durante la FMS para diferentes tipos de inóculos



Gráfica 4. Efecto del tipo y tamaño de inóculo sobre la tasa específica de crecimiento de *Rhizopus microsporus* en FMS



Gráfica 5. Efecto del tipo y tamaño de inóculo sobre la producción de lipasas por *Rhizopus microsporus* en FMS



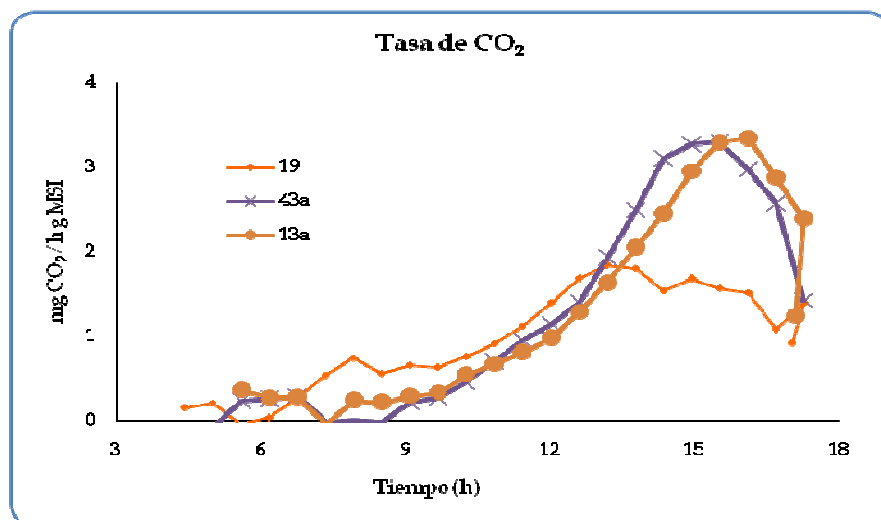
Gráfica 6. Fase lag para los diferentes tipos de inóculo para la producción de lipasas por *Rhizopus microsporus* en FMS.

En las gráficas 3 a 6 se presentan los resultados de crecimiento y de producción de enzima en función del tipo y tamaño de inóculo utilizado. No se observaron diferencias significativas de la tasa específica de crecimiento y de la producción de lipasa; sin embargo, al aumentar el tamaño de inóculo con micelio de 0,125 a 0.5 la duración de la fase de retardo se incrementa en un 90%.

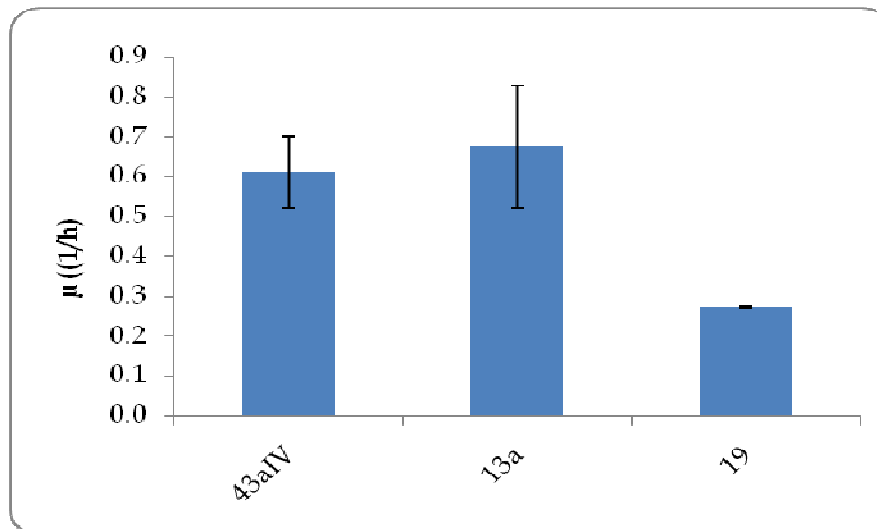
Los resultados obtenidos demuestran que los dos tipos de inóculo (suspensión de esporas o área de colonia crecida en PDA) evaluados en este trabajo pueden ser utilizados para la producción de lipasas en FMS obteniendo los mismos valores de productividad de lipasa.

4.6 Producción de biocatalizadores

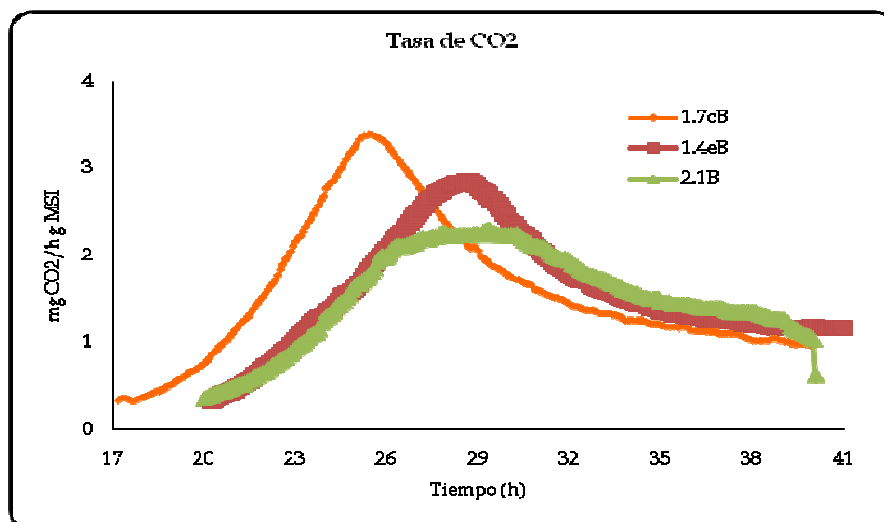
Con los resultados anteriores se eligió el tamaño de inóculo de 0.125 discos/g soporte. Primero se llevaron a cabo las fermentaciones de las cepas modelo (13a, 43a y 19); y después a tres de las cepas estudiadas



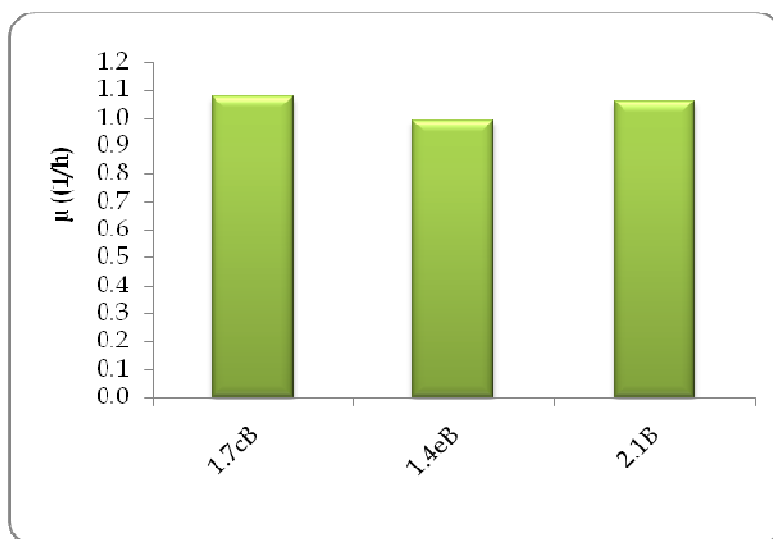
Gráfica 7. Velocidad de producción de CO₂ durante la FMS para cepas modelo



Gráfica 8. Velocidad de consumo de sustrato durante la FMS para cepas modelo



Gráfica 9. Velocidad de producción de CO₂ durante la FMS para cepas estudiadas



Gráfica 10. Velocidad de consumo de sustrato durante la FMS para cepas estudiadas

Tabla 5. Valores Cinéticos para todas las cepas trabajadas

Cepa	μ (1/h)	Fase lag (h)	Tmax(h)
43a	0.62	12.55	15.48
13a	0.51	11.6	16.1
19	0.29	9.38	13.18
1.7cB	0.61	21.48	25.46
1.4eB	0.51	23.88	28.75
2.1B	0.27	22.95	29.33

En las gráficas 7 y 9 nos podemos dar cuenta que los perfiles de crecimiento de las cepas modelo y las estudiadas son muy diferentes, ya que mientras en las primeras la fase lag termina aproximadamente a las 9 horas, en las nuevas cepas estudiadas dicha fase dura más tiempo (aprox. 20 horas). Esto nos indica, que a las nuevas cepas, les cuesta más trabajo el adaptarse a su medio; pero una vez que lo hacen, crecen en forma mucho más rápida, lo cual se puede ver reflejado por su valor de μ (gráficas 4 y 6; tabla 3) donde los valores para las cepas nuevas son más altos que para las cepas modelo; lo cual nos indica que aunque estas cepas tienen una fase lag mayor (tardan más tiempo en adaptarse), cuando logran hacerlo crecen de forma más rápida.

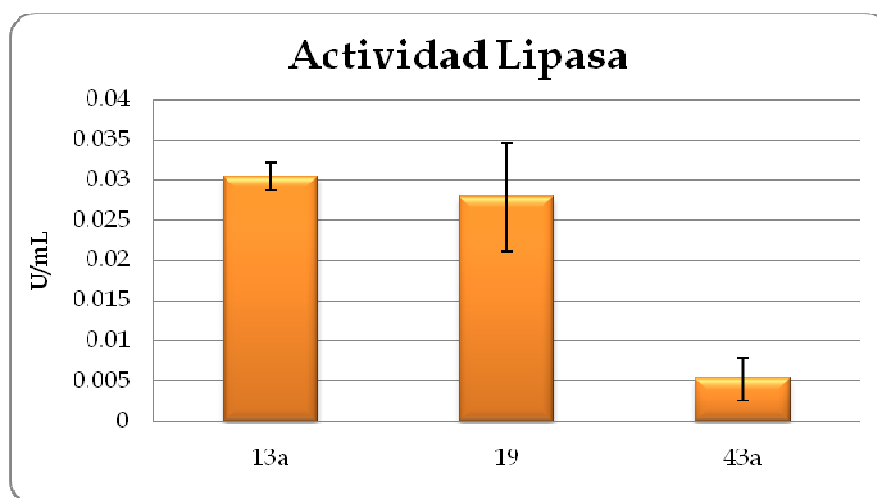
4.7 Cuantificación de actividad lipasa

Para llevar a cabo esta prueba se realizó con anterioridad una curva patrón de p-NPB de la cual vamos a utilizar su pendiente para poder cuantificar las unidades, utilizando la siguiente ecuación:

$$m_1 * \frac{1}{m_2} * \frac{V_T}{V_A} = \frac{U}{mL} = \frac{\mu mol}{min * mL}$$

donde m_1 es la pendiente de las mediciones realizadas en el espectrofotómetro a 348 nm (min^{-1}); m_2 la pendiente de la curva patrón ($\mu mol/mL$); V_T el volumen total de reacción (2.6 mL) y V_A el volumen de la alícuota (100 μmol).

Solo se realizó esta prueba para las cepas control.



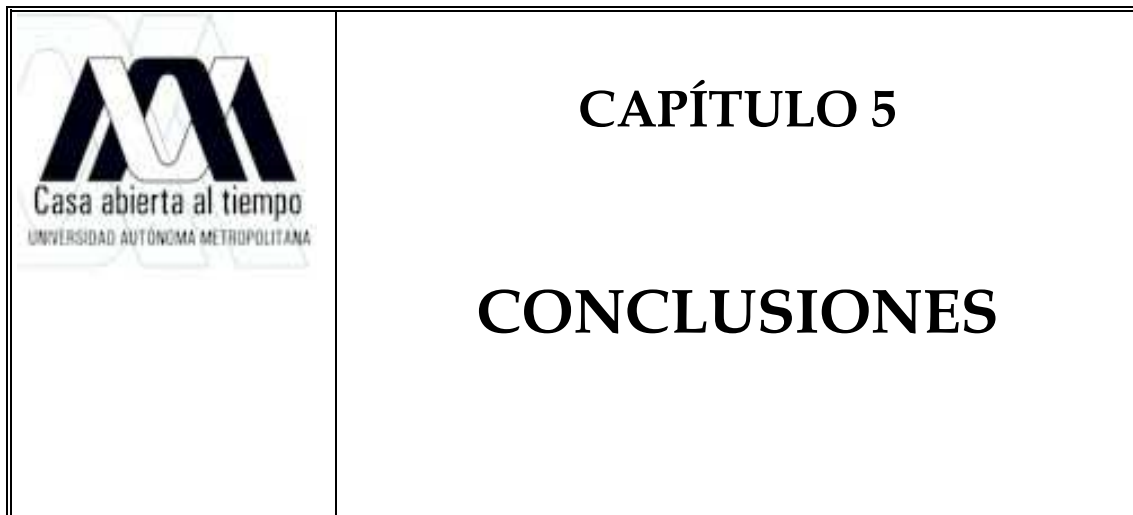
Gráfica 11. Valores de actividad lipasa para diferentes tipos de inóculos

Nota: U: cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de p-NP por minuto.

Con los valores mostrados en la gráfica 11 se puede observar que la cepa 13a es la que tiene una mayor actividad lipasa, quedando la 19 en segundo lugar y siendo la 43a la que nos presenta una actividad mas pequeña.

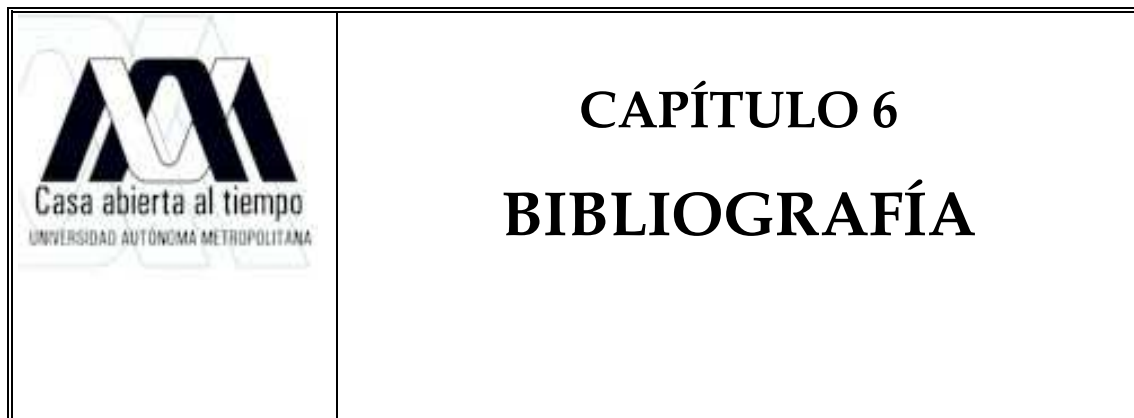
4.8 Calculo tamaño de inóculo

Debido a que se tuvieron algunos problemas con la producción del biocatalizador, debido principalmente al tiempo tan tardado de obtención de mismo, se volvió a replantear el tamaño de inóculo. Así que utilizando la cepa 1.6aB se llevo a cabo la FMS con cuatro concentraciones de inóculo diferente (0.25, 0.5. 0.75 y 1.0 discos/g agrolita), obteniéndose los siguientes resultados:



Con la cepa de *Rhizopus microsporus* crecida en fermentación en medio sólido con agrolita como soporte inerte se demostró que se pueden usar los dos diferentes tipos de inóculo evaluados en este trabajo sin que se modifiquen los niveles de producción de lipasa. Además, se demostró que al incrementar el inóculo superficial de 0,125 a 0,5 discos por gramo de soporte inerte se incrementa la duración de la fase de retardo.

El uso de inóculos superficiales producidos en medios con agar debe de ser considerada para el uso de cepas con bajos, o nulos, niveles de esporulación .



7. Bibliografía

Alexopoulos, C. J., C. W. Mims y M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*, 4a ed. John Wiley & Sons, New York.

Alves M. F., B. Ramos, M. A. García-Sánchez, A. P. Eslava y J. M. Díaz-Minguez. 2002. A DNA-based procedure for in plant detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology*. 92: 237-244.

Awise J. C. 1994. *Molecular markers*. Chapman and Hall. New York.

Badui S. 1999. Química de los alimentos. En: *Lípidos*. Prentice Hall México. México. 213-277.

Barnett H. y Hunter B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Company. 3a edition.

Beys, SW., Mitidieri, S., Schrank, A. y Vainstein, HM. 2005. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*. 40: 321-326.

Bial - Arístegui. 2002. El reino de los hongos. *Revista Iberoamericana de Micología*.

Burnett, J. 2003. *Fungal populations and species*. Oxford University Press, Oxford.

Producción y caracterización de lipasas a partir de hongos termotolerantes por fermentación en medio sólido

Castilho, L.R., Polato, C.M.S., Baruque, E.A., Sant'Anna Jr., G.L. and Freire, D.M.G. 2000. *Biochemistry Engineering Journal*. 4:239-247.

Coca, J., Hernández, O., Berrio, R., Martínez, S., Díaz, E. and Dustet, J.C. 2001. Producción y caracterización de lipasas de *Aspergillus niger* y *A. Fumigatus*. *Biología Aplicada*; 18:216-220.

González, G. 1995. Manual de Prácticas de Laboratorio de Micología de la U.A.N.L.

Hernaiz MJ, Sánchez-Montero, Sinisterra JM. 1999. Modification of purified lipase from *C. rugosa* with polyethylene glycol: A systematic study. *Enzyme Microbiology Technology* .24:181-90.

Hölker U., Höfer M. y Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2004;64:175-186.

Kazlauskas R. 1994. Elucidating structure mechanism relationship in lipases. Prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends Biotechnology* 12:464-72.

Maheshwari, G. Bharadwaj, M. K. Bhat, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, 64, 461 ± 488; b) *Thermophilic Moulds in Biotechnology*, (Eds.: B. N. Johri, T. Satyanarayana, J. Olsen), Kluwer Academic, Dordrecht, 1999.

Martin R. R., J. Delano y C. A. Levesque. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:207-239.

Producción y caracterización de lipasas a partir de hongos termotolerantes por fermentación en medio sólido

May, R. M. 1992. Número de especies que habitan la tierra. *Investigación y Ciencia* 195 (diciembre): 6-12.

Mier, Teresa. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. UNAM, México.

O'Neill R. N., P. Verkun, J. Lin, J. Kuo, G. Ude, W. Kenworthy y A. Saunders. 1997. Application of amplified fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Phytopathology*. 87: 745-750.

Pandey A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering*. 2003; 13: 81-84.

Raimbault M. and Alazard D. 1980. *Eur. J. Appl. Microbiology Biotechnology*. 9: 199-209

Rodríguez J., Mateos JC., Nungaray J., González V., Bhagnagar T., Roussos S., Córdova J. y Baratti J. 2005. Improving lipases production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*; 41(11): 2264-2269.

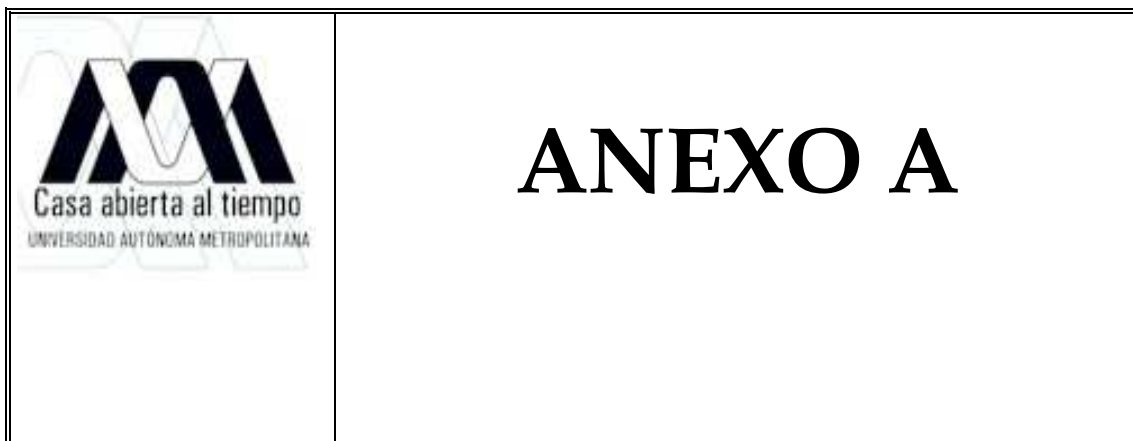
Romero, B. 2006. Avances en la taxonomía y sistemática de los hongos: una revisión general. 66.

Saucedo-Castañeda G, Trejo-Hernández.1994. M. On-line Automated Monitoring and Control Systems for CO₂ and O₂ in Aerobic and Anaerobic Solid-State Fermentations. *Process Biochemistry*; 29:13-24.

Producción y caracterización de lipasas a partir de hongos termotolerantes por fermentación en medio sólido

Valinsky, L., G. Della Vedova, T. Jiang, and J. Borneman 2002. Oligonucleotide fingerprinting of ribosomal RNA genes for analysis of fungal community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5999-6004.

Van den Burg, B.2003. *Curr. Opin. Microbiology*; 6:213-218.



ANEXO A

A1. Medios de cultivo y soluciones para la caracterización taxonómica y molecular

Medio YPD

	g/L
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Dextrosa	20

Buffer A

50 mM tris-HCl pH 7.5

20 mM EDTA

Glass beads

100 mM NaCl

1% SDS

2% triton X-100

A.2 Tratamiento del soporte inerte

El soporte (agrolita) se tamizó en las mallas del No. 6, 7, 10, 16 y 20, colocadas en el siguiente orden:

Tamiz	Tamaño de partícula
No 6	3.36 mm
No 7	2.88 mm
No 10	2 mm
No 16	2 mm
No 20	2 mm
Residuos	

Obteniendo de esta manera el tamaño de partícula deseado para nuestros experimentos (sección 3.7.1).

A.3 Curva estándar de ácidos grasos

Solución estándar de ácido oleico

Se utilizó una solución de ácido oleico a una concentración de 20 mM, la cantidad calculada para dicha concentración se disolvió en heptano y se guardó en un frasco ámbar a -20°C. Ésta solución sirvió para realizar la curva estándar de ácidos grasos.

La curva estándar fue preparada en un rango de concentración de 0 a 20 mM de ácido oleico en heptano de la manera que se indica en la Tabla 5.

Tabla A3. Elaboración de curva estándar de Ácido oleico

Tubo	Heptano (mL)	Solución 20 mM Ácido oleico (mL)	[Ácido oleico] (mmol/L)
1	2.5	0.0	0
2	2.0	0.5	4
3	1.5	1.0	8
4	1.0	1.5	12
5	0.5	2.0	16
6	0.0	2.5	20

Una vez preparadas las diluciones (por duplicado), se adicionaron 0.5 mL de la solución Acetato de cobre-Piridina, se agitaron en vórtex durante 30 s y posteriormente se leyó la Absorbancia a 715 nm.

A.4 Curva estándar de *p*-Nitrofenol

($l = 348 \text{ nm}$, $\text{pH } 7$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

Se preparó una solución 11 mM de *p*-Nitrofenol (*p*NF) en *i*-propanol y se prepararon por duplicado las diluciones que se indican en la Tabla AC.1.

Tabla A4. Diluciones para elaborar la curva estándar de *p*-Nitrofenol

Tubo	Solución 1.1 mM <i>p</i> NF (mL)	<i>i</i> -propanol (mL)	[<i>p</i> NF] (mmol/mL)
1	0.000	0.270	0.000
2	0.011	0.259	0.004
3	0.022	0.248	0.008
4	0.054	0.216	0.020
5	0.162	0.108	0.060
6	0.270	0.000	0.100

Posteriormente, se adicionó a cada tubo 2.73 mL de una solución amortiguadora 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 (a $45 \text{ }^\circ\text{C}$), 20 mM CaCl_2 y 0.25% (p/v) alcohol polivinílico (PVA). Los tubos fueron agitados en vortex durante 10 s, incubados a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min y se midió la absorbancia de las muestras a 410 nm en un espectrofotómetro (SHIMADZU^a UV-160). Los valores obtenidos de absorbancia *versus* concentración de *p*NF (mmol mL^{-1}) se graficaron y se realizó un ajuste de datos por regresión lineal simple. A partir de la pendiente se determinó el coeficiente de extinción molar ($e = 6.8289 \text{ cm}^2 \text{ mmol}^{-1}$).

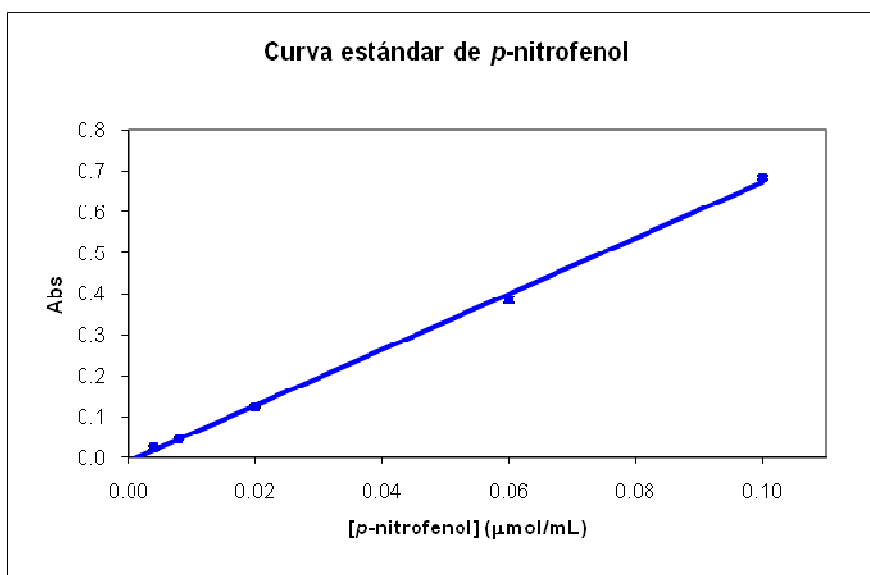


FIG. A4 Curva estándar de *p*-Nitrofenol



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00052

Matricula: 208280305

CARACTERIZACION TAXONOMICA Y MOLECULAR DE CEPAS DE HONGOS TERMOFILOS: ESTUDIOS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE LIPASAS.

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 4 del mes de agosto del año 2009 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ERNESTO FAVELA TORRES
MTRA. BLANCA ELIZABETH HERNANDEZ RODRIGUEZ

siendo el primero asesor de la alumna y lectora la segunda, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: RUTH ANGELICA PEÑA REYES

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

RUTH ANGELICA PEÑA REYES
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE FRANCISCO FLORES PEDROCHE

ASESOR

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

LECTORA

MTRA. BLANCA ELIZABETH HERNANDEZ RODRIGUEZ