

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE HONGOS SOBRE ACEITE DE HIGUERILLA (*RICINUSCOMMUNIS*)

L. Mendoza C.¹, M. Lino N.², J. León Q.³ y J. Santiago C.⁴

RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo seleccionar las cepas de hongos que presentan mejor actividad lipolítica en aceite de higuera y comprobar si sus crudos enzimáticos obtenidos por fermentación en sustrato líquido (FSL) presentan la misma actividad sobre el aceite de higuera. Se aislaron nueve cepas de hongos, ocho de *Penicillium* sp y una de *Aspergillus* sp, a partir de aceites vegetales de desecho. Los resultados muestran que todas las cepas estudiadas desarrollaron halos de degradación, sin embargo, en ningún caso se observó halos de degradación con los crudos enzimáticos. El trabajo demostró que las cepas estudiadas de *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp presentaron un mejor crecimiento cultural en aceite de higuera y una muy buena actividad de hidrólisis en placa con el triglicérido de cadena corta: tributirina.

Palabras clave: Fermentación Substrato Líquido (FSL), tributirina, aceite de higuera, *Penicillium* sp; *Aspergillus* sp.

EVALUATION OF THE LIPOLYTIC ACTIVITY OF FUNGUS ON CASTOR OIL (*RICINUSCOMMUNIS*)

ABSTRACT

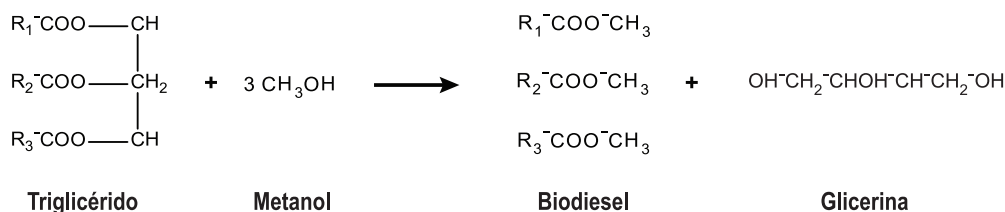
The present study aims to select fungal strains having improved lipolytic activity in castor oil and see if its crude enzyme obtained by fermentation in liquid substrate (FSL) has the same activity on castor oil. Nine strains were isolated from fungi, *Penicillium* sp eight and one *Aspergillus* sp from waste vegetable oils. The results show that all studied strains of degradation halos developed, however, in no case was the halos of crude enzymatic degradation. The work showed that the strains of *Penicillium* sp and *Aspergillus* sp had a better cultural growth in castor oil and a good plate hydrolysis activity with short-chain triglyceride: tributirina.

Keywords: Liquid Substrate Fermentation (FSL), tributirina, castor oil, *Penicillium* sp; *Aspergillus* sp.

I. INTRODUCCIÓN

La higuera, *Ricinus communis*, es una oleaginosa que se cultiva en casi todo el mundo. El principal componente del aceite de ricino es el ácido ricinoleico (89%), que posee un doble enlace, un grupo hidroxilo y un grupo

carboxílico^[1,2], que son fácilmente funcionalizados y permite obtener una serie de derivados de interés industrial. El aceite de ricino tiene una gran demanda pues es utilizado como aditivo de tintas, pinturas y barnices, también en la formulación de lubricantes, aceite de motores y en la preparación de



Esquema N.º 1. Reacción general de formación de biodiesel.

1 Lab. de Ecología Microbiana, Fac. de Ciencias Biológicas-UNMSM, mendozaclig@gmail.com
 2 Lab. de Ecología Microbiana, Fac. de Ciencias Biológicas-UNMSM, mirkodlinax@gmail.com
 3 Lab. de Ecología Microbiana, Fac. de Ciencias Biológicas – UNMSM, jleonq@unmsm.edu.pe
 4 Departamento de Química Orgánica, FQIQ-UNMSM, jsantiago@unmsm.edu.pe

detergentes sintéticos biodegradables que producen poca espuma^[1].

El aceite de higuera es un candidato ideal para la obtención de biodiesel debido a que no es comestible y a su composición que facilita su caracterización. La obtención de biodiesel puede hacerse por metanólisis, esquema 1, o por métodos enzimáticos^[3-4]. Para el caso del aceite de higuera, el biodiesel está constituido principalmente por ricinoleato de metilo. En el método enzimático, se han utilizado lipasas provenientes de *Aspergillus oryzae* silvestres o genéticamente modificadas^[4].

Penicillium sp y *Aspergillus sp* son hongos que pueden ser encontrados en todo tipo de sustratos orgánicos y pueden ser cultivadas en condiciones óptimas de aireación y agitación^[13]. Además, son una fuente de lipasas, especialmente de aquellos que son aislados de residuos de aceites vegetales^[5-13].

El presente estudio tiene como objetivo seleccionar las cepas de hongos que presentan mejor actividad lipolítica en aceite de higuera, y comprobar si sus crudos enzimáticos obtenidos por fermentación en sustrato líquido (FSL) presentan la misma actividad sobre el aceite de higuera.

Un aspecto interesante de este estudio radica en el hecho de que las lipasas producidas por hongos son fácilmente separadas del micelio por filtración o centrifugación, por lo que son objeto de un creciente interés debido a la variada utilidad industrial de estas enzimas^[14].

II. PARTE EXPERIMENTAL

Aislamiento y acondicionamiento de los hongos

Todas las cepas fueron previamente aisladas e identificadas con los códigos: M2-Cz, M4-APH, M4P-APH, M5a-Cz, M5b-Cz, M5Pa-Cz, M5Pb-Cz, M6-Cz; todas del género *Penicillium*, y M6a-APH; el único de *Aspergillus*^[5].

Cada hongo fue sembrado por puntura en dos tipos de agares: Agar Czapek más 3% de tributirina y Agar Czapek más 3% de aceite de higuera, substituyéndose la dextrosa por el triglicérido respectivo como única fuente carbonada para cada tipo de agar^[15]. El pH para ambos agares fue de 6 y se incubaron a temperatura de laboratorio por un máximo de 26 días^[11]. Las cepas que presentaron buena actividad lipolítica para ambos tipos de triglicéridos fueron cultivados en sistemas de fermentación en sustrato líquido (FSL).

Fermentación en Sustrato Líquido (FSL)

Se seleccionaron los micromicetos que presentaron una relación del radio del halo lipolítico (R) mayor o igual a la mitad del radio de crecimiento del hongo ($r/2$) sobre el medio Agar Czapek con tributirina y Agar Czapek con aceite de higuera^[9,10]. También se consideró el criterio de fuerte aclaramiento del medio o el desarrollo profuso del hongo en toda la placa. Las cepas seleccionadas fueron acondicionadas según la literatura^[5,16].

En frascos Erlenmeyer de 250 mL se agregó un volumen de 50 mL de caldo Czapek con 8 mL de aceite de higuera (16%) como única fuente carbonada y 0,5 g de bactopectona (1%), pH final fue de 6. De cada tubo con la solución conidial se agregó 5 mL de dicha solución al sistema de FSL, además se agregó 0,5 g de biomasa de cada cultivo crecido en APD de donde se obtuvieron los hongos para el recuento de conidias. Los frascos Erlenmeyer se colocaron en agitación a 150 RPM durante 12 días a temperatura de laboratorio. Luego fueron centrifugados a 600 RPM por 1 hora, y se filtró en papel Whatman (70 mm), obteniéndose así el "crudo enzimático" a ser probado.

Evaluación de actividad lipolítica

Se inoculó 100 μ L de cada crudo en 3 pocillos de 3 mm de diámetro diseñado en cada placa de Agar Czapek preparada al 3%, 6% y 9% de aceite de ricino a pH 6. Las placas

se incubaron durante un tiempo máximo de 28 días a temperatura de laboratorio.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

Todos los experimentos realizados con el aceite de higuera fueron comparados con tributirín (tributirato de glicerina), un subs-

trato ideal para la detección de microorganismos lipolíticos debido a su relativa fácil incorporación en el agar y la claridad de las reacciones de hidrólisis producida^[17]. La figura 1 muestra la estructura del triglicérido mayoritario, conformado por el ácido ricinoleico, presente en el aceite de higuera, comparado con la estructura del tributirín.

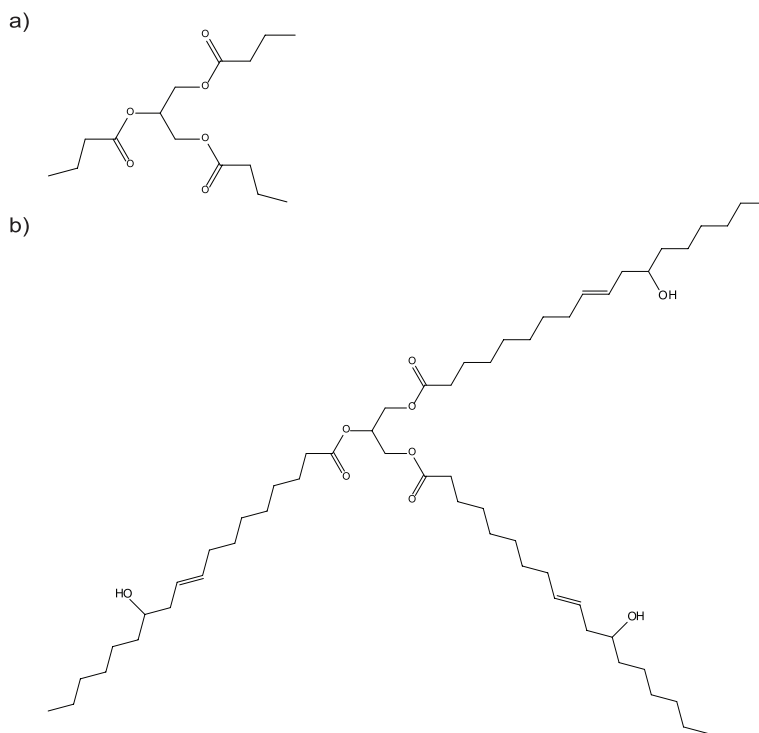


Figura N.º 1. Estructura química del tributirín (a) y del triglicérido mayoritario en el aceite de higuera (b).

De las 9 cepas de hongos evaluadas (Figura 2) las cepas: M2-Cz, M4-APH, M5Pa-Cz y M6-Cz fueron seleccionadas para ser cultivadas en sistema de FSL. La cepa M2-Cz presentó el mayor radio de hidrólisis tanto con aceite de higuera como con tributirín; las cepas M4-APH, M5Pa-Cz y M6-Cz desarrollaron, cada una, un radio final del halo de degradación muy similar con ambos tipos de triglicéridos probados en Agar Czapek, ello hasta el 26avo día de incubación. Estas cepas elegidas cumplían con la relación $R \geq r/2$. También se seleccionó la cepa M5a-Cz por presentar un desarrollo profuso en toda la placa (Tabla 1). Todos estos hongos pertenecen al género *Penicillium* y

fueron sembradas en APD por 5 días para la preparación del inóculo de conidias. Las cepas que presentaron el mayor número de conidias fueron M5Pa-Cz y M4-APH con 2×10^8 conidias/mL cada uno, luego M5a-Cz con 8×10^7 conidias/mL y M2-Cz con 6×10^7 conidias/mL. Para la cepa M6-Cz no se observaron conidias sino sólo estructuras vegetativas como hifas, por lo que se decidió agregar 0,5 g de biomasa contenida en APD de cada cepa elegida en sus correspondientes matraces para iniciar la FSL^[7,8,12,13,18,19]. Los “crudos enzimáticos” obtenidos por FSL fueron confrontados al aceite de higuera.

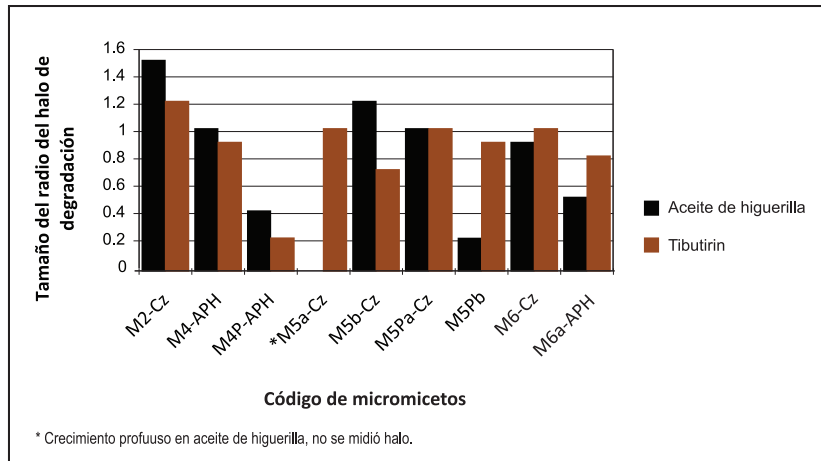


Figura N.º 2. Tamaño final del halo de degradación de las 9 cepas de hongos sembradas en Agar Czapek con Aceite de Higuerrilla y Tributirin hasta el 26^{avo} día. *Crecimiento profuso, no se midió halo.

Tabla N.º 1. Tamaño final del radio del halo de degradación (R) y radio del hongo (r) al 26^{avo} día

Micromiceto (Códigos)	A. Czapek+ 3% Aceite de higuerrilla		A. Czapek+ 3% Tributirin		R ≥ r/2
	R (cm)	r (cm)	R (cm)	r (cm)	
M2-Cz	1.5	2	1.2	1	Elegido
M4-APH	1	2	0.9	1	Elegido
M4P-APH	0.4	2	0.2	0.6	No
*M5a-Cz	No medido	Profuso	1	1	Elegido
M5b-Cz	1.2	2.2	0.7	1.2	No
**M5Pa-Cz	1	2	1	1.2	Elegido
M5Pb-Cz	0.2	2.1	0.9	1.1	No
M6-Cz	0.9	2	1	0.7	Elegido
M6a-APH	0.5	3,3	0.8	0.2	No

R= radio del halo lipolítico (cm), r /2 = mitad del radio de crecimiento del hongo (cm)

* Elegido por presentar desarrollo profuso.

**Elegido por presentar fuerte halo de aclaramiento en el medio.

Las nueve cepas de hongos de los género *Penicillium* y *Aspergillus* presentaron halos de degradación al ser sembradas por pun-tura en Agar Czapek sea con 3% Tributirin o con 3% de aceite de higuerrilla, cabe resaltar que fue en el medio con Tributirin en donde el halo evidenció un fuerte aclaramiento del medio que inicialmente era color lechoso. Sin embargo los “crudos enzimáticos” de las 5 cepas de *Penicillium sp* seleccionadas y que

fueron cultivadas en caldo Czapek con 16 % de aceite de higuerrilla y 1% de peptona (FSL) no evidenciaron aclaramiento del medio para ninguna de las concentraciones de 3%, 6% y 9% de aceite de higuerrilla probadas. Ello pudo deberse a que la concentración de aceite de higuerrilla empleado en la FSL fue demasiado alto (16%), lo que pudo inhibir la producción de lipasas, mas no la producción de biomasa. Incluso algunos autores han

advertido que concentraciones por encima del 1% de triglicéridos tan simples como tributirin en medio sólido han demostrado ser tóxico para algunos organismos^[20] y otros mencionan concentraciones ideales del 0,3% del mismo triglicérido^[21]. Sin embargo, indicaciones para la preparación de medio sólido aceptan incluso una concentración final de lípido del 5%^[17].

Las 8 especies de *Penicillium sp* y la única especie de *Aspergillus sp* probadas en el presente estudio fueron aisladas inicialmente a partir de aceites de desecho de diferentes orígenes, ninguna de ellas se obtuvo de aceite de higuera^[5]. Se conoce que las lipasas de algunos microorganismos pueden exhibir preferencia sobre un sustrato en particular en función a la complejidad estructural del sustrato^[17] y dado que el aceite de higuera es un tipo de triglicérido complejo la producción de lipasas pudo ser inhibida al no encontrar el sustrato ideal para iniciar la hidrólisis, lo que nos podría indicar una posible especificidad de lipasa producida para un tipo particular de sustrato lipídico que no sería el aceite de higuera.

La presencia de peptona como fuente de nitrógeno puede influenciar positivamente en la producción de lipasas en sistemas de FSL^[6,12,19], sin embargo la adición de 1% de peptona en la FSL diseñada en la presente investigación y bajo las condiciones descritas en el estudio no tuvo efecto benéfico.

Cuando el tributirin es hidrolizado por acción enzimática en dibutirin, monobutirin, glicerol y ácido butírico se produce un zona clara y ello es debido a que el ácido butírico al ser soluble en agua lo hace fácilmente detectable por un halo claro que se desarrolla en el medio^[17]. En cambio, el halo no fue tan evidente en el medio sólido con aceite de higuera, por lo tanto no podemos decir que existe correlación entre la hidrólisis del tributirin y la actividad de los crudos probados a diferentes concentraciones de aceite de ricino, lo que también podría deberse a que la metodología empleado no fue la adecuada

La hidrólisis observada en las placas pudo deberse a esterases, ya que el tributirin no es capaz de detectar "verdaderas lipasas", debido a que este sustrato también puede ser hidrolizado por esterases^[22]. Sin embargo, muchas lipasas son capaces de hidrolizar tanto el tributirin como otros triglicérido más complejos, pero el presente estudio revela que la actividad enzimática detectada con tributirin no fue estrictamente comprobada con aceite de ricino.

IV. CONCLUSIONES

El trabajo demostró que las cepas estudiadas de *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* presentaron un mejor crecimiento cultural en aceite de higuera y una muy buena actividad de hidrólisis en placa con el triglicérido de cadena corta: tributirin. La producción de lipasas que puedan hidrolizar otros tipos de triglicéridos, como el aceite de higuera, es dependiente de un número de factores interrelacionados, los cuales incluyen el crecimiento de los organismos, la producción y liberación de lipasas, la especificidad de su actividad y del sustrato sobre el cual actúa, además del método para la detección de la actividad lipolítica.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ogunniyi D., Castor oil: A vital industrial raw material, *Bioresource Tech.* 2006; 97(9):1086–1091.
- [2] Salimon J., Mohd D., Nazrizawati A., Mohd M., Noraishah A., Fatty Acid Composition and Physicochemical Properties of Malaysian Castor Bean *Ricinus communis L.* Seed Oil, *Sains Malaysiana*, 2010; 39(5):761–764
- [3] Plentz S., Meneghetti M., Wolf C., Silva E., Lima G., de Lira L., Serra T., Cauduro F., de Oliveira L., Biodiesel from Castor Oil: A Comparison of Ethanolysis versus Methanolysis, *Energy & Fuels*, 2006; 20:2262-2265.
- [4] Rathod V., Pandit A., Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of

- castor oil, *Biochem. Eng. J.*, 2009; 47:93–99.
- [5] Mendoza Canales L. Aislamiento y selección de hongos lipolíticos a partir de aceites vegetales de desecho (provenientes de frituras) utilizados en la elaboración de Biodiesel (Tesis de licenciatura en Biología). Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
- [6] Cihangir N., Sarikaya E., Investigation of lipase by a new isolate of *Aspergillus sp.*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2004; 20:193-197.
- [7] De la Torre M., Diaz A., Ruiz B., Farres A., Aramburo C., Sanchez S., Physiology of lipase formation in *Penicillium candidum*. *J. Industrial Microbiol.*, 1996; 17:73-76.
- [8] Dos Prazeres J., Bartolotti J., Pastore G. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Braz. J. Microbiol.*, 2006; 37:505-509.
- [9] Hou C., Johnston T., Screening of lipase activities with cultures from the Agricultural Research Service Culture Collection. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1992; 69:1088-1097.
- [10] Ionita A., Moscovici M., Popa C., Vamanu A., Popa O., Dinu L., Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential and determination of some biochemical properties of microbial lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1997; 3:147-151.
- [11] Krikstaponis A., Lugauskas A., Krysinska-Traczyk E., Prazmo Z., Dutkiewicz J., Enzymatic activities of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from the air at wastes landfills. *Ann Agric. Environ. Med*, 2001; 8:227-234.
- [12] Pinheiro T., Menoncin S., Domingues N., De Oliveira D., Treichel H., Di Lucio M., Freire D., Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. *Ciênc. Technol. Aliment., Campinas*, 2008; 28(2):444-450.
- [13] Shafei M., Mohamed T., Abd Elsalam I., Optimization of extracellular lipase production by *Penicillium chrysogenum* using factorial design. *Malaysian J. Microbiol.*, 2011; 7(2):71-77.
- [14] Gandhi N., Applications of Lipase. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1997; 74(6):621-634.
- [15] Koneman E., Roberts G., Wright S., Czapk Dox Agar. En: *The Williams & Wilkins Company (edit.) 2nd Edition. Practical Laboratory Mycology*. 1975, p.127.
- [16] Cañedo V., Ames T., Manual de Laboratorio para Manejo de Hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la papa (CIP), 2004; 40-42
- [17] APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. *Lipolytic Microorganisms*, 4th Ed. 2001. c.15; 175-181.
- [18] Marek A., Bednarski W. Some factors affecting lipase production by yeast and filamentous fungi. *Biotechnol. Lett.*, 1996; 18(10):1155-1160.
- [19] Petrovic S., Skrinjar M., Becarevic A., Vujicic I., Banka L., Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotechnol. Lett.*, 1990; 12(4):299-304.
- [20] Fryer T., Lawrence R., Reiter B., Methods for isolation and enumeration of lipolytic organisms. *England J. Dairy Sci.*, 1967; 50:477-484.
- [21] Oterholm A., Ordal Z., Improved Method for Detection of Microbial Lipolysis. *J. Dairy Sci.*, 1966; 49(10):1281-1284.
- [22] Kouker G., Jaeger K., Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986; 53(1):211-212.