

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

**“PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS A PARTIR DE
MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS”.**

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA
MODALIDAD DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO

PRESENTA:

CYNTIA YURIDIA RÍOS RAMÍREZ

DIRECTOR INTERNO: Dra. Inés García Peña

DIRECTOR EXTERNO: M. en C. Carlos Eduardo Gómez Sánchez

México, D. F., mayo de 2009

Dedicado

A Dios, y mis padres

Agradecimientos

A mis padres por el amor infinito, el apoyo y comprensión que me han brindado, no solo a lo largo de mi carrera, sino de mi vida.

A mi familia, por la unidad y el cariño que nos tenemos, por estar en los momentos tanto difíciles como los gratos.

A mis amigos y compañeros, por compartir algunos años de estudio, y que nos han llevado a ser mejores, a los que han estado a mi lado y me han motivado a seguir en el camino, en especial a Víctor Juárez.

A mis profesores por los conocimientos aportados a mi enseñanza académica, a mis asesores la Dra. Inés García y el M. en C. Carlos Gómez por brindarme la oportunidad de colaborar con ellos, por el apoyo y asesoría brindada durante el proyecto de investigación, y finalmente al Instituto Politécnico Nacional por la oportunidad de estudiar en su institución educativa.

Y Claro sin olvidar a Hugo que sin su ayuda, todo hubiera sido más difícil en la biblioteca.

Cyntia Ríos

CONTENIDO

	<u>PÁGINA</u>
1. Resumen	6
2. Introducción	7
2.1. Bioetanol	7
2.2. Residuos lignocelulósicos y su composición	7
2.3. Sacarificación	10
2.4. Microorganismos productores de celulasas	11
2.5. Termófilos y enzimas termo resistentes	13
3. Justificación	14
4. Objetivos	15
4.1. Generales	15
4.2. Específicos	15
5. Hipótesis	15
6. Metodología	16
6.1. Recolección de muestras de compostas	16
6.2. Cámara húmeda	16
6.3. Aislamiento de microorganismos termófilos	18
6.4. Propagación y conservación de las cepas	18
6.5. Conteo del número de esporas	18
6.6. Selección de cepas con actividad celulolítica	18
6.7. Tratamiento del bagazo de caña	19
6.8. Fermentación en estado sólido	19
6.9. Fermentación sumergida en matraz	20
6.10. Actividad celulolítica sobre CMC	20
6.11. Determinación de azúcares reductores	20

CONTENIDO

	<u>PÁGINA</u>
6.12. Determinación de proteína	20
6.13. Evolución de pH	20
7. Resultados y Discusión	21
5. Conclusiones	29
6. Recomendaciones para trabajo futuro	29
7. Bibliografía	30
8. Anexos	31
10.1. Anexo 1 Preparación de Reactivos	31
10.2. Anexo 2 Cálculos para la fermentación en estado sólido	32
10.3. Anexo 3 Curva Estándar de Glucosa	33
10.4. Anexo 4 Curva Estándar de BSA	34

ÍNDICE DE TABLAS

	<u>PÁGINA</u>
Tabla 1 Composición de los substratos celulósicos.	8
Tabla 2 Principales residuos agrícolas producidos en México	8
Tabla 3 Microorganismos que hidrolizan la celulosa hasta glucosa	12
Tabla 4 Curva Estándar de Glucosa	33
Tabla 5 Curva Estándar de BSA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>PÁGINA</u>
Figura 1 Estructura de la celulosa, fragmento de la cadena de celulosa mostrando la celobiosa y la glucosa, conjuntamente con las enzimas que la hidrolizan	9
Figura 2 Microfibrillas de celulosa mostrando la región cristalina y amorfa	10
Figura 3 Interior de la Cámara Húmeda utilizada	17
Figura 4 Cámara Húmeda	17
Figura 5 Inoculación en estado sólido con la cepa M1A	19
Figura 6 Cepas termófila M1A	21
Figura 7 Cepa termófila M2B	21
Figura 8 Caja Petri con medio CMC con halo de hidrolisis	22
Figura 9 Evolución de proteína soluble en la fermentación	24
Figura 10 Actividad celulolítica en medio con bagazo de caña, en fermentación sumergida con inóculo de cepa M1A	25
Figura 11 Determinación de azúcares reductores	26
Figura 12 Determinación de pH de la cinética de producción de celulasas	27
Figura 13 Curva estándar de glucosa.	33
Figura 14 Curva tipo de Albúmina Sérica Bovina (BSA) [200 µg/mL] para la determinación de proteína.	34

RESUMEN

En el presente trabajo se aislaron tres cepas de hongos termófilos filamentosos M1A, M2B y M1C con un crecimiento óptimo entre 53-60°C. De las cepas antes mencionadas se selecciono la cepa M1A por su capacidad de producir celulasas, con esta se realizaron fermentaciones en estado sólido y líquido, siendo esta última la que produjo mejor resultado. Se evaluó la actividad celulolítica, proteína extracelular y azúcares reductores, obteniendo una actividad de 0.319 U/mL a 55°C y 200rpm.

INTRODUCCIÓN

Bioetanol

Algunos pronósticos señalan que las reservas de petróleo en los yacimientos mexicanos tendrán una duración menor a 15 años, por ello existe un interés particular económico y científico en la búsqueda de fuentes renovables alternativas a los combustibles fósiles derivados del petróleo, para atenuar el declive en la producción interna del petróleo y evitar que México se convierta en un importador neto de este valioso combustible. Como una fuente alternativa a estos combustibles derivados del petróleo se encuentra el etanol, alcohol procedente de restos vegetales, que se puede utilizar como biocombustible y utilizarlo por ejemplo como combustible en automóviles ^[21].

Resulta económicamente viable producir bioetanol cuando se produce de una manera sustentable como en el caso de Brasil a partir de la caña de azúcar o del maíz en Estados Unidos, pero en México no es conveniente producir bioetanol a partir del maíz ya que la producción del grano está destinada a cubrir las necesidades alimenticias de la población, y la caña de azúcar a la obtención de azúcar. ^[21]

Residuos lignocelulósicos y su composición

Debido a lo anterior se necesita encontrar otras alternativas para la producción de etanol, que resulten más eficientes y baratas como la hidrólisis del bagazo de caña, que es un material lignocelulósico considerado un residuo industrial. ^[20] Los residuos lignocelulósicos más útiles y más baratos para la producción de bioetanol serán los producidos en mayor cantidad en cada país, en México por ejemplo se dedica una gran cantidad de suelo a los cultivos agrícolas.

Tabla 1. Principales residuos agrícolas producidos en México. ^[17]

Cultivo	Producción anual de residuo (Ton/año)	Disponibilidad de celulosa
Maíz	110 658 675	Hojas, tallo y olote
Sorgo	12 448 040	Cascara y tallo
Bagazo de caña	12 000 000	Bagazo y hojas
Trigo	2 519 361	Cáscara y paja
Frijol	617 819	Tallo y cáscara
Arroz	506 527	Cáscara y paja

En la tabla 1 se mencionan los principales residuos agrícolas lignocelulósicos producidos en México y su producción anual. Los residuos lignocelulósicos son considerados como desecho industrial por parte de los ingenios azucareros, las plantas productoras de papel y manufactureras de madera. Estas industrias producen este material en grandes cantidades resultando así una fuente barata, ^[10] además de constituir un vasto recurso renovable su aprovechamiento despierta interés para la biotecnología.

Tabla 2. Composición de los substratos celulósicos. ^[14, 16]

Substrato	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera (angiospermas)	40-55	24-40	18-25
Madera (Gimnospermas)	40-50	25-35	25-35
Hierbas	25-40	25-50	10-30
Hojas	15-20	80-85	-
Periódicos	40-55	25-40	18-30
Residuos de la fabricación del papel	60-80	20-30	1-10
Bagazo de caña	44	20-25	10
Paja de maíz	30-40	30	15
Frijol (hoja y tallo)	33	10	-
Paja trigo	30-40	25-30	14.5
Paja cebada	25-40	25-40	10-30

La composición del material lignocelulósico está formada por los polisacáridos, hemicelulosa, celulosa, y el polifenol lignina principalmente. La tabla 2 muestra algunos residuos lignocelulósicos y su composición porcentual de celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa,

es el principal polisacárido de las plantas leñosas y fibrosas, (como los árboles y las hierbas), es el polímero más abundante de la biosfera, [7] su función es dar rigidez estructural a las plantas, componente básico de los vegetales y su producción supera a la de los demás productos naturales; aproximadamente la mitad de la biomasa producida fotosintéticamente es celulosa. Los restos vegetales presentes en el suelo están formados por un 45% de celulosa (valor promedio), por lo que la celulosa ocupa junto con el CO₂ una posición central en el ciclo del carbono. [11]

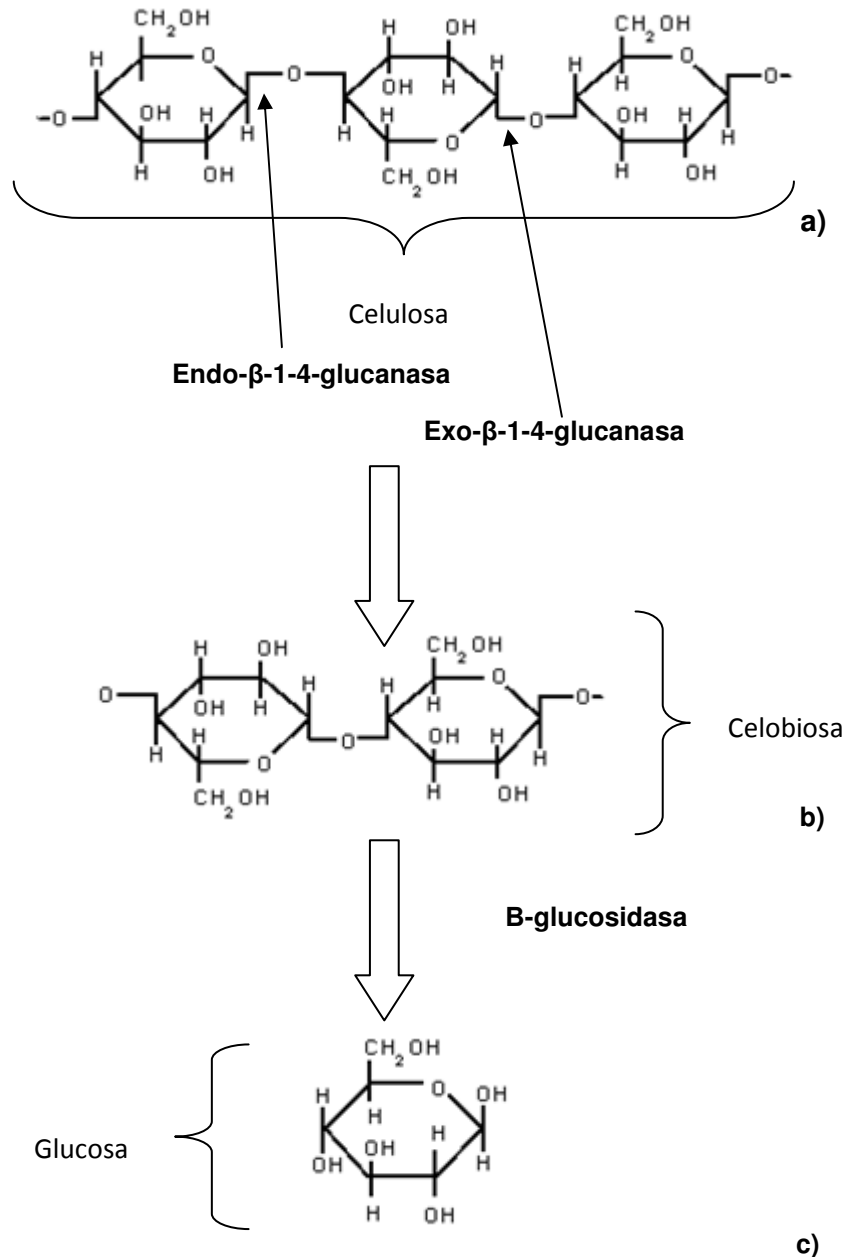


Figura 1. Estructura de la celulosa conjuntamente con las enzimas que la hidrolizan.

La figura 1a se observa la estructura de celulosa, un polisacárido lineal formado por unidades de glucosa unidas en las posiciones 1 y 4 mediante un enlace β .^[12] Para la degradación de la celulosa se necesita de tres enzimas, primero la Endo- β -1-4-glucanasa rompe las cadenas de celulosa para formar varias moléculas como el dímero de celobiososa o el trímero de celotriosa (Figura 1b), posteriormente la Exo- β -1-4-glucanasa separa las unidades de celobiososa y celotriosa de los extremos de las cadenas de celulosa y por último la β -glucosidasa rompe la molécula de celobiososa para formar monómeros de glucosa (Figura 1c).

En la pared celular, las cadenas de la celulosa se unen para formar filamentos largos y delgados denominados microfibrillas, estas en combinación con los restantes materiales de la matriz, suministran la rigidez y la resistencia mecánica necesarios para las planta, estas microfibrillas actúan en la misma forma que las varillas de refuerzo lo hacen en el concreto.^[7]

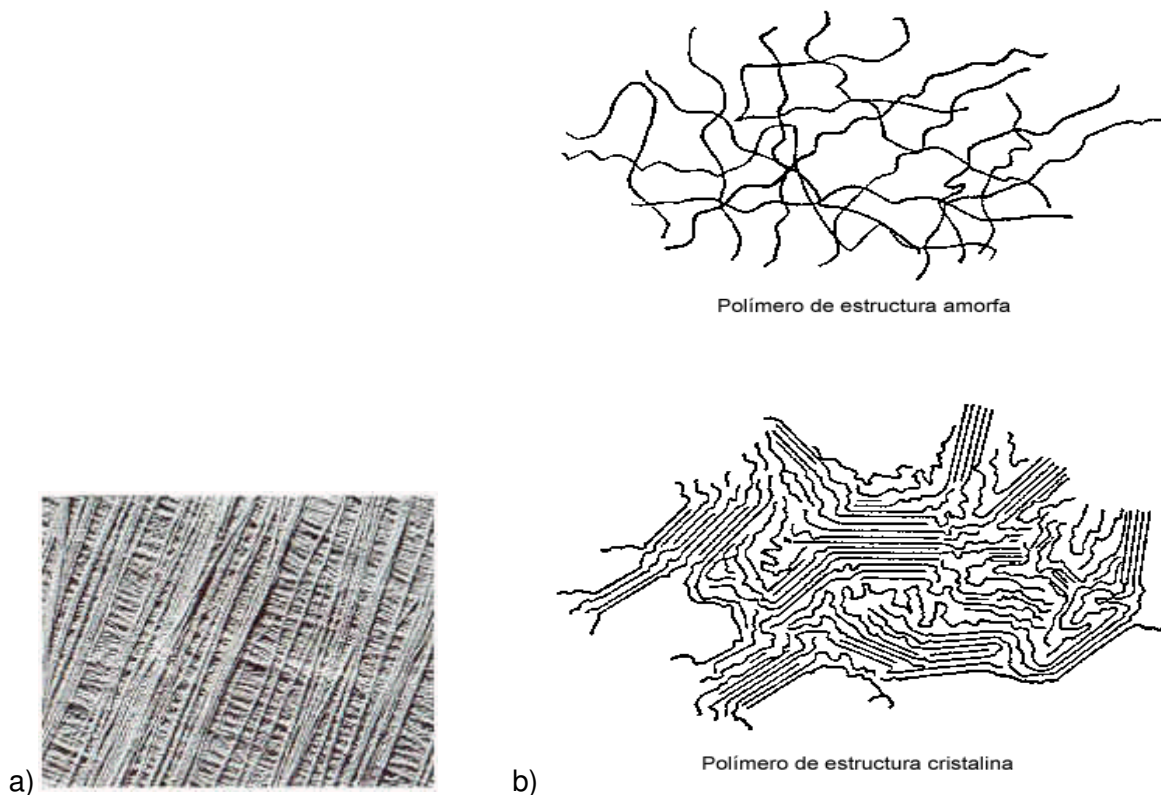


Figura 2. a) Microfibrillas de celulosa b) celulosa cristalina y celulosa amorfa.

En la imagen de la figura 2a se muestra una fotografía de las microfibrillas vistas desde un microscopio electrónico aumentado 10 000 veces, en la figura 2b se muestran los dos tipos de celulosa, una región formada por moléculas de celulosa altamente ordenadas, denominada zona cristalina, y la otra región de celulosa con moléculas notablemente menos ordenadas, que

se denominan región amorfa o para cristalina, ^[12] esta zona se forma cuando a lo largo de las cadenas se rompen los puentes de hidrógeno que unen la celulosa. ^[13]

Sacarificación

El material lignocelulósico puede ser utilizado como sustrato por una diversidad de microorganismos. ^[17] Al degradarlo por acción de celulasas se obtienen azúcares fermentables como la glucosa y xilosa a este proceso se le llama sacarificación. ^[7] Estos azúcares constituyen la materia prima principal en fermentaciones para la obtención de combustibles líquidos como el etanol o bien como combustibles gaseosos (metano), aminoácidos y otros productos. ^[9] Para la obtención de bioetanol a partir de material lignocelulósico se requiere de tres pasos principales el primero es la obtención de celulasas para romper el material lignocelulósico para obtener moléculas más pequeñas como la celobiosa o la celotriosa. El segundo paso es la sacarificación de dichas moléculas hasta la obtención de azúcares fermentables como la glucosa y xilosa. Finalmente el tercer paso es la fermentación de estos azúcares para así obtener bioetanol.

Microorganismos productores celulasas

Se conocen microorganismos mesofílicos que producen estas celulasas y que llevan a cabo la sacarificación del material lignocelulósico por medio del sistema enzimático de celulasas. ^[17] Entre los microorganismos que podemos mencionar es el hongo *Trichoderma viridae* que en 1959 T. Reese aisló y describió. Posteriormente Reese aisló también a *Trichoderma reesei*; existen suficientes trabajos que demuestran la capacidad de este hongo para producir un sistema enzimático de celulasas, aunque tiene la desventaja de no hidrolizar lignina y tener bajos niveles de β -glucosidasa. En dichas investigaciones se reporta que la cantidad de enzima es baja. Este microorganismo posee dos β -glucosidasas extracelulares y una de ellas está en mayor proporción y representa el 98% del total de la actividad de β -glucosidasa con un peso molecular de 35 000 kD y la otra β -glucosidasa que se encuentra en menor proporción con un peso molecular de 13 000kD. ^[17] *Aspergillus niger* es otro hongo muy estudiado como productor de β -glucosidasa extracelular; esta es activa a pH bajos, además de altas concentraciones de etanol. Otro de los hongos que se ha estudiado como buen productor de β -glucosidasa es *Aspergillus terreus* el cual reportan que ha producido niveles de β -glucosidasa como los de *Trichoderma reesei* además con este hongo se tiene una gran ventaja ya que puede lograr fermentar la glucosa que produce al hidrolizar la celulosa y ésta la convierte en etanol. ^[18]

Tabla 3. Microorganismos que hidrolizan la celulosa hasta glucosa.

Tipo de Microorganismo		Microorganismo
Hongos	Mesófilos	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Trichoderma koningi</i> <i>Trichoderma lignorum</i> <i>Penicillium funiculosum</i> <i>Penicillium variable</i> <i>Penicillium iriense</i> <i>Aspergillus wentii</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus foetidus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Polyporus adustus</i> <i>Polyporus tulipiferae</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium lini</i> <i>Sclerotium rolfsii</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Armillariella mellea</i> <i>Schizophyllum commune</i> <i>Monilia sp.</i>
	Termófilos	<i>Chaetomium thermophile</i> <i>Humicola sp.</i> <i>Sporotrichum thermophile</i> <i>Thermoascus aurantiacus</i> <i>Talaromices emersonii</i>
Bacterias	Mesófilas	<i>Cellvibrio filvus</i> <i>Cellvibrio gilvus</i> <i>Cellvibrio vulgaris</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Acetovibrio cellulolyticus</i> <i>Streptomyces flavogriseus</i> <i>Ruminococcus sp.</i> <i>Cellulomonas sp.</i>
	Termófilas	<i>Clostridium thermocellum</i>
Actinomicetos	Mesófilos	<i>Streptomyces sp.</i>
	Termófilos	<i>Termomonospora sp.</i> <i>Termoactinomyces sp.</i>

En la tabla 3 se enlistan los microorganismos capaces de producir celulasas a partir de celulosa como fuente de carbono y energía e hidrolizarla hasta la obtención del polisacárido glucosa. En la tabla se clasifican dichos microorganismos de acuerdo al tipo de microorganismo, y el rango de temperatura a la que estos crecen.

Termófilos y enzimas termoestables

Algunos microorganismos tienen la capacidad de crecer de manera óptima en ambientes físicos o químicos extremos, tales como, temperaturas altas desde 45 °C, o muy bajas 15 °C, concentraciones salinas con requerimiento de NaCl bajos (1-6%), pH extremos como especies que pueden crecer por debajo de pH 2 o por encima de 10 por mencionar algunos ejemplos. Estos organismos son llamados extremófilos ^[1], dentro de los cuales, existen los termófilos, microorganismos cuya temperatura óptima se encuentra entre 45-80°C. ^[3]

Las enzimas termoestables o extremoenzimas que producen los microorganismos termófilos tienen ventajas sobre los microorganismos mesófilos en procesos industriales y biotecnológicos porque producen enzimas con propiedades valiosas como mayor termo estabilidad, óptima actividad a temperaturas elevadas y altas tasas de hidrólisis de sustrato. ^[3] El término extremoenzimas no solo se refiere a las enzimas que funcionan a temperaturas extremadamente altas sino a aquellas que funcionan de forma óptima en cualquier ambiente extremo como los descritos anteriormente.

Las extremoenzimas de los termófilos e hipertermófilos están siendo utilizadas, cada vez más, como biocatalizadores en las aplicaciones industriales y también en técnicas en la investigación que requieren enzimas. Un ejemplo de ello es la DNA polimerasa aislada del termófilo *Thermus aquaticus*, esta enzima conocida como *taq polimerasa*, se usa para la duplicación del DNA en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica muy importante para la amplificación de secuencias específicas de DNA. ^[3]

JUSTIFICACIÓN

La celulosa es uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal que es degradada por una serie de microorganismos mediante la acción de varias enzimas, como en los hongos filamentosos y en algunos actinomicetos o formando un complejo denominado "celulosoma", como en los clostridios y en bacterias del rumen. ^[12] Estas enzimas han sido ampliamente estudiadas en hongos mesófilos, tales como *Trichoderma reesei*. ^[7] Sin embargo, sus actividades hidrolíticas son afectadas por una serie de factores físicos y químicos que limitan su aplicación a nivel industrial.

Por ello, existe la necesidad de aislar cepas con mejores rendimientos en la cantidad de enzimas liberadas al medio extracelular y que mantengan la calidad intrínseca de dichas enzimas, además que presenten una elevada estabilidad de su actividad a pH extremos, solventes orgánicos, detergentes iónicos y principalmente la de mantener su actividad enzimática a elevadas temperaturas de reacción. Por esta razón, los microorganismos termófilos han sido sugeridos como fuentes alternativas de celulasas por la termoestabilidad de sus enzimas, propiedad ventajosa en aplicaciones industriales como la sacarificación. ^[22, 23]

OBJETIVOS

Generales:

- Aislar un microorganismo termofílico capaz de degradar celulosa.

Específicos:

- Aislar microorganismos a partir de una planta de composta capaces de crecer a 60 °C.
- Determinar la capacidad de los microorganismos aislados de degradar celulosa a temperaturas mayores a 60 °C
- Realizar fermentaciones en estado sólido y líquido con las cepas seleccionadas como degradadoras de celulosa.
- Medir actividad celulolítica en el caldo de fermentación para identificar al microorganismo que produzca mayores niveles de celulasas a temperaturas por arriba de 60 °C

HIPÓTESIS

Las celulasas producidas por microorganismos extremófilos degradan más eficientemente la celulosa.

METODOLOGÍA

Recolección de muestras de compostas

Se recolectaron diez diferentes muestras de lugares con posibilidad de existir microorganismos capaces de hidrolizar material lignocelulósicos, estos lugares fueron las compostas de la Unidad Profesional Adolfo López Mateos (M1A, M2A, M1B, M2B, M1C, M2C) y de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (M1D, M2D, M1E, M2E).

El criterio de selección de las muestras fue a) que fuera una composta, ya que en el interior de estas se llega a tener una temperatura de hasta 80 °C, b) que la composta tuviera material lignocelulósico como madera, papel, bagazo, plantas, etc. c) que a simple vista existieran microorganismos.

Las muestras se recolectaron en bolsas de plástico con cierre hermético, dichas muestras se tomaron de la parte superior de la composta y del interior de esta. La calve M1A significa, M: muestra, 1: que se tomo de la parte de arriba de la composta 2: del interior de la composta y A: es para diferenciarla de las demás pilas de composta.

Cámara Húmeda

Para el aislamiento de las cepas termofílicas se utilizó una cámara húmeda, para evitar la pérdida de agua por evaporación a 60°C. En la figura 3 podemos observar el interior de la misma y la colocación de las cajas en ella, esta consta de un recipiente de plástico donde se introdujo papel absorbente de cocina mojado adherido a las paredes del recipiente, manteniendo de esta forma la humedad de las cajas Petri, así mismo el papel adherido a las paredes de la cámara se volvía a humedecer cada tres días.

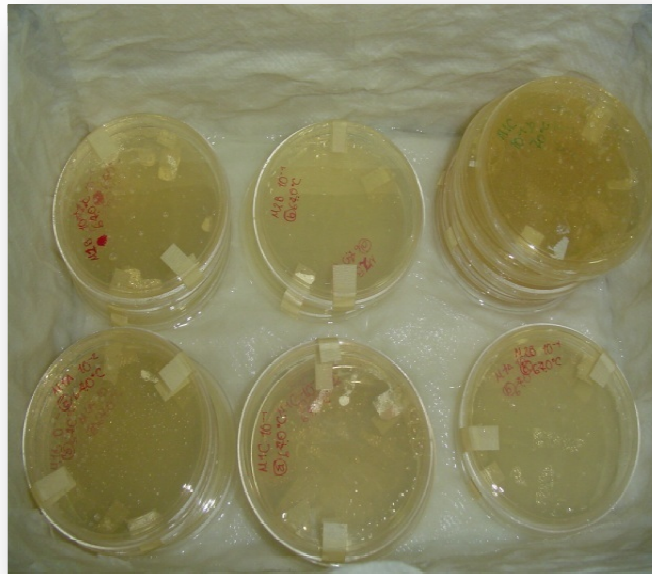


Figura 3. Interior de la cámara húmeda. Podemos observar claramente el papel absorbente adherido a las paredes con agua, de tal forma que se crea un ambiente húmedo.

En la figura 4 se encuentra una fotografía exterior de la cámara húmeda, en la cual se puede ver la tapa de la misma, esta tiene seis orificios, para la ventilación y que de esta forma exista la entrada de oxígeno así como la salida de gases que puedan producir los microorganismos.



Figura 4. Cámara Húmeda. Tenemos una vista lateral de la cámara utilizada para evitar la evaporación del agua en las cajas Petri a 60 °C.

Aislamiento de los microorganismos termófilos

Una vez recolectadas las muestras y acondicionada la cámara húmeda las muestras recolectadas se trataron de la siguiente forma: Se esterilizó un matraz Erlenmeyer con 250g de muestra en 500 mL de agua destilada y posteriormente se realizaron diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , cada dilución se sembró por triplicado en medio PDA por extensión con varilla. Finalmente se incubaron a 60 °C en una incubadora, dentro de la cámara húmeda para evitar evaporación del agua en el medio de cultivo de las cajas Petri.

Propagación y conservación de las cepas

Las cepas fueron propagadas en cajas Petri en medio comercial PDA, e incubadas a 60 °C durante 360 h en una cámara húmeda.

La conservación de las cepas seleccionadas se realizó con glicerol al 10% y colocadas en refrigeración a -4°C.

Conteo del número de esporas

El número de esporas se contó para el control del inóculo en los experimentos y así poder tener repetitividad, para el conteo de esporas se utilizó una cámara de Newbauer de 0.0025 mm². En la cual se colocó una gota de la solución de esporas recuperadas en glicerol, a la cual se tapó con un cubre objetos y se pone al microscopio electrónico para contar las esporas presentes en uno de los cuadrantes, este número fue de 43 esporas.

El cálculo para determinar el número de esporas por ml de solución de esporas fue el siguiente:

$$(43) (4) (1) (2\ 500) = 430\ 000 \text{ esporas / mL}$$

Donde 4 es el número de cuadrantes, 1 el factor de dilución ocupado y 2 5000 el área de la cámara.

Selección de cepas con actividad celulolítica

Para este ensayo se realizó un medio de cultivo sólido que contenía medio de sales (ver anexo 1 Preparación de reactivos), 1.5% de Agar - Agar, y carboximetilcelulosa (CMC) al 1.0% como única fuente de carbono, se sembraron tres diluciones de 1000, 100 000 y 1 000 000 esporas cada una de las cepas termófilas aisladas M1A, M2B y M1C; mismas que se incubaron a 60°C en la cámara húmeda antes mencionada, hasta observar crecimiento sobre el medio.

Posterior al crecimiento se agregó el colorante Rojo Congo procurando tapar toda la caja. Se tiene una prueba positiva cuando se forma un halo de hidrólisis (transparente) y una prueba negativa cuando el halo de hidrólisis no aparece.

Tratamiento del bagazo de caña

El material lignocelulósico utilizado para las fermentaciones realizadas, fue el bagazo de caña, obtenido de un ingenio azucarero.

El tratamiento dado fue el lavado con agua corriente para eliminar el exceso de azúcares que pudieran estar presentes y evitar de esta manera falsos positivos, después del lavado se dejó secar a temperatura ambiente, una vez seco fue molido finamente y tamizado con una malla # 35 Tyler, esta malla tiene una abertura de malla de 0.417 mm y un diámetro del hilo de 0.0309 cm.

Fermentación en estado sólido

Después de realizar la selección de la cepa productora de celulasas, se procedió a la fermentación en estado sólido. El inóculo para esta fermentación consistió en cortar un centímetro cuadrado del crecimiento de la cepa cultivada previamente en una caja Petri, este centímetro cuadrado se colocó boca abajo para tener contacto con el bagazo de caña y de esta manera propagarse figura 6. El medio contuvo bagazo de caña y medio de sales (ver anexo 1. Preparación de reactivos).



Figura 5. Inoculación de la cepa M1A en bagazo de caña para la fermentación en estado sólido.

Fermentación sumergida en matraz

A la par de la fermentación en estado sólido se realizaron fermentaciones sumergidas. El inóculo fue de 1 000 000 de esporas por cada 100 ml de medio (ver anexo 1 Preparación de Reactivos) y ajustado a pH 5 e incubado a 55 °C por siete días a 200 rpm.

Se tomaron muestras cada 24 h, de 5 mL cada una en condiciones estériles, que se filtraron al vacío con papel filtro.

Actividad Celulolítica sobre Carboximetilcelulosa (CMC)

En el ensayo se colocó 0.5 mL de CMC 1%, 0.4 mL de buffer de acetatos (ver anexo 1 Preparación de Reactivos) y 0.1 mL de filtrado enzimático obtenido de la fermentación. Se incubó durante 12 h a 60 °C, transcurrido el tiempo la reacción se detuvo adicionando 2 mL de DNS (ver anexo 1 Preparación de Reactivos). Se calentó en un baño maría por cinco minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 6 mL de agua destilada, finalmente se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro a 575 nm.

La concentración de azúcares reductores producidos por la acción de las celulasas se calculó interpolando en una curva tipo de glucosa (ver anexo 3 Curva Estándar de Glucosa).

Determinación de Azúcares reductores

Los azúcares reductores presentes en el filtrado enzimático se determinaron por la técnica DNS, colocándose 0.1 mL de muestra, 0.9 de agua destilada y 2 mL de DNS (ver anexo 1 Preparación de Reactivos). La mezcla de reacción se calentó en un baño maría por cinco minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 6 mL de agua destilada, finalmente se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro a 540 nm.

Determinación de Proteína

Esta fue cuantificada por el método de Bradford. Se colocaron 0.25 mL de filtrado enzimático y 0.75 mL del reactivo de Bradford (ver anexo 1 Preparación de Reactivos), se agitó y se dejó desarrollar el color por 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó a 595 nm.

La cuantificación de la proteína se determinó con la interpolación de una curva tipo usando como estándar Albúmina de Sérica Bovina (BSA) (ver anexo 4 Preparación de Reactivos)

Evolución de PH

Se determinó con un potenciómetro, se tomaron 5 mL de filtrado enzimático y se midió el pH.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de los microorganismos termófilos

Se aislaron tres cepas de las compostas de la unidad profesional Adolfo López Mateos, estas fueron las cepas M1A, M2B y M1C las tres con morfología de hongo filamentoso color blanco



Figura 6. Cepa M1A aislada en el laboratorio, con capacidad de producir celulasas.



Figura 7. Cepa M2B.

En la figura 6 y 7 podemos observar que el crecimiento de las cepas M1A y M2B, desafortunadamente no contamos con una fotografía de la cepa M1C. Podemos ver a simple vista que el crecimiento de la cepa M1A es mayor y podemos mencionar que también es mayor que la cepa M1C, este mayor crecimiento en las cajas no indica que la cepa M1A sea la cepa con mayor producción de celulasas sino solo del crecimiento.

Las tres cepas crecen en un intervalo de temperatura entre 53 y 63 °C, por lo que consideramos termófilas.

Selección de cepas con actividad celulolítica

Después del aislamiento primario, las cepas se incubaron en el medio de selección donde se obtuvo el crecimiento de la cepa M1A. Como el medio de cultivo está compuesto de CMC con una concentración del 1% (como única fuente de carbono), se puede considerar que la cepa M1A es una cepa productora de celulasas porque puede crecer en celulosa para desarrollar su crecimiento sobre este medio de cultivo. Por lo tanto se descartaron las otras dos cepas como productoras de celulasas. Sin embargo pueden ser productoras de xilanasas, ligninasas o pectinasas, enzimas que también ayudan a degradar el material lignocelulósico, por lo que a las cepas M2B y M1C no se descartaron completamente, sino que hay que realizarles ensayos de determinación de estas otras enzimas.



a)

Figura 8. a) Caja Petri con medio CMC. Se observa el halo de hidrólisis donde antes existió crecimiento, b) Caja Petri con medio CMC sin halo de hidrolisis.



b)

En la figura 8a se observa el ensayo realizado para la cepa M1A para determinar su actividad celulolítica, en esta imagen se aprecian halos de hidrólisis donde antes había crecimiento del hongo que indican que la cepa produce celulasas, mientras que en la imagen 8b se muestra una caja Petri de la cepa M2B sin halo de hidrólisis, indicando una prueba negativa para la producción de celulasas.

Fermentaciones con bagazo de caña como fuente de carbono

En las fermentaciones en estado sólido en condiciones de 55 °C e hidratación continua del medio, no se obtuvieron resultados favorables, por lo que se prefirió la fermentación sumergida.

Se realizaron tres fermentaciones sumergidas en matraz, de la cepa M1A seleccionada como productora de celulasas.

Como sabemos la degradación de la celulosa se lleva a cabo por tres enzimas la primera endo- β (1-4)-glucanasa que ataca los enlaces β -1,4 en el interior de la macromolécula simultáneamente y forma fragmentos de cadenas con los extremos libres. La segunda es la exo- β -1,4-glucanasa esta elimina los extremos no reductores de la cadena al disacárido celobiosa y la ultima enzima es la β -glucosidasa que hidroliza la celobiosa con formación de glucosa.

En este trabajo las enzimas celulolíticas fueron analizadas en sobrenadantes obtenidos a partir de filtrados obtenidos de la fermentación sumergida de la cepa M1A hongo filamentoso termófilo. A las muestras obtenidas se les determinó la cantidad de proteína extracelular, actividad celulolítica, azúcares reductores, y pH.

Determinación de Proteína

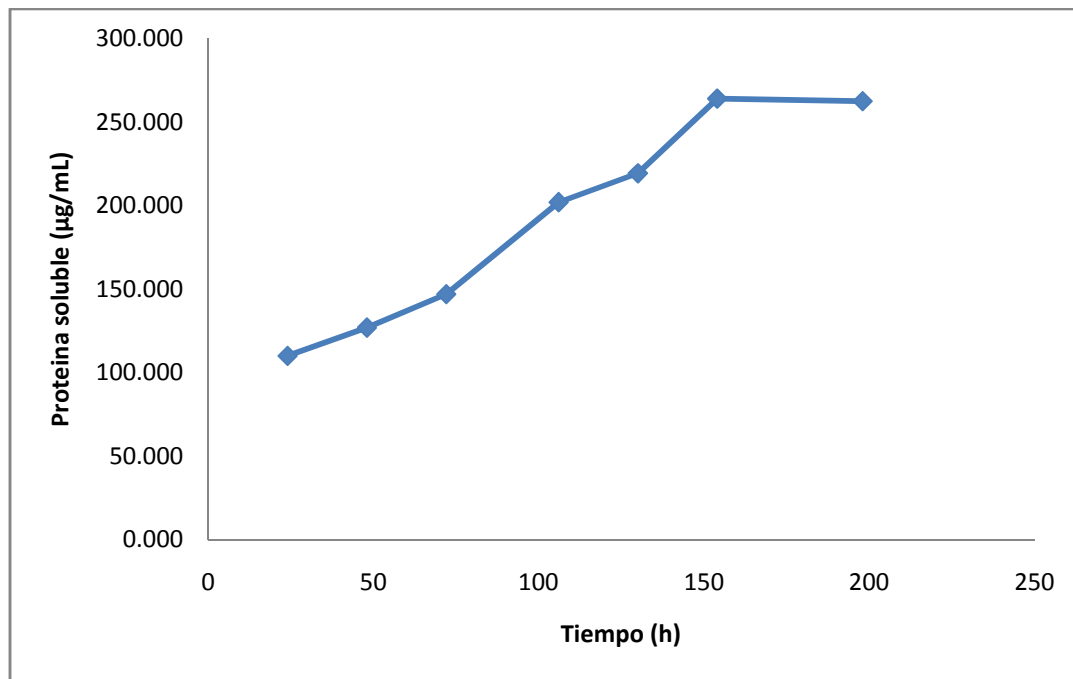


Figura 9 Evaluación de proteína soluble extracelular en la cinética de producción de celulasas por un hongo filamentoso termófilo. T=55 C; 200 rpm

En la grafica de la figura 9 se observa el aumento de la de la proteína soluble extracelular a lo largo de la fermentación, teniendo una concentración máxima de 262.308 µg / mL a las 198 h., el aumento de la proteína indica de una manera indirecta el crecimiento del hongo en la fermentación y la presencia de celulasas por lo anterior mencionado el crecimiento del hongo va en aumento. Sin embargo el aumento de proteína no es directamente proporcional al incremento de la producción de celulasas por lo que se realizo la determinación de azúcares reductores y la actividad celulolítica.

Las enzimas producidas por dicho hongo son extra celulares, lo cual facilita su recuperación

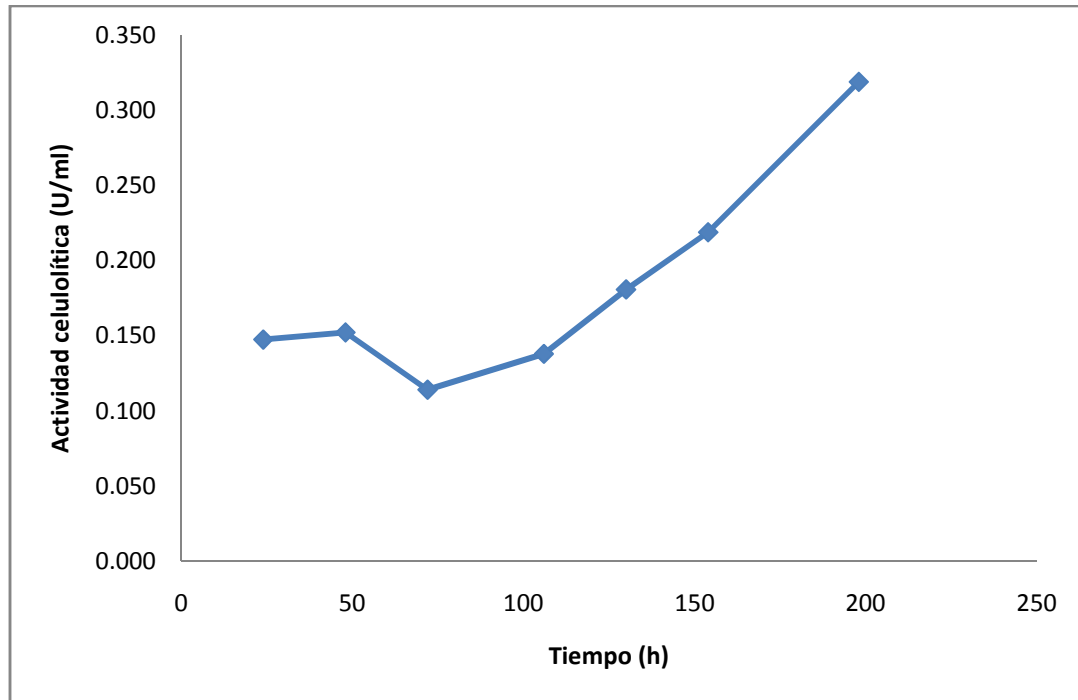
Actividad Celulolítica sobre Carboximetilcelulosa (CMC)

Figura 10. Actividad celulolítica en medio con bagazo de caña, en fermentación sumergida con inoculo de cepa M1A. T=55 C; 200 rpm

Se puede observar en la figura 10 la actividad celulolítica sobre bagazo de caña utilizando la cepa M1A; la actividad máxima obtenida fue de 0.319 $\mu\text{mol} / \text{ml}$ a las 198 h. Comparando la actividad celulolítica de la referencia bibliográfica con microorganismos mesófilos en cultivos mixtos con *Aspergillus terreus* y *Penicillium sp.*, sobre carboximetilcelulosa obtuvieron una actividad máxima de 4.4 U / mL^[7]. Con microorganismos termófilos *Thermoascus auranticus* de menor temperatura de incubación 49 °C en fermentación en estado sólido la referencia reporta un crecimiento de 1572 U / g^[19]

La concentración de las preparaciones enzimáticas se puede expresar en términos de su actividad, para estandarizar el reporte de las actividades de la enzima la *Comission on Enzymes of the International Union of Biochemistry* ha definido una unidad estándar: Unidad Internacional (UI) que se define como “la cantidad de enzima necesaria para producir un μmol de producto por minuto, en condiciones definidas”.^[8]

En este trabajo una U de actividad se define como la cantidad de celulasa necesaria para producir un μmol de glucosa por minuto, en fermentación sumergida a 55 °C y 200 rpm.

Determinación de Azúcares reductores

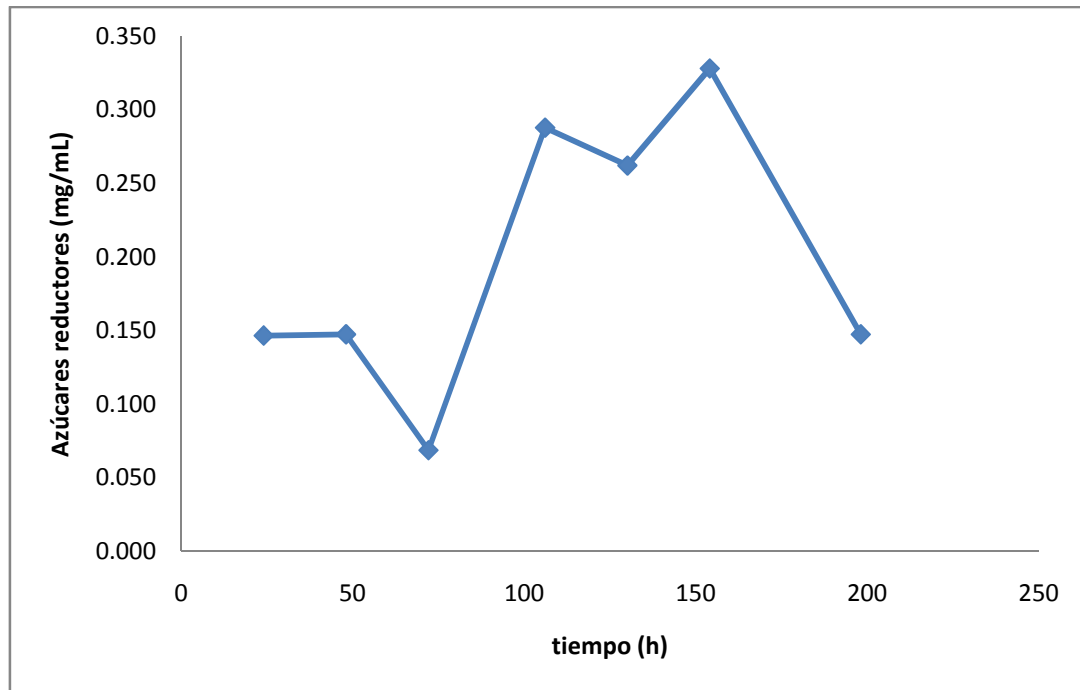


Figura 11. Determinación de azúcares reductores con CMC 1%, Gráfica de fermentación sumergida con inóculo de cepa M1A. T=55 C; 200 rpm

La figura 11 muestra la cantidad de azúcares reductores liberados al medio por acción de las celulasas en mg / mL, con una cantidad máxima obtenida de 3.28 mg / mL a las 154 h. La gráfica de la figura 12 cuantifica los miligramos de azúcares producidos por la acción de las enzimas sobre el bagazo de caña, evidenciando la presencia de celulasas y su actividad, podemos observar que en el inicio de la gráfica a las 24 horas tenemos una buena cantidad de azúcares en el medio, quizá aunque se lavo el bagazo quedaron residuos de azúcares pero es mínimo, recordemos que es bagazo utilizado para extraer azúcar en un ingenio azucarero. Podemos observar que los primeros tres puntos muestran pocos azúcares liberados, pero al cuarto punto tenemos un aumento mucho mayor de estos azúcares, que nos indica también la fase logarítmica en el crecimiento del hongo.

Determinación de pH

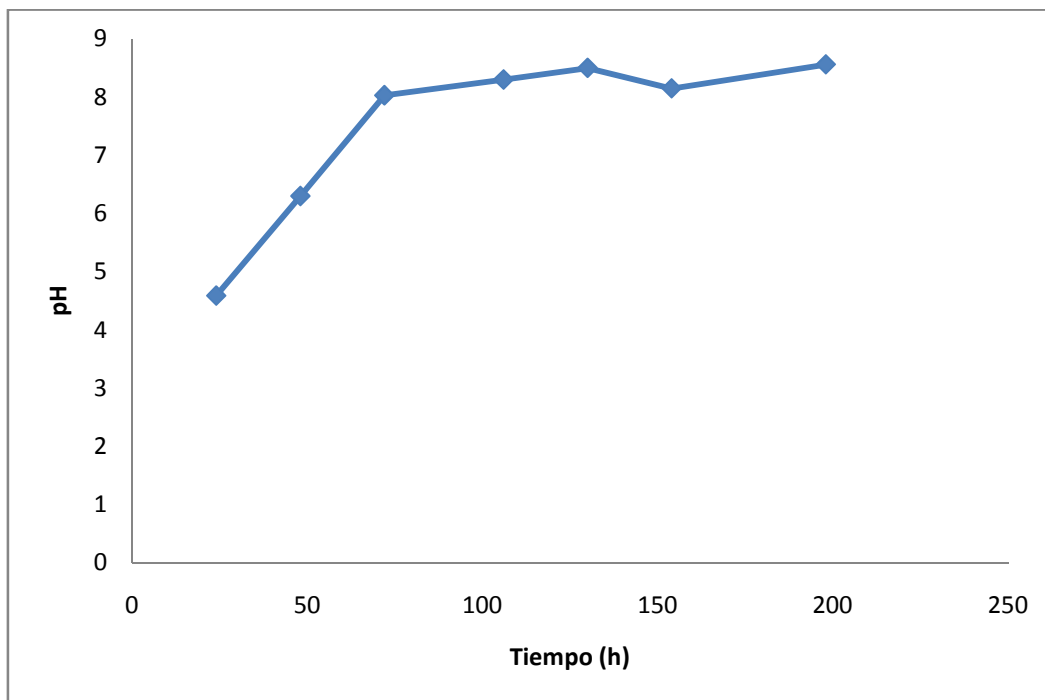


Figura 12. Determinación de pH a través del tiempo de la cinética de producción de celulasas por un hongo filamentos termófilo. T=55 C; 200 rpm.

En la figura anterior se muestra la variación de pH con respecto al tiempo en la fermentación sumergida, para la producción de celulasas, donde podemos observar que el pH máximo alcanzado por el hongo fue 8.56 a las 198 h, pudiendo decir que el pH se fue estabilizando en el rango de pH 8. La cinética se ajustó a un pH de 5.

Realizando un análisis general de los resultados podemos mencionar que en la figura 9 se encuentra la gráfica de la evolución de la proteína soluble en la cinética, esta es una forma indirecta de medir el crecimiento del hongo, así como también de las enzimas extracelulares presentes en el medio. La figura 10 muestra la actividad celulolítica que el hongo libera al medio para degradar la celulosa. La figura 11 indica la presencia de azúcares reductores en el medio que provoca la acción de las celulasas sobre el sustrato en este caso el bagazo de caña y finalmente la figura 12 nos da una idea de cómo afecta el pH en las condiciones de crecimiento del hongo y la producción de este de celulasas extracelulares.

Podemos observar el que en la primer muestra a las 24 horas tenemos un valor inicial de en la concentración de proteína, esto se debe a que en el medio de cultivo tiene extracto de levadura, que es un extracto soluble en agua de un autolisado de células de levaduras seleccionadas rico

en proteínas, a las 48 horas no se percibe un gran aumento en esta producción, hasta este momento esta actividad y los azúcares reductores muestran una tendencia igual al aumento de proteína; al tercer punto que son a las 72 horas observamos un descenso en la actividad celulolítica y los azúcares reductores esto se puede explicarse debido a un arreglo del metabolismo del hongo, quizá por adaptarse a la producción de celulasas para obtener azúcares reductores o por que las celulasas se pegaron al sustrato para hidrolizarlo, lo cual se confirma con en el aumento de pH de 6.30 a 8.03. Después de esta reorganización en el metabolismo del hongo observamos en el cuarto punto el inicio de la fase logarítmico del crecimiento y su continuo crecimiento de proteína soluble, actividad celulolítica y azúcares reductores hasta llegar a la actividad máxima de nuestra cinética pero no de nuestro hongo ya que se puede observar en la figura 10 que la actividad celulolítica sigue en aumento y no llega a una fase estacionaria o de decaimiento, por lo anterior podemos decir que se necesita realizar una fermentación donde se analicen los mismos parámetros pero que dure más tiempo de tal forma que se pueda observar la actividad celulolítica máxima del hongo.

Lo que si podemos observar en la figura 9 una estabilidad de la producción de proteína soluble, y en la figura 11 una disminución de azúcares reductores que indica que el hongo está dejando de crecer, esto como lo hemos mencionado anteriormente puede ser por, inhibición de producto en este caso la glucosa que comprende más del 70% de los azúcares solubles liberados de la celulosa por el crudo enzimático. [22]

Comparando la actividad celulolítica de la referencia bibliográfica con microorganismos mesófilos en cultivos mixtos con *Aspergillus terreus* y *Penicillium sp.*, sobre carboximetilcelulosa obtuvieron una actividad máxima de 4.4 U / mL. Con microorganismos termófilos *Thermoascus auranticus* de menor temperatura de incubación 49 °C en fermentación en estado sólido la referencia reporta un crecimiento de 1572 U / g. [19] Lo anterior indica que obtuvimos una actividad muy baja 0.319 U/mL comparada con esta referencia, pero es importante tomarlo en cuenta pues es difícil encontrar microorganismos que degraden celulosa a altas temperaturas y la cepa M1A degrada celulosa a 55 °C. Otro de los motivos por los que obtuvimos una actividad baja es porque el papel del inóculo juega un papel fundamental, y nosotros inoculamos con 1 000 000 de esporas por cada 100 mL de medio, siendo que la cantidad estandarizada es 1 000 000 esporas por cada mL de medio, este si duda es un factor que retraso el crecimiento del hongo y altero el resultado de los experimentos realizados. Además de esto el pH no se mantuvo estable, se pudo evidenciar con la gráfica de pH la modificación del hongo por adaptarse a las condiciones en que se encuentra y la variación del mismo conforme fue creciendo el hongo.

CONCLUSIONES

- Se aislaron tres cepas M1A, M2B y M1C termófilas con una temperatura de crecimiento entre 53-60 °C, de las cuales se determinó que la cepa M1A es la única que presenta actividad celulolítica.
- La cepa M1A es un hongo termófilo filamentoso con la capacidad de producir celulasas a partir de bagazo de caña en fermentaciones sumergidas en condiciones de 55 °C y 200 rpm.
- Las enzimas secretadas por el hongo pueden ser mayores con un inóculo de 1 000 000 esporas por mL de medio.

RECOMENDACIONES PARA TRABAJO FUTURO

Se recomienda que al trabajar con esta cepa se cultive en un medio mínimo antes de utilizarlo en fermentaciones, para que este bien adaptada previamente a las condiciones de austeridad, caracterizar la cepa. Se sugiere realizar una electroforesis a un zimograma específico para la actividad de cada enzima, lo que permite saber con más exactitud la cantidad de enzima presente en los filtrados de fermentación. Además de purificar y caracterizar las enzimas extracelulares al crecer M1A. Utilizar otros residuos lignocelulósicos, para evaluar también su degradación con la cepa y optimizar las condiciones de producción (pH, agitación) para obtener mejores rendimientos.

REFERENCIA

1. Moat Albert G., "Microbial Physiology" fourth edition, WILEY-LISS, Page. 25
2. Peña Días Antonio, "Bioquímica", Editorial LIMUSA, pág. 193
3. Bock," Biología de los microorganismos", 10ª edición, Edición Prentice Hall, Pág.152-155, 973
4. Warren L. McCabe, Operaciones Básicas de Ingeniería Química 4ª edición, Editoreal Mc GRAW-HILL Pág. 1090.
5. Academia de Bioquímica, Manual de Laboratorio de Bioquímica General, Edición 1999, UPIBI. Pág. 34
6. Matheus Christopher K., "Bioquímica", Tercera Edición, Editorial Addison Wesley Pág. 335
7. Muñoz Soto Balam, Optimization en la producción de celulasas mediante cultivo mixto con *Aspergillus terreus* (CH-M-013) y *Penicillium sp.* (CH-M-001), Informe final de proyecto terminal UPIBI-IPN.
8. Segel Irwin H., "Enzyme kinetics", 1993, A whiley-Interscience Publication, Pag. 78
9. Bisaria V., Mishra S. 1989, "Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion Critical Reviews in biotechnology pág. 61-94
10. Dale B. 1987, "Lignocellulose conversion and the future of fermentation biotechnology TIBTECH pág. 287-291
11. Schlegel Hans G., "Microbiología General", Editoreal OMEGA, Pág. 455
12. Casey James P, "Pulpa y Papel Química y Tecnología Química", Vol. 1 Editoreal LIMUSA, Pág. 34,37,41
13. Mejia C. T., Mújical L. F., González R. A. y Ortega L. J., 2002, "Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología. Avance y perspectiva. Sept-Oct 2002, pág. 267-271
14. Crueger, 1998, "Manual de Microbiología Industrial", 3ª edición, Acribia, Pág. 361-362
15. De la Torre Mayra 1988, "Utilización de los recursos celulósicos, Ed. IPN-CINVESTAV
16. Tsao G. & Chang L., 1978, "Cellulose and Hemicellulose Technology. Annual reports on fermentation process, Vol.2, D. Perlman, Pág. 297-322
17. Orozco Suarez Sandra, 1992, "Alternativas biológicas para mejorar la hidrólisis de residuos lignocelulósicos", C.D. Universitaria, Pág. 7

18. Esteban Martínez Rosa 82002), "Selección de hongos filamentosos productores de beta glucosidasa por fermentación sumergida", Informe final de proyecto terminal UPIBI-IPN, Pág. 16
19. E. Kalogeris, "Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes", Biotechnology Laboratory, Chemical Engineering Department, National Technical University of Athens, 5 Iroon Polytechniou Str, Zografou Campus, 15700, Athens, Greece, Received 22 April 2002; received in revised form 12 July 2002; accepted 22 August 2002, *Process Biochemistry* 38 (2003)1099-1104.
20. Mark P. Taylor, Kirsten L. Eley, "Thermophilic ethanologensis: future prospects for second-generation bioethanol production" Institute for Microbial Biotechnology and Metagenomics (IMBM), 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.tibtech.2009.03.006
21. Mustafa Balat, "Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel" Volume 86, issue 11, November 2009, Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO 1**PREPARACIÓN DE REACTIVOS****Solución de DNS**

Para preparar 500 mL de DNS se mezclan los siguientes reactivos en el siguiente orden.

- a) 7 g NaOH
- b) 3.5 g DNS
- c) 50 g Tartrato de Sodio y Potasio
- d) 2.7 ml Fenol
- e) 2.95 g Meta bisulfito de sodio

Disolver en 500 mL de agua destilada, y guardar en frasco ámbar en lugar oscuro.

Formulación del medio de cultivo para fermentación sumergida [g/100 ml]

- Medio de sales
 - Extracto de levadura 1.00
 - KH_2PO_4 0.15
 - K_2HPO_4 0.15
 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.14
- Bagazo de caña 1.00

Buffer de Acetatos 100 mM pH 5.5

- Solución A (Ácido acético 0.2 M)
11.5 ml de ácido acético glacial, aforar a 1 L
- Solución B (Acetato de Sodio 0.2 M)
27.2 g de acetato de sodio ($3\text{H}_2\text{O}$), aforar a 1 L

Mezclar en las siguientes proporciones para obtener el pH deseado

Solución A (mL)	Solución B (mL)	pH
436	37	3.6
255	245	4.6
148	352	5.0
98	452	5.6

Medio de Cultivo Agar Papa y Dextrosa (PDA)

Se disuelven 39 g de medio en 1 L de agua destilada, y se calienta hasta diluir, se esteriliza a 121 °C por 15 min; se deja enfriar un poco y se vierte en cajas Petri.

ANEXO 2

CÁLCULOS PARA LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

La capacidad máxima de retención de agua del bagazo de caña se encuentra entre 50 – 60%, los cálculos realizados para determinar la cantidad de medio de cultivo a agregar a la fermentación sólida fueron los siguientes:

$$H = \frac{g_{H_2O}}{g_{SS} + g_{H_2O}} = \frac{g_{H_2O}}{g_{SH}}$$

Donde:

$g_{H_2O} \equiv$ gramos de agua

$g_{SS} \equiv$ gramos de sustrato sólido

$g_{SH} \equiv$ gramos de sustrato húmedo

como: $g_{SS} = 2.32g$; $g_{SH} = 11.42$ (datos experimentales)

$$\therefore H = \frac{g_{H_2O}}{g_{SS} + g_{H_2O}} = \frac{g_{H_2O}}{g_{SH}}$$

$$(g_{SH}) + g_{H_2O} = g_{H_2O} (g_{SS} + g_{H_2O})$$

$$g_{SH} \cdot g_{H_2O} = g_{H_2O} \cdot g_{SS} + g_{H_2O}^2$$

$$\frac{g_{SH} \cdot g_{H_2O} - g_{H_2O}^2}{g_{H_2O}} = g_{SS}$$

$$\frac{g_{H_2O} (g_{SH} - g_{H_2O})}{g_{H_2O}} = g_{SS}$$

$$g_{SS} = g_{SH} - g_{H_2O}$$

$$g_{H_2O} = 11.42 - 2.32 = 9.1$$

$$g_{H_2O} = 9.1$$

ANEXO 3

CURVA ESTÁNDAR DE GLUCOSA

TABLA 4. Curva estándar de glucosa

Curva Tipo de Glucosa					
Tubo	Glucosa 1% (mL)	Agua (mL)	DNS (mL)	Abs. 575nm	[Glucosa mg/mL]
B	0	2	2	0	0
1	0.2	1.8	2	0.08	0.1
2	0.4	1.6	2	0.211	0.2
3	0.6	1.4	2	0.343	0.3
4	0.8	1.2	2	0.469	0.4
5	1	1	2	0.585	0.5
6	1.2	0.8	2	0.735	0.6
7	1.4	0.6	2	0.805	0.7
8	1.6	0.4	2	0.926	0.8
9	1.8	0.2	2	1.023	0.9
10	2	0	2	1.148	1

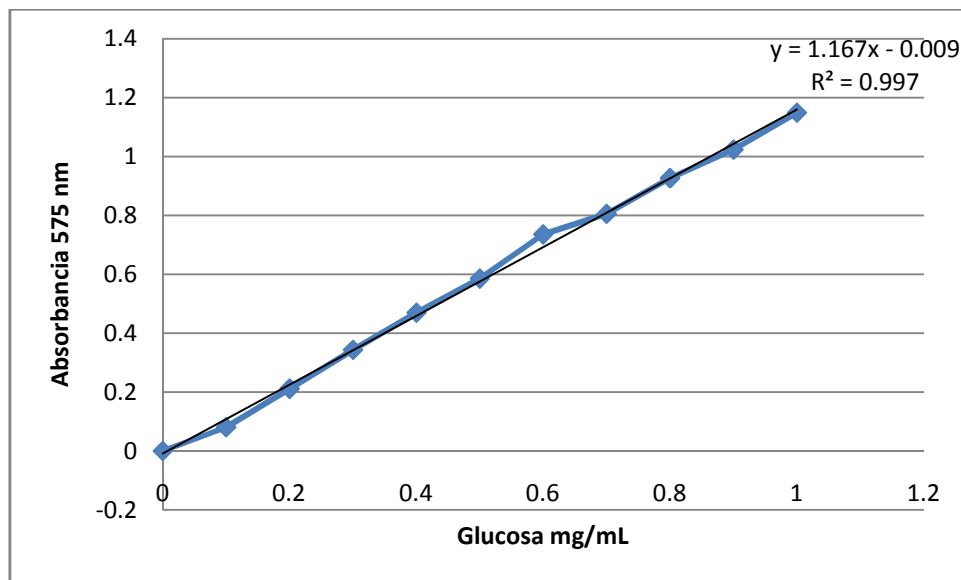


Figura 13. Curva tipo de glucosa para la determinación de la actividad celulolítica y azúcares reductores.

Como R^2 es aproximadamente 1, la ecuación $y = 0.584x - 0.009$ es válida, despejando "x" queda $x = (y + 0.009) / 0.0584$, donde "y" es la absorbancia de la muestra y "x" es la concentración que deseamos conocer.

ANEXO 4

CURVA ESTÁNDAR DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

TABLA 5. Curva estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA) [200µg/mL]

Curva Tipo Bradford					
Tubo	BSA [200µg/ml] (ml)	Agua Destilada (ml)	Reactivo Bradford (ml)	[BSA] (µg/ml)	Abs. 595nm
B	0	0.25	0.75	0	0
1	0.025	0.225	0.75	20	0.334
2	0.05	0.2	0.75	40	0.565
3	0.075	0.175	0.75	60	0.827
4	0.1	0.15	0.75	80	1.105
5	0.125	0.125	0.75	100	1.114
6	0.15	0.1	0.75	120	1.19
7	0.175	0.075	0.75	140	1.253
8	0.2	0.05	0.75	160	1.329
9	0.225	0.025	0.75	180	1.351
10	0.25	0	0.75	200	1.403

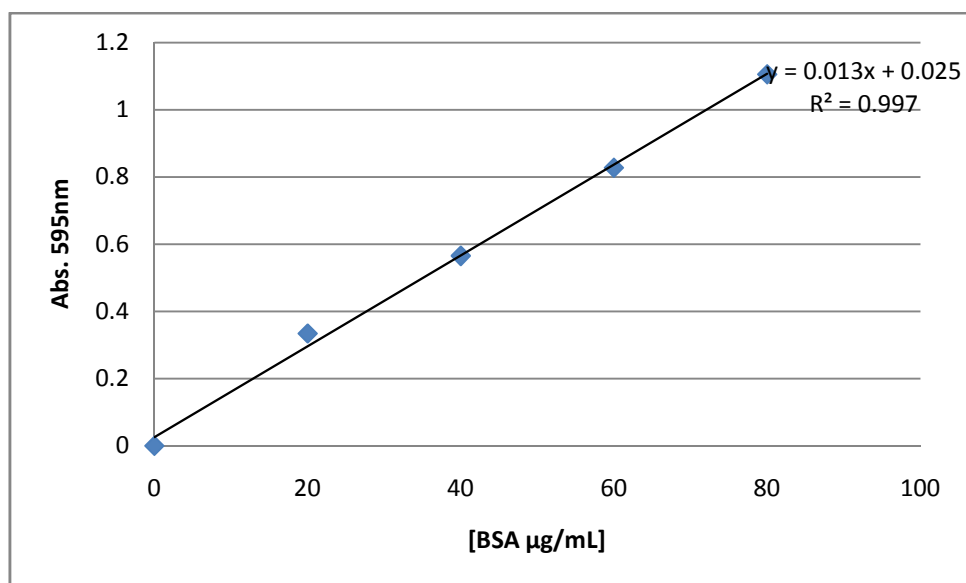


Figura 14. Curva tipo de Albúmina Sérica Bovina (BSA) [200µg/mL] para la determinación de proteína. Como R^2 es aproximadamente 1, la ecuación $y = 0.013x + 0.025$ es válida, despejando "x" queda $x = (y - 0.025) / 0.013$, donde "y" es la absorbancia de la muestra y "x" es la concentración que deseamos conocer.