

Correspondencia

Aislamiento y estudios genéticos para el mejoramiento de hongos celulolíticos

A. A. PIZZIRANI-KLEINER, E. NEIROTTI, G. HENRIQUE GOLDMAN, J. LÚCIO DE AZEVEDO, M. C. FURLANETO, V. APARECIDA VICENTE Y E. CARMONA RODRÍGUEZ

Instituto de Genética - ESALQ/USP, Caixa Postal 83, 13.400 - Piracicaba - SP, Brasil

La celulosa es la fuente de carbono orgánico renovable más abundante en la naturaleza. Su conversión a glucosa tiene numerosas aplicaciones en la industria química, de alimentos y en la producción de energía. Su hidrólisis puede ser por la vía ácida o enzimática; esta última posee, entre otras, las ventajas de no corroer los equipos y no producir compuestos secundarios tóxicos. Sin embargo, hasta el presente ningún proceso significativo que utilice enzimas celulolíticas fue comercialmente explotado debido al alto costo de producción de esas enzimas.

Diversos microorganismos producen celulosas, entre los cuales se incluyen especies de hongos actinomicetos y otras bacterias. Debe destacarse que solamente los hongos excretan grandes cantidades de celulasas en su forma activa en el medio de cultivo, mientras que las celulasas bacterianas están principalmente ligadas a la pared celular (Wood, 1985).

En la búsqueda de un hongo altamente productor de celulasas, el Instituto de Genética de la Escuela Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidad de Sao Paulo - ESALQ/USP, ha desarrollado las siguientes actividades: aislamiento, caracterización biológica y estudios genéticos que tienen como fin el mejoramiento de hongos celulolíticos. De esta forma, el objetivo de este trabajo es la divulgación de las líneas de investigación que se realizan en esta área por el Instituto.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOLÓGICA DE HONGOS CELULOLITICOS

El primer paso en la producción de enzimas microbianas comerciales es la selección de un microorganismo, que cuando crezca en cultivo puro, produzca la enzima deseada en gran cantidad. El proceso de selección consiste en la selección de cultivos originales para producción de enzima y en la de obtener nuevas cepas de mayor potencial de producción. Un gran número de especies de microorganismos son celulolíticos, pero pocos son buenos productores. Brasil, país esencialmente tropical, presenta condiciones ideales para la búsqueda de nuevos microorganismos degradadores de material celulósico. Con esta finalidad fueron aislados microorganismos contaminantes de la industria del papel, de compuesto y del tracto digestivo de insectos xilófagos. El material aislado fue transferido para el medio modificado, de Aaronson (1970), específico para hongos celulolíticos.

Para la caracterización biológica de estos cultivos aislados, fueron aplicados los siguientes criterios: 1) crecimiento y producción de enzima en un período de tiempo relativamente

corto; 2) utilización de medios de cultivo simples conteniendo como única fuente de carbono celulosa sin pretratamiento químico, así como celulosa ácida (Tansey, 1971), para la evaluación de la capacidad celulolítica; 3) estudio del crecimiento en un amplio margen de temperatura, en función de posibles diferentes usos de esa cepa (sacarificación y/o fermentación); 4) el microorganismo no debe ser patógeno, y principalmente debe ser genéticamente estable, de preferencia con conidios uninucleados.

Después de aislados y caracterizados, los hongos más promisorios son evaluados en cuanto a su producción de enzimas celulolíticas a través de dosajes bioquímicas, utilizando la cepa de *Trichoderma reesei* QM 9414 como testigo.

Aspergillus niger NRRL-337

Según Lutzen *et al.* (1983), el sistema celulolítico de *Trichoderma reesei* no es único; complejos celulolíticos más eficientes pueden ser producidos a partir de diferentes especies de *Aspergillus*. El objetivo de esta línea de investigación es la obtención de mutantes de *Aspergillus niger* NRRL-337 con mayor producción de celulasas. Para esto se realizaron tratamientos con agentes mutagénicos tales como el dietilsulfato, ácido nitroso, luz ultravioleta y radiación γ . Después del tratamiento, los conidios son sembrados en medio completo (Pontecorvo *et al.*, 1953) e incubados durante 72 horas a 28 °C. La selección es hecha por transferencia de estas colonias para un medio sólido con celulosa ácida (Tansey, 1971; Goldman y Azevedo, 1987) como única fuente de carbono, más desoxicolato de sodio (0,08%) como reductor de colonia. Las placas son incubadas durante 5 días a 28 °C. Después de la incubación, se aplica un choque térmico a 50 °C durante 16 horas (Montenecourt y Eveleigh, 1977). El criterio de selección se basa en el tamaño del área del halo de degradación de la celulosa de las colonias mutantes en comparación con las del tipo salvaje (Montenecourt y Eveleigh, 1977).

Humicola sp.

El hongo filamentoso *Humicola sp.* fue aislado de un compuesto. Este hongo es termofílico, de crecimiento rápido y un buen productor de celulasas, principalmente B-glucosidasa. Estas propiedades incentivaron estudios genéticos con el objetivo de mejorar sus características de interés industrial. El hecho de ser un hongo con conidios multinucleados, con hifas septadas multinucleadas y de no presentar reproducción sexual, hicieron pensar en la obtención y fusión de protoplastos con el método de mejoramiento más adecuado para este hongo. Para que un programa de mejoramiento genético específico para él pudiera ser desarrollado, varios aspectos fueron estudiados, incluyendo la obtención de un medio sólido de cultivo que permitiese la selección de mutantes con alta producción de celulasas, y la obtención y regeneración de protoplastos, estudiándose también aspectos citogenéticos de los mismos, determinación de un tiempo ideal de tratamiento enzimático del micelio para la obtención de protoplastos uninucleados, y la obtención de marcas genéticas para deficiencias nutricionales y de resistencia. Estos estudios básicos permitieron el desarrollo de un programa de selección de variantes de este hongo, para mayor producción de celulasas que permitirán, en el futuro, a través de la fusión de protoplastos, la unión de características de interés industrial de variantes diferentes en un único individuo.

REFERENCIAS

- AARONSON, S. (1970). *Experimental microbial ecology*. Academic Press, New York, USA, p.80.
- GOLDMAN, G. H. y J. L. AZEVEDO (1987). *A simple screening of the cellulolytic activity of Trichoderma spp. isolates in comparison with T. reesei QM 9414*. Arq. Biol. Tecnol., **30**(2): 267-273.
- LUTZEN, N. W.; M. H. NIELSEN; K. M. OXENBOELL; M. SCHULEIN y B. STENTEBJERG-OLESEN (1983). *Cellulases and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., **300**(1100): 283-292.
- MANDELS, M. (1985). "Applications of cellulases". En: *Cellulases: Production, Properties and Applications*. Biochemical Society Transactions, 611th. Meeting, Galway, edited by M. P. Coughlan, pp. 414-416.
- MONTENECOURT, B. S. y D. E. EVELEIGH (1977). *Preparation of mutants of Trichoderma reesei with enhanced cellulase production*. Appl. Environ. Microbiol., **34**: 777-782.
- PONTECORVO, G.; J. A. ROPER; L. M. HEMMONS; K. D. MACDONALD y A. W. J. BUFTON (1953). *The genetics of Aspergillus nidulans*. Adv. Genet., **5**: 141-238.
- TANSEY, M. R. (1971). *Agar diffusion assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi*. Arch. für Mikrobiol., **77**: 1-11.
- WOOD, T. M. (1985). "Properties of cellulolytic enzyme systems". En: *Cellulases: Production, Properties and Applications*. Biochemical Society Transactions, 611th. Meeting, Galway, edited by M. P. Coughlan, pp. 407-410.