

# AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE LIPASAS PARA LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL EN MÉXICO

## ISOLATION OF LIPASE-PRODUCING MICROORGANISMS TO OBTAIN BIODIESEL IN MÉXICO

**Reyes-Reyes, A.L.<sup>1\*</sup>; Iracheta-Donjuan, L.<sup>1</sup>; Wong-Villarreal, A.<sup>2</sup>; Martínez-Bolaños, M.<sup>1</sup>; López-Guillén, G.<sup>1</sup>; Valle-Mora, J.<sup>3</sup>; Zamarripa-Colmenero, A.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Bioenergía. INIFAP. Km 18 Carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas, México. <sup>2</sup>Universidad Tecnológica de la Selva. Ocosingo Chiapas. <sup>3</sup>El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Tapachula. Km 2.5, Carretera Antigua Aeropuerto. <sup>4</sup>Profesionista Independiente.

**\*Autor responsable:** reyes.ana@inifap.gob.mx

### RESUMEN

Los microorganismos que producen lipasas, generalmente son conocidos como lipolíticos, y pueden encontrarse en diferentes hábitats, como residuos vegetales y suelos. Lo anterior, indica que el mismo ambiente ofrece un amplio potencial para el aislamiento de nuevas fuentes de lipasas con propiedades novedosas. En este sentido, es imprescindible la búsqueda de las condiciones óptimas para su crecimiento y aprovechamiento. Se evaluó la capacidad de formación de colonias en muestras de suelo de Chiapas, México, inoculadas con tres diferentes niveles de dilución en dos medios de cultivo (medio nutritivo y Agar Dextrosa Papa), cada uno con ajuste de pH de 4, 7 y 9; temperaturas de incubación de 20, 30 y 40 °C. La mejor combinación de factores fue validado en 40 muestras de suelo provenientes de 10 localidades. La condición óptima que favoreció el crecimiento de microorganismos en la muestra de suelo fue el medio nutritivo, con pH 7, incubación a 30 °C y factor de dilución 1:1000. Se identificó un marcado efecto del sitio de recolecta de suelo sobre el promedio de UFC. Los sitios de colecta del municipio de Pijijiapan, Chiapas presentaron los promedios de UFC más elevados, aislando 75 colonias lipolíticas, de las cuales, 60% fueron químicamente caracterizado como Gram positivo.

**Palabras claves:** Bioenergéticos, bacterias, suelo, Chiapas.

### ABSTRACT

Microorganisms that produce lipases are generally known as lipolytic, and can be found in different habitats, such as plant and soil residues. This indicates that the same environment offers a wide potential for the isolation of new sources of lipases with novel properties. In this sense, the search for optimal conditions for their growth and exploitation is essential. The capacity for colony formation in soil samples from Chiapas, México, was evaluated, which were inoculated with three different levels of dilution in two culture mediums (nutritional medium and Potato Dextrose Agar), each one with a pH adjustment of 4, 7, and 9, and incubation temperatures of 20, 30, and 40 °C. The best combination of factors was validated in 40 soil samples from 10 localities. The optimal condition which favored the growth of microorganisms in the soil sample was nutritional medium, with pH 7, incubation at 30 °C, and dilution factor of 1:1000. A marked effect of the soil collection site on the UFC average was identified. The collection sites from the municipality of Pijijiapan, Chiapas, presented the highest UFC averages, isolating 75 lipolytic colonies, of which 60 % were chemically characterized as Gram positive.

**Keywords:** bioenergetics, bacteria, soil, Chiapas.

**Agroproductividad:** Vol. 9, Núm. 11, noviembre. 2016. pp: 57-60.

**Recibido:** febrero, 2016. **Aceptado:** octubre, 2016.

## INTRODUCCIÓN

La producción de biodiesel representa una alternativa como fuente energética que a su vez impacta en la mitigación de los efectos de gases invernadero (Demirbas, 2007). Su producción ocurre mediante la transesterificación, donde el aceite crudo se convierte en 90% biodiesel y 10% glicerina como subproducto (Kolesárová *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2006). Durante la producción de biodiesel, la elección del catalizador suele ser crítico pues de ello depende en gran medida la cantidad y calidad. Existen tres tipos de catalizadores: alcalinos, ácidos y enzimáticos (Kolesárová *et al.*, 2011), y con frecuencia en la catálisis básica se emplea hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, debido a que son económicos y reactivos (Mittelbach *et al.*, 1988), mientras que los catalizadores ácidos más usados son ácido sulfúrico y ácido clorhídrico. El empleo de enzimas durante la transesterificación es reciente y se emplean lipasas (Kolesárová *et al.*, 2011; Snellman, 2004; Clark, 1996), sin embargo, aunque este método sea viable, actualmente el mayor inconveniente es el costo de producción de las enzimas, por lo que una alternativa es el uso de microorganismos productores de lipasas, que permitan la producción de las mismas de forma económica, práctica y que repercuta en la disminución de los costos y calidad del biodiesel. En el suelo existe una amplia diversidad de microorganismos, entre los cuales están los que nos son factibles de crecer o aislar bajo condiciones *in vitro*, y otros que podrían requerir condiciones ambientales específicas para su expresión en condiciones artificiales. Con base en lo anterior, se desarrollaron las condiciones ambientales y medio de cultivo que permite el crecimiento, aislamiento e identificación de microorganismos productores de lipasas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental se realizó en el Laboratorio de Bioenergía del Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), de Tuxtla Chico, Chiapas, México. Se usaron muestras de 100 g<sup>-1</sup> de suelo recolectados en plantaciones y cercos vivos de piñón mexicano (*Jatropha curcas* L.) de diez procedencias de Chiapas, México, considerando cuatro localidades de muestreo por procedencia (40 en total). Se muestreó el suelo a 0.25 m y 0.30 m de distancia del tallo de la planta de piñón, y el volumen se etiquetó en bolsas plásticas y transportó en contenedor frío (hielera) al laboratorio.

Para determinar y estandarizar el protocolo *in vitro* que favoreciera el desarrollo de microorganismos, se realizaron ensayos con muestras de suelo del banco de una colección de *J. curcas* del INIFAP, usando dos medios de cultivo: 1) medio nutritivo (8 g L<sup>-1</sup> agar nutritivo, 15 g L<sup>-1</sup> agar bacteriológico) y 2) Agar Dextrosa Papa (39 g L<sup>-1</sup> agar dextrosa papa); tres pH: 4, 7 y 9; tres factores de temperatura: 20 °C, 30 °C y 40 °C y tres diluciones seriadas: 1:10, 1:100 y 1:1000, se consideraron como factores a evaluar sobre el desarrollo de unidades formadoras de colonias de microorganismos (UFC). Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C por 20 minutos vaciados en cajas Petri desechables de 60×15 (Madigan *et al.*, 2003), considerando cada caja Petri como una unidad experimental. De cada muestra de suelo se tamizaron 10 g para suspenderlo en 200 ml de agua destilada estéril, a partir de la cual se realizaron las diluciones seriadas. De cada dilu-

ción se tomaron 30 µL y se incubaron por 24 horas en las placas Petri previamente descritas y bajo las condiciones señaladas. Transcurrido el periodo de incubación, se realizó el conteo de microorganismos expresando los resultados como UFC (Unidades Formadoras de Colonias) mediante la fórmula  $UFC/g = N^{\circ} \text{ de colonias placa} \times \text{el inverso de la dilución} \times 10$ ; en donde: N° de colonia en placa = promedio del número de colonias contadas de 3 cuadrantes × 14 cuadrantes.

Para el aislamiento y crecimiento de microorganismos, se evaluaron las 40 muestras de suelo con el protocolo estandarizado con el fin de seleccionar microorganismos con actividad lipolítica, los microorganismos contenidos en cada muestra fueron sembrados en medios selectivos suplementados con Tributirina (10 % p/v)/Rodamina B e incubados por 24 h. Para la determinación de la actividad lipolítica, las placas fueron expuestas a luz UV, y para el análisis de resultados se empleó un diseño anidado, donde las localidades fueron anidadas a las procedencias, y las muestras anidadas a las localidades, además de una comparación de medias por Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

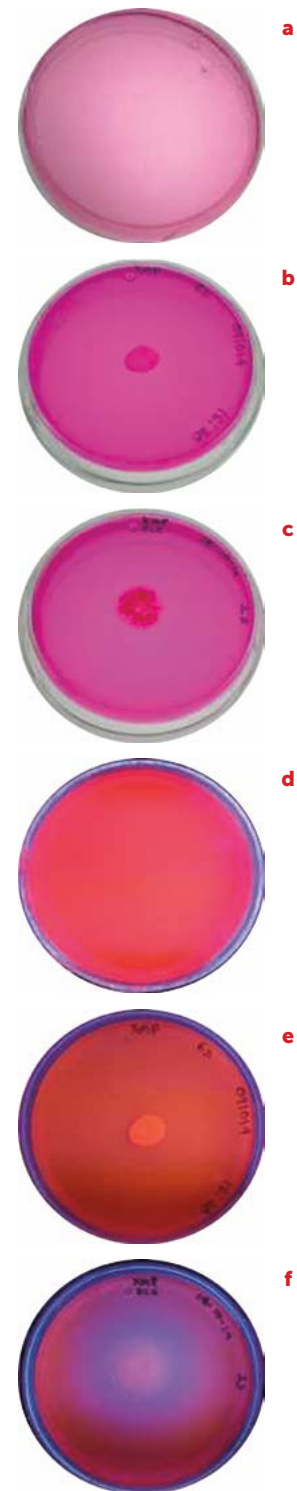
La muestra de suelo inoculada en el medio nutritivo con pH 7, 30 °C, y dilución 1:1000, fueron las condiciones apropiadas para el crecimiento de los microorganismos representativos de cada muestra de suelo (Cuadro 2). Se excluyeron las condiciones en donde no hubo crecimiento de microorganismos, tales como las condiciones ADP y medio nutritivo con pH 4 y 9, temperatura de 20 °C, 40 °C, y diluciones de 1:10 y 1:100. Si bien la dilución 1:10 favo-

reció el crecimiento de microorganismos; resultó excesiva pues imposibilitó el conteo y aislamiento; por lo que en este caso en particular la dilución elegida para las subsecuentes trabajos fue 1:1000. Se ha reportado, que un pH 7 en medios de cultivos permite el crecimiento de algunas especies de microorganismos (Khan, 2012; Gupta *et al.*, 2003; Kouker y Jaegar, 1987), sin embargo, factores como temperatura y dilución propician las condiciones adecuadas para inducir crecimiento de microorganismos. La expresión del crecimiento microbiano, denota la abundancia en especie de los mismos. En este estudio, el medio nutritivo se favoreció por que la mayoría de los microorganismos fueron bacterias y no hongos, ya que estos últimos crecen en medios con abundantes cantidades de carbohidratos, como es el ADP (Crueger y Crueger, 1993) (Cuadro 1).

Existió diferencia estadística entre promedios de los rangos de las UFC entre procedencias, donde la mayor expresión endógena de microorganismos se observó en la localidad ejido Durazno, seguido por ejido Coapa, pertenecientes a Pijijiapan, Chiapas; mientras que la menor expresión endógena se obtuvo al procesar las muestras del ejido Guadalupe Victoria, del municipio Villaflores, Chiapas (Cuadro 2).

Los microorganismos lipolíticos fueron evidenciados cuando se observó en el medio nutritivo suplementado con Rodamina B y tributirina la formación de un halo oscuro tras la exposición a Luz UV (Figura 1 f) (Shelley *et al.*, 1987; Davender *et al.*, 2012). La British Standard Institución en 1968, acepta el procedimiento de adicionar tributirina como método de selección de actividad lipolítica. La formación de halo, se debe a que la Rodamina B, que fluoresce bajo luz UV, ya que durante la hidrólisis de los triglicéridos, los ácidos grasos forman un complejo con la Rodamina B, que al ser expuesto a luz UV se aprecia la pérdida de fluorescencia, identificando una colonia lipolítica (Gupta *et al.* 2003; Sandoval y Marty, 2007).

El conocimiento de la morfología de la población microbiana con capacidad lipolítica es esencial para identificar el potencial que representan en el proceso de producción de biodiesel (Soto *et al.*, 1996), por ello, es necesario su caracterización química, y en este sentido, el aislamiento de las 75 colonias clasificadas como lipolíticas, se determinó la presencia de 60% Gram positiva, y 40% Gram negativa.



**Figura 1.** Microorganismos con capacidad lipolítica, evidenciada por medio selectivo suplementado con Rodamina B y tributirina. a) Medio nutritivo sin crecimiento microbiano, expuesto a luz blanca. b) y c) Medio con crecimiento microbiano expuesto a luz blanca. d) Medio selectivo sin inoculación de muestra expuesto a luz UV. e) Microorganismo sin capacidad lipolítica, expuesto a luz UV. f) Microorganismo con capacidad lipolítica evidenciado por formación de halo al ser expuesto a luz UV.

**Cuadro 1.** Promedio de unidades formadoras de colonias de microorganismos bajo diferentes condiciones de dilución, tipo de medio, pH y temperatura de incubación.

Factor evaluado	Promedio UFC
<b>Dilución</b>	
1:10	555574.41 a
1:100	74902.30 b
1:1000	710.50 c
<b>Medio de cultivo</b>	
Nutritivo	420791.11 a
Agar Dextrosa Papa	0.36 b
<b>pH del medio</b>	
4	0.19 b
7	631183.67 a
9	3.35 b
<b>Temperatura (°C)</b>	
20	20.15 b
30	631151.67 a
40	15.39 b
C.V.	0.12

Promedios con diferente letra por cada factor de estudio, son significativamente diferentes (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

**Cuadro 2.** Expresión endógena de microorganismos en medio nutritivo inoculado con muestras de suelos de 10 procedencias del estado de Chiapas, México.

Procedencia/ municipio	Ejido	Promedio UFC Ejidos	
Villaflores	Jesús María	429.5	abcd
	Villaflores	414.6	abcde
	Calzada	450.5	ab
	Gpe. Victoria	9	no
Chiapa de Corzo	Candelaria	166.4	hijklmn
	Emiliano Zapata	152.5	Jklmn
	Nandaburé	230.7	ghijkl
	Nucatili	171.5	hijklmn
Cintalapa	Zapotal	234.7	ghijkl
	Lázaro Cárdenas	258.7	fghijk
	Abelardo	242.6	fghujk
	Victoria	231.3	ghijkl
Tonalá	Bonito	86.46	mno
	Chocohuital	208.9	ghijklmn
	Herradura	280.8	efghij
	Cocos	315.6	bcdefg
Pijijiapan	Durazno	468.5	a
	Monte Cristo	379.5	abcdef
	Coapa	461.5	a
	Antonio	436.5	abc
Escuintla	Herencia	296	defhg
	San José	313.5	bcdefg
	Hermila	182.4	ghijklmn
	Colombia	96.5	lmno
Huehuetán	Pueblo	288.5	efghij
	Chamulapa	73.54	No
	Nejapa	228	ghijkl
	Amate	222.5	ghijklmn
Mazatán	Cortínez	179.5	ghijklmn
	Buenos Aires	300.2	cdefgc
	Raymundo	167.2	hijklmn
	Coatán	290.5	efghij
Tapachula	Madero	155	ijklmn
	Botella	125.7	klmno
	Florido	189.4	ghijklmn
	Zapata	181.8	ghijklmn
Tuxtla Chico	Izapa	199.6	ghijklmn
	Humoa	179.2	ghijklmn
	Gatica	156.6	ijklmn
	Lazos	164.8	hijklmn

Promedios con letra diferente indican diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

## CONCLUSIONES

Las condiciones apropiadas para inducir crecimiento de microorganismos fueron agar medio nutritivo/pH 7.0/Temperatura de 30°C/dilución 1:1000. Se identificaron y aislaron microorganismos con capacidad lipolítica, a partir de suelo recolectadas en Pijijiapan con mayor expresión endógena microbiana. Se identificaron 75 cepas con capacidad lipolítica en relación de 60:40 respecto a Gram positivas:negativas. Es recomendable caracterizar molecularmente el microorganismo aislado con capacidad lipolítica.

## LITERATURA CITADA

Clark A.M. 1996. Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceut. Res.* 13: 1133-1141.

Crueger W., Cureger A. 1993. *Biocología: manual de microbiología industrial.* Acirbia S.A, Zaragoza. Pp.: 254-255.

Davender K., Lalit K., Sushil A., Chand R., Rajinder P., Vijay G. 2012.

Demirbas A. 2007. Biodiesel production facilities from vegetable oils and animal fats, part A. *Energy Sources.* 29:133-141.

Gupta R. Rathi P., Gupta N., Bradoo S. 2003. Review, Lipase assays for conventional and molecular screening:an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry,* 37: 63-71.

Jiménez Q. 1999. *Cedrela odorata* L. Instituto Nacional de Biodiversidad. Costa Rica. *Vida Silvestre.* 27p.

Khan A. 2012. Research into biodiesel, kinetics and catalyst development, in Department of Chemical Engineering, University of Queensland: Brisbane, Queensland, Australia 20.

Kolesárová N., Hutňan M., Bodík I., Spalková V. 2011. Utilization of Biodiesel By-Products for Biogas Production. *Journal of Biomedicine and Biotechnol.* 2011:1-15.

Kouker G., Jaeger K.E., 1987. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Applied and Environmental Microbiology,* 53: 211-213

Madigan M., Martinko J., Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms.* Tenth Edition. Prentice Hall. Pearson Education, Inc. NJ. 160 p.

Mittelbach M.T.1988. Diesel fuels derived from vegetable oils. Emission tests. *Journal of American Oil Chemical Society.* 65:1185-1187.

Sandoval G., Marty A. 2007. Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme and Microbial Technology,* 40: 390-393.

Shelley A., Deeth H., MacRae C. 1987. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. *J. Microbiol. Methods* 6:123-137.

Snellman A., Colwell R. 2004. *Acinetobacter* lipases: molecular Biology, biochemical properties and biotechnological potential. *J and Microbiol Biotechnol* 31: 391-400.

Soto J., Gutiérrez T., Lemos A., Ortiz M., Pescador N., Varela L. 1996. Biodegradación y biotransformación de moléculas orgánicas. *Manual de Laboratorio de Ecología Microbiana.* Instituto Politécnico Nacional.

Zheng S., Shi Z., Wei Biao L. 2006. Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. *Biomass and Bioenergy.* 30: 267-272.