

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Profesional de Biología Microbiología

**“PRODUCCIÓN DE CELULASAS BACTERIANAS
TERMOESTABLES UTILIZANDO PAPEL PERIÓDICO
RECICLADO COMO SUSTRATO”**

Tesis presentada por

Bach. Héber Esaú Ramírez Arua

Para optar el Título Profesional de

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 301

TÍTULO PROFESIONAL DE:
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

El Secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias certifica que con la Resolución de Facultad N° 8911-2017-FACI/UNJBG, ha designado como jurados para la sustentación de la tesis: "PRODUCCIÓN DE CELULASAS BACTERIANAS TERMOESTABLES UTILIZANDO PAPEL PERIÓDICO RECICLADO COMO SUSTRATO", el mismo que está conformado por:

PRESIDENTE	: Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
MIEMBRO	: Dra. Isabel Ancco Oliva
SECRETARIO	: Mgr. Soledad Bornás Acosta

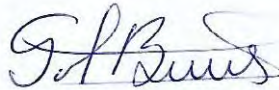
Para examinar y calificar el trabajo de Tesis, sustentado en acto público el día martes 08 de agosto del 2017, presentado por el bachiller **HÉBER ESAÚ RAMÍREZ ARUA** de la Escuela Profesional de Biología Microbiología.

El jurado calificador, en forma individual y secreta, emitió su calificación, con el siguiente resultado: **APROBADO** por **UNANIMIDAD**, con el calificativo de sobresaliente, con tres votos a favor y promedio de diecisiete (17).

Para ratificar lo detallado, firman:



Dra. Isabel Ancco Oliva



Mgr. Soledad Bornás Acosta



Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina

“La ciencia no solo es una disciplina de la razón, sino también del romance y de la pasión”.

(Stephen Hawking)

DEDICATORIA

Dedico este trabajo, en primer lugar, a Dios, por darme la oportunidad de vivir, por fortalecerme y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi madre Brigilia Arua (QEPD), por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y darme una carrera para mi futuro, todo esto te lo debo a ti.

A mi hermana Aidé, por ser la presencia física de mi madre en mi hogar, con quien atravesé grandiosos y difíciles momentos; por su apoyo incondicional, sus obras y gestos que directa o indirectamente repercutieron en la elaboración de esta tesis.
¡Gracias!

Mis hermanos German y Javier Jaime. Mi sobrina Angie Lizeth, por brindarme compañía y apoyarme, los quiero mucho.

A mis amigos, que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional, Fiorela Virginia, Lisseth Sadia, Juan Carlos, Israel, Helena, Ana Julyssa, José Jordán, Ariadna y Cristina por compartir los buenos y malos momentos.

A los maestros, aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario, y aquellos que ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis. Todos aquellos familiares y amigos que no recordé al momento de escribir esto. Ustedes saben quiénes son.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincera gratitud a todas las personas y entidades que, de una u otra forma, han hecho posible la realización de este trabajo, y muy especialmente.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica que, a través del cofinanciamiento con el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, me concedieron gran parte de los materiales que me ha permitido llevar a cabo los trabajos para realizar esta Tesis.

A mi asesor, el Mgr. Roberto Castellanos Cabrera, catedrático del Departamento de Biología, jefe del Laboratorio de Bioquímica; quien me brindó el lugar físico para el desarrollo de mis actividades, en donde sus consejos, esfuerzos y perseverancia, hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Dra. Ana Cristina Ebrecht, catedrático auxiliar e integrante en el grupo de investigación del Laboratorio de Enzimología Molecular, perteneciente al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral – CCT Santa Fe / CONICET – Argentina, quien me instruyó en estrategias de separación y purificación de enzimas, cuyas experiencias han permitido la culminación de este trabajo.

A mi familia y amigos, que han estado involucrados de múltiples formas en cada una de las partes que componen este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIACIONES.....	xvi
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Problema.....	1
1.1.1. Antecedentes.....	1
1.1.2. Planteamiento.....	2
1.1.3. Formulación.....	4
1.1.4. Justificación.....	4
1.2. Hipótesis.....	6
1.3. Objetivos.....	6
1.3.1. Objetivo general.....	6
1.3.2. Objetivos específicos.....	6
II. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. Celulosa.....	8
2.2. Naturaleza del papel periódico.....	11
2.3. Reciclaje del papel periódico.....	12
2.4. Degradación de la celulosa por microorganismos.....	13
2.5. Productos de degradación de la celulosa e importancia industrial.....	14
2.6. Celulasa.....	15

2.7. Evaluación de la actividad de celulasas.....	18
2.7.1. Celulasas totales.....	19
2.8. Ensayo cualitativo con Rojo Congo [3,3'-([1,1'-bifenil]-4,4'-diyl) bis(4aminonaftalen-1-ácido sulfónico) de sodio].....	19
2.9. Ensayo cuantitativo con DNS [ácido 3,5- dinitrosalicílico].....	20
2.10. Factores que influyen en la actividad de celulasas.....	21
2.10.1. Sinergismo.....	22
2.10.2. Adsorción.....	22
2.11. Aplicación industrial de las celulasas.....	23
2.12. Identificación bacteriana por secuenciación del gen ARNr 16S.....	24
III. METODOLOGÍA.....	27
3.1. Estrategia de trabajo.....	27
3.1.1. Ubicación y delimitación del área de estudio.....	27
3.1.2. Población y muestra.....	28
3.1.2.1. Población.....	28
3.1.2.2. Muestra.....	28
3.1.3. Diseño estadístico de los experimentos.....	28
3.2. Materiales.....	31
3.2.1. Microorganismos utilizados.....	31
3.2.2. Reactivos.....	31
3.2.3. Equipos.....	32
3.3. Métodos.....	33

3.3.1. Mantenimiento del material biológico.....	33
3.3.1.1. Reactivación de bacterias y determinación de pureza.....	33
3.3.1.2. Caracterización macroscópica y microscópica.....	33
3.3.2. Cuantificación de proteínas totales.....	34
3.3.3. Pretratamiento y proceso del papel periódico.....	35
3.3.4. Producción de celulasas.....	35
3.3.4.1. Caracterización cualitativa de actividad.....	35
3.3.4.2. Caracterización cuantitativa de actividad.....	36
3.3.4.2.1. Inóculo y condiciones de cultivo.....	36
3.3.4.2.2. Determinación de actividad celulolítica.....	37
3.3.4.2.2.1. Celulasas totales.....	37
3.3.4.2.2.2. β -Glucosidasas.....	40
3.3.5. Determinación de componentes influyentes y niveles óptimos en el medio fermentativo.....	40
3.3.6. Recuperación, separación y purificación.....	43
3.3.7. Caracterización funcional de celulasas totales.....	44
3.3.7.1. Determinación del efecto al cambio de pH.....	44
3.3.7.2. Determinación del efecto al cambio de temperatura.....	44
3.3.7.3. Determinación de la estabilidad térmica.....	45
3.3.8. Identificación molecular de la bacteria selecta.....	45
3.3.9. Procesamiento y análisis de datos.....	46

IV. RESULTADOS.....	48
4.1. Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias.....	48
4.2. Selección de una bacteria modelo.....	49
4.2.1. Por carácter cualitativo de la actividad enzimática.....	50
4.2.2. Por carácter cuantitativo de la actividad enzimática.....	54
4.3. Identificación molecular por análisis de secuenciamiento del gen	
ARNr 16S de la bacteria modelo.....	57
4.4. Optimización del medio fermentativo.....	58
4.4.1. Selección de componentes influyentes.....	58
4.4.2. Maximización y predicción de la respuesta.....	63
4.5. Contraste de la recuperación de celulasas totales.....	69
4.6. Separación y purificación de la β -glucosidasa.....	70
4.6.1. Cromatografía de intercambio iónico (IEX).....	70
4.6.2. Análisis electroforético de proteínas (SDS-PAGE).....	71
4.7. Caracterización funcional de celulasas totales.....	73
4.7.1. Efecto del cambio de temperatura sobre la actividad.....	73
4.7.2. Efecto del cambio de pH sobre la actividad.....	75
4.7.3. Estabilidad térmica.....	76
V. DISCUSIÓN.....	79
VI. CONCLUSIONES.....	83
VII. RECOMENDACIONES.....	85
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
IX. ANEXOS.....	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos.....	12
Tabla 2.	Bacterias con alta actividad específica de celulasas.....	14
Tabla 3.	Resumen de los valores de entrada en el ANOVA para la comparación de promedios de actividad celulolítica por efecto del pH y la temperatura.....	30
Tabla 4.	Resumen de los valores de entrada en el ANOVA para la determinación de la termoestabilidad enzimática.....	31
Tabla 5.	Detalle del ensayo enzimático de celulasas totales.....	35
Tabla 6.	Cuadro resumen de valores de entrada para el ANOVA de pH vs AE.....	44
Tabla 7.	Cuadro resumen de valores de entrada para el ANOVA de temperatura vs AE.....	45
Tabla 8.	Descripción de diámetros de hidrólisis como respuesta de actividad de celulasas en papel periódico.....	51
Tabla 9.	Comparación múltiple de Duncan para los promedios del diámetro de la zona de hidrólisis	52
Tabla 10.	Actividad de celulasas totales en el tiempo.....	54
Tabla 11.	Comparación múltiple de Duncan para los promedios generales de actividad en FPU.mL ⁻¹	56

Tabla 12.	Similitud de secuencias del gen ARNr 16S en BLASTN.....	57
Tabla 13.	Componentes del medio fermentativo y niveles de prueba para el experimento de Plackett-Burman.....	59
Tabla 14.	Diseño experimental aleatorizado de Plackett-Burman para evaluar los factores que influyen en la producción de celulasa.....	60
Tabla 15.	Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman.....	61
Tabla 16.	Niveles de las variables elegidas para el experimento de optimización Box-Behnken.....	63
Tabla 17.	Respuesta de la actividad celulolítica influenciada por X1, X2 y X3 en el experimento Box-Behnken.....	64
Tabla 18.	Análisis de varianza para actividad celulasa.....	66
Tabla 19.	Resumen de valores de salida del optimizador de respuesta con meta a maximizar actividad celulasa.....	67
Tabla 20.	Comparación de resultados mediante indicadores de producción.....	69
Tabla 21.	Actividad promedio de celulasas totales frente a la variación de temperatura.....	73
Tabla 22.	Análisis ordinario de varianza para la media de actividad celulolítica por efecto de temperatura.....	74
Tabla 23.	Actividad promedio de celulasas totales frente a la variación del pH.....	75

Tabla 24.	Análisis ordinario de varianza para la actividad por pH.....	75
Tabla 25.	Actividad residual de celulasas totales frente a tiempos de exposición y temperaturas de tratamiento.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura molecular de la celulosa.....	9
Figura 2.	Mecanismo de degradación de la celulosa por sinergismo de las enzimas.....	10
Figura 3.	Dibujos esquemáticos de la disposición de zonas con afinidad acuática y enlaces puente de hidrógeno.....	18
Figura 4.	Estructura molecular del Rojo Congo.....	20
Figura 5.	Reducción del 3,5-dinitrosalicilato a 3-amino-5-nitrosalicilato...	21
Figura 6.	El ribosoma bacteriano, esquema de su estructura, subunidades y macromoléculas que lo componen.....	25
Figura 7.	Estructura secundaria del ARNr 16S.....	26
Figura 8.	Distribución porcentual del tamaño, forma y borde colonial.....	49
Figura 9.	Distribución porcentual de las bacterias con mayor actividad celulolítica según diámetro de hidrólisis > 10 mm.....	50
Figura 10.	Distribución de los diámetros de la zona de hidrólisis por bacteria productora de celulasas.....	53
Figura 11.	Actividad celulolítica de las bacterias evaluadas por día de fermentación.....	55
Figura 12.	Efecto de las condiciones ambientales sobre la producción de celulasa.....	62

	Gráficos tridimensionales que muestran la superficie	
Figura 13.	respuesta afectada por las variables de cultivo durante la producción de enzimas celulolíticas.....	68
Figura 14.	Cromatograma de intercambio aniónico.....	71
Figura 15.	Análisis electroforético de la purificación por IEX de la enzima β -glucosidasa.....	72
Figura 16.	Curva de temperatura para la actividad de celulasas totales...	74
Figura 17.	Curva de pH para la actividad de celulasas totales.....	76
Figura 18.	Curvas de actividad residual frente a tiempos de exposición....	77
Figura 19.	Diagrama de barras del porcentaje de actividad residual frente a las temperaturas de tratamiento.....	78

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Características macroscópicas de las colonias de las 18 bacterias reactivadas.....	99
Anexo 2.	Tinción Gram de las 18 bacterias reactivadas.....	100
Anexo 3.	Fotografías del estriado por agotamiento de los 18 cultivos bacterianos reactivados.....	102
Anexo 4.	Fotografías del campo microscópico de 1000x de los 18 cultivos bacterianos sometidos a tinción Gram.....	111
Anexo 5.	Visualización de zonas de hidrólisis originado por celulasas. Revelado con Rojo Congo 0.1 % (p/v) pH 6,0.....	114
Anexo 6.	Curva de calibración del reactivo Bradford.....	115
Anexo 7.	Curva de calibración del reactivo DNS.....	116
Anexo 8.	Análisis de varianza de diámetro de zona de hidrólisis por actividad de celulasas.....	117
Anexo 9.	Análisis de varianza de medias generales de actividad en FPU de las bacterias FT-4, CB-13, TM-12 y Cel-7.....	117
Anexo 10.	Glosario de términos.....	118
Anexo 11.	Pulpa de papel periódico tratado para utilización en ensayos de fermentación.....	121
Anexo 12.	Ensayos de fermentación sumergida según el experimento de Plackett-Burman.....	121

	Cuantificación de proteínas solubles de las fracciones	
Anexo 13.	colectadas durante la cromatografía de intercambio aniónico por método de Bradford.....	122
Anexo 14.	Corrida electroforética de las fracciones colectadas durante la separación y purificación de la β -glucosidasa.....	122

ABREVIACIONES

AE	:	Actividad enzimática
ARNr	:	Ácido ribonucleico ribosomal
BLAST	:	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTN	:	Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide
°C	:	Grado centígrado
CMC	:	Carboximetilcelulosa
DNS	:	Ácido 3,5 - dinitrosalicílico
D.O.	:	Densidad óptica
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
FPU	:	Unidades de actividad sobre papel filtro
FPAsa	:	Actividad enzimática sobre papel filtro
g	:	Gramo
gss	:	Gramo de sustrato seco
h	:	Hora
IEX	:	Ion Exchange Chromatography
L	:	Litro
M	:	Molar
mg	:	Miligramo
min	:	Minuto
mM	:	Milimolar
mm	:	Milímetro

mL	:	Mililitro
msnm	:	Metros sobre el nivel del mar
ng	:	Nanogramo
nm	:	Nanómetro
nt	:	Nucleótido
pH	:	Potencial de hidrógeno
p/v	:	Peso por volumen
rpm	:	Revoluciones por minuto
SDS	:	Dodecilsulfato sódico
SSU	:	Small subunit
u	:	Unidades
UFC	:	Unidades formadoras de colonias
UI	:	Unidad internacional
μL	:	Microlitros
μmol	:	Micromol
V	:	Voltio
v/v	:	Volumen por volumen

RESUMEN

A partir de 18 cultivos bacterianos, se hizo una selección en dos niveles. La primera, en base al carácter cualitativo de la actividad de celulasas, cuyo indicador de selección fue la mayor zona de hidrólisis en medio sólido de producción con papel periódico, que resultó en una subselección de 4 bacterias. La segunda, en base al carácter cuantitativo de la actividad de las enzimas, cuyo indicador de selección fue la mayor actividad de celulasas totales (FPU.mL⁻¹), generando una bacteria selecta, CB-13; la misma que fue identificada molecularmente por secuenciamiento de su gen ARNr 16S presentando una similitud al 99 % y 97 % con la secuencia parcial del gen ARNr 16S de *Geobacillus thermoparaffinivorans* strain Ba3 y *Geobacillus thermoparaffinivorans* strain Et2/4, respectivamente.

Dicha bacteria se aplicó en fermentación sumergida, en donde por medio de la aplicación de los diseños experimentales de Plackett-Burman y Box-Behnken, se intentó mejorar la producción de enzima; se determinó que la composición del medio mejorado, en % (p/v), es: papel periódico 0,30; lactosa 0,25; sucrosa 0,25; (NH₄)₂SO₄ 1.17, CaCl₂ 0,06; extracto de levadura 0,2; MgSO₄.7H₂O 0,11; KH₂PO₄ 0,90; peptona 0,15; pH 6,5; temperatura de cultivo a 60 °C y tiempo de incubación 72 horas; el mismo que genera un rendimiento promedio de 97,44 FPU.gss⁻¹. Se intentó separar y purificar la β-glucosidasa, mediante cromatografía y su respectivo análisis electroforético de las fracciones resultantes, obteniéndose su peso molecular aproximado de 92,6 kDa.

Finalmente, se realizó la caracterización funcional de las celulasas totales, mostrando el pH de 7,0 y la temperatura de 70 °C como óptimos para la actividad; además, se evaluó la termoestabilidad, resultando estable, aproximadamente, durante 4 horas a temperatura de 70 °C y 2 horas a 80 °C.

ABSTRACT

From 18 bacterial cultures, a selection was made on two levels. The first, based on the qualitative nature of the activity of cellulases, whose selection indicator was the largest hydrolysis zone in solid media production with periodic paper, which resulted in a subselection of 4 bacteria. The second, based on the quantitative character of the activity of the enzymes, whose selection indicator was the highest total cellulase activity (FPU.mL⁻¹), generating a selective bacterium, CB-13; Which was identified molecularly by sequencing its 16S rRNA gene exhibiting a similarity to 99% and 97% with the partial sequence of the 16S rRNA gene from *Geobacillus thermoparaffinivorans* strain Ba3 and *Geobacillus thermoparaffinivorans* strain Et2 / 4, respectively.

This bacterium was applied in submerged fermentation, where by means of the application of the experimental designs of Plackett-Burman and Box-Behnken, an attempt was made to improve the production of enzyme; The composition of the improved medium in % (w/v) was: old newspaper 0,30; lactose 0,25; sucrose 0,25; (NH₄)₂SO₄ 1,17; CaCl₂ 0,06; yeast extract 0,2; MgSO₄.7H₂O 0,11; KH₂PO₄ 0,90; peptone 0,15; pH 6,5; culture temperature at 60 °C and incubation time 72 hours. The same that generates an average yield of 97.44 FPU per milligram of dry substrate. It was attempted to separate and purify the β-glucosidase, by chromatography and its respective electrophoretic analysis of the resulting fractions, obtaining its approximate molecular weight 92,6 kDa.

Finally, the functional characterization of the total cellulases was performed, showing the pH of 7,0 and the temperature of 70 °C as optimum for the activity. In addition, the thermostability was evaluated, resulting stable for approximately 4 hours at a temperature of 70 ° C and 2 hours at 80 °C.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de celulasas, a partir de material lignocelulósico, se intentó por muchos investigadores. Hoy en día, esto se debe a la abundancia de residuos de biomasa lignocelulósica, disponibles en todo el mundo, incluyendo nuestro contexto nacional y local.

La producción de papel periódico residual abunda durante el año y es pobremente reciclado. Es entonces que, con el fin de dar un nuevo uso a este residuo sólido urbano, aprovechando su naturaleza lignocelulósica y generando otro producto más valioso, el presente trabajo utilizó al papel periódico como sustrato para producir celulasas termoestables, otorgando valor agregado y aportando a suplir la demanda de biocatalizadores por la gran gama de industrias a nivel mundial.

1.1. Problema

1.1.1. Antecedentes

En primer lugar, se tiene que, en 2011 en el artículo científico *“Producción de celulasas utilizando sustratos baratos por fermentación estado sólido”* presentado en la Revista Internacional de Plantas, Animales y Ciencias del Ambiente (IJPAES) por Jahir A. K. y Sumit K. S.; trata sobre la búsqueda de un sustrato alternativo de costo cero para la producción de celulasas por hongos aislados de suelo, que puestos en fermentación sólida sobre cuatro

sustratos de naturaleza lignocelulósica, cabe mencionar al papel periódico como uno de ellos efectuándose así la producción de celulasas fúngicas y encontrándose $0,020 \text{ U.mL}^{-1}$, como la máxima actividad CMCasa.

Por otro lado, en 2013, la tesis *Enzyme hydrolysis of old newspaper to produce simple sugar for fermentation process* presentada por Binti Ayop N. F. de la Universidad de Malasia Pahang para obtener el Grado de Bachiller en Ingeniería Química, muestra un segundo antecedente del uso de esta enzima sobre papel periódico. En este caso, se utilizó el complejo celulasa, adquirido de Novozyme, con el propósito de hidrolizar periódico para obtener glucosa, destacando que este es una fuente lignocelulósica constituida por hemicelulosa, lignina y un 45 - 50 % de celulosa como componente principal. También remarcó que una conversión por hidrólisis enzimática es ventajosa debido a un menor costo y eficiencia, expresando así la importancia y necesidad de celulasas en la producción de bioetanol.

1.1.2. Planteamiento

Estamos en una época crucial en el desarrollo futuro de la humanidad enmarcada en un contexto integral sobre protección ambiental. Este interés del ser humano se debe a varios factores, entre los que podemos destacar a las nuevas tendencias en sustentabilidad, como la nueva era de la nanotecnología, la nueva disposición de residuos agroindustriales y urbanos con valores agregados. Estos factores han generado otra visión en las tendencias para el aprovechamiento de los recursos disponibles, siendo los

materiales lignocelulósicos los que juegan un papel muy importante, debido a la enorme disponibilidad de este subproducto y a las diferentes fuentes que lo generan.

La actual tendencia mundial se ha desplazado hacia el concepto sin papeles. Sin embargo, en ciertos países y en ciertas labores, todavía se usan y se tendrá que utilizar papel, tales como documentos legales, periódicos y revistas.

La popularidad del uso de papel ha generado una gran cantidad de desperdicio de papel por año. Su recogida y reciclado para producir papel reciclado, después de varios ciclos, disminuye la calidad del papel y contenido de pulpa; entonces, se presenta la desventaja de que su conversión es de baja eficiencia.

La acumulación de papel periódico en la basura abunda durante el año en nuestro contexto local, debido a que es de uso cotidiano. Este papel es usado pobremente en su reciclado, debido a la baja calidad de su producto final, además que, tras varios ciclos de reciclaje, se torna cada vez más inútil. Por lo tanto, es conveniente dar un nuevo uso a este residuo sólido urbano para generar otros productos más valiosos.

1.1.3. Formulación

La producción de enzimas de interés industrial por fermentación requiere utilizar un sustrato de bajo o nulo precio para disminuir los costos de producción, así como el reconocimiento de los parámetros importantes que afectan la misma, tales como el uso sostenible de los recursos. Por tanto, siendo el papel periódico residual un sustrato de bajo precio y encontrándose su estudio y aplicación para la producción de enzimas termoestables como una alternativa ecológicamente amigable, se emite el enunciado del problema como sigue:

¿Es factible obtener celulasas termoestables bacterianas utilizando papel periódico residual como sustrato?

1.1.4. Justificación

Actualmente, una gran cantidad de celulosa y residuos celulósicos que pueden ser medidos en billones de toneladas son utilizados y producidos en el mundo entero como resultado de actividades en la agricultura y la industria (Jahangeer *et al.*, 2005).

Por consiguiente, las celulasas han encontrado una amplia gama de aplicaciones en el procesamiento del café, de la industria textil y de la ropa en la industria de detergentes, pasta y papel, industria farmacéutica, la industria de los biocombustibles, etc. (Jahangeer *et al.*, 2005). Y esta gran demanda

de celulasas ha aumentado sus precios en gran medida; la razón principal es el costo del sustrato (Khan y Singh, 2011) y el inductor soforosa, que fundamentalmente se obtiene por síntesis química (Freudenberg *et al.*, 1951).

Así, por ejemplo, Spano *et al.* (1978) mostraron que la producción de celulasa era el paso más caro durante la producción de etanol a partir de biomasa celulósica, en donde representó aproximadamente el 40 % del costo total. Aunque se han desarrollado procesos de producción de celulasa bastante eficientes proporcionando un alto rendimiento de celulasa a costos relativamente bajos, la producción de celulasa todavía es costosa. Esto abre la necesidad actual de generar una reducción de costos significativos con el fin de mejorar la viabilidad comercial de la tecnología de producción de celulasas (Miyamoto, 1997).

Asimismo, se requiere que presenten estabilidad a elevadas temperaturas de reacción, propiedad ventajosa en aplicaciones industriales (Zeikus *et al.*, 1981). Por lo tanto, es necesario utilizar sustratos más baratos para el proceso de fermentación, por ende, se reduzca el costo de la fermentación y, de esta manera, también se merme el coste de producción de la enzima en gran medida (Khan y Singh, 2011). Así como la búsqueda de celulasas termoestables que cubran los requerimientos.

1.2. Hipótesis

El papel periódico residual, por su naturaleza lignocelulósica, presenta en su composición gran parte de celulosa que es susceptible de biodegradarse; en consecuencia, es factible su uso como sustrato para la producción y obtención de celulasas termoestables.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Producir celulasas termoestables bacterianas utilizando papel periódico como sustrato.

1.3.2. Objetivos específicos

- Seleccionar cualitativamente las bacterias termófilas con mayor diámetro de la zona de hidrolisis por celulasas producidas en medio sólido con sustrato papel periódico.
- Seleccionar cuantitativamente e identificar de manera molecular a la bacteria termófila con mayor actividad de celulasas producidas por fermentación sumergida con sustrato papel periódico.
- Optimizar la composición del medio fermentativo para la mayor producción de celulasas.
- Analizar electroforéticamente las etapas de recuperación y purificación de la β -glucosidasa termoestable.

- Caracterizar funcionalmente a la celulasa producida por la bacteria seleccionada e identificada.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Celulosa

La celulosa, la molécula orgánica más abundante en la Tierra se encuentra principalmente como un componente estructural de las plantas y las paredes de las células de algas; también es producido por algunos animales, como los tunicados, y varias bacterias.

La celulosa natural es un polímero cristalino y lineal de miles de residuos de D-glucosa unidos, considerado el recurso de biomasa más abundante y renovable y una formidable reserva de materia prima (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallof, 2013).

La molécula de celulosa es un polímero lineal de unidades de D-anhidroglucopiranosas unidas. Este polímero es un homopolisacárido (compuesto por un solo tipo de monómero) rígido e insoluble, que contiene hasta cientos de miles de unidades de glucosa, unidas mediante enlaces del tipo β -1,4-glucosídico (Figura 1). En su extremo reductor, la molécula de celulosa tiene un hemiacetal no sustituido. En su extremo no reductor, tiene un grupo hidroxilo.

La celulosa es la estructura de soporte de casi todas las plantas verdes. Es, particularmente, abundante en plantas no alimenticias como los árboles y hierbas, que tienen típicamente un 40-60 % de celulosa, 20-40 % hemicelulosa y lignina de 10 a 25 % (Lynd *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007).

Hay cuatro principales polimorfos de celulosa: I, II, III, y IV. La celulosa I, que a menudo se encuentran en forma natural, contiene alomorfos I α (bacterias y algas) y I β (plantas superiores) (Kontturi *et al.*, 2006; Pérez y Samain, 2010). Esta celulosa, cuando se trata con una solución alcalina concentrada, se convierte en celulosa II, que es la forma cristalina termodinámicamente más estable que la celulosa I. La celulosa III⁽¹⁾ puede obtenerse cuando los microcristales de celulosa se someten a amoníaco supercrítico.

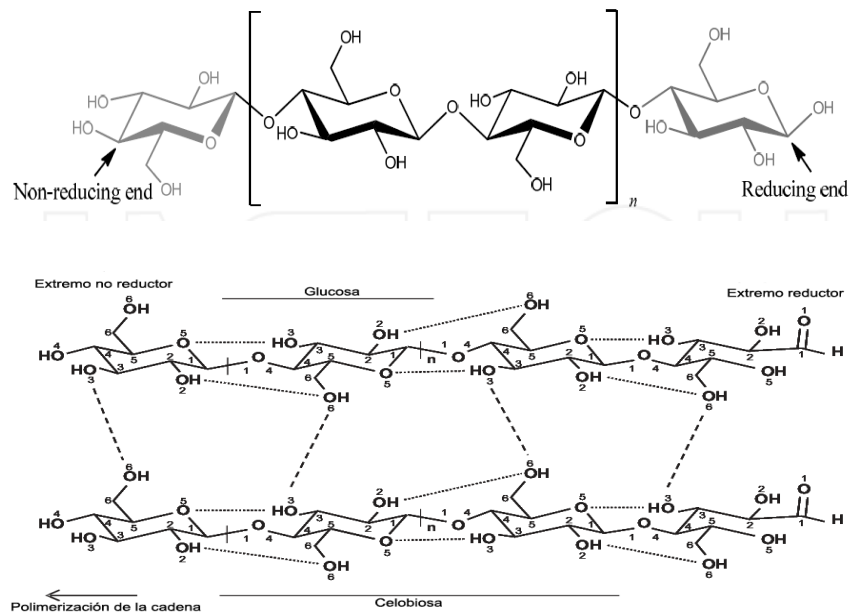


Figura 1. Estructura molecular de la celulosa.

Líneas discontinuas: puentes de hidrógeno intercatenarios.

Líneas punteadas: enlaces de hidrógeno intracatenarios.

Fuente: Xi *et al.* (2013), Festucci *et al.* (2007)

La estructura de otro alomorfo de celulosa III, la III_(II) aún se encuentra en estudios de formación. La celulosa IV_(I) y IV_(II) se forman cuando la celulosa III se calienta en glicerol a 260 °C (Zugenmaier, 2001).

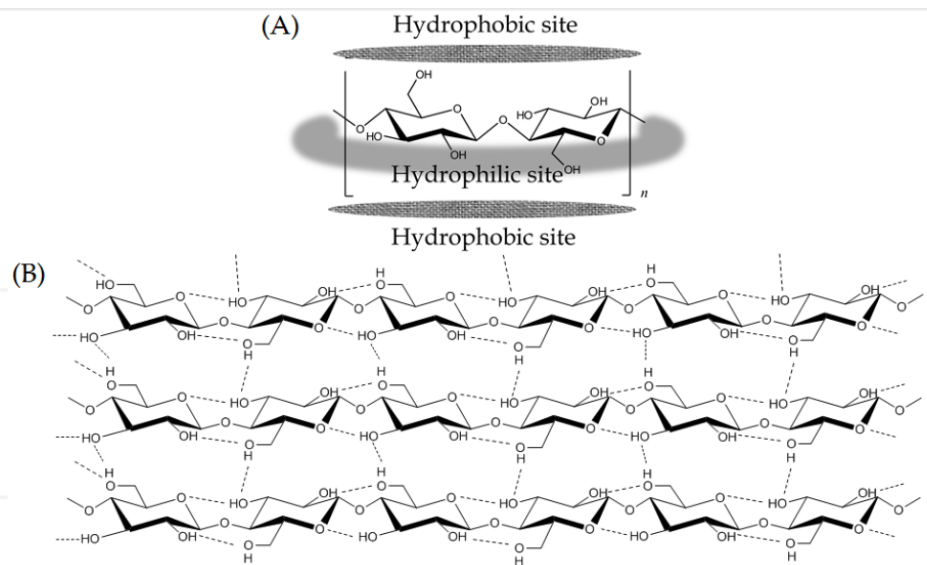


Figura 2. Dibujos esquemáticos de la disposición de zonas con afinidad acuática y enlaces puente de hidrogeno.

(A) Sitios hidrófilos e hidrófobos de celulosa.

(B) Red de enlaces de hidrógeno de la celulosa Ia.

Fuente: Xi *et al.* (2013)

Varias interacciones no covalentes, tales como el enlace de hidrógeno y las interacciones de Van Der Waals, están presentes en la ultraestructura de la celulosa. Mientras que el enlace de hidrógeno OH-O es mayormente el responsable de las interacciones intracatenarias de la celulosa, los más débiles enlaces de hidrógeno CH-O y las interacciones de Van Der Waals contribuyen a las interacciones intercatenarias de la celulosa (Li y Renneckar, 2011).

La figura 2 muestra la disposición del enlace de hidrógeno intracatenario en la celulosa I α y los sitios hidrofílicos e hidrófobos resultantes del plano anular (Brown y Saxena, 2007).

En general, debido a estas interacciones no covalentes, las cadenas de celulosa se agregan en varias formas de ultraestructura, que no se funden ni se disuelven en ningún solvente en común. Dicha agregación impide que los posibles sitios de escisión (es decir, los enlaces glucosídicos) de una cadena de celulosa sean accedidos por la celulasa (Xi et al., 2013).

2.2. Naturaleza del papel periódico o prensa

El papel periódico o prensa constituye parte de la biomasa lignocelulósica más abundante de residuos de materia en la tierra. Este abundante residuo se genera cada año en todo el mundo debido a la alta tasa de producción de periódicos. Por tanto, se ha convertido en uno de los temas ambientales más críticos (Binti, 2013).

En el periódico, la celulosa comprende la mayor fracción de la biomasa lignocelulósica que varía desde 40 % a 55 % (Tabla 1) susceptible de ser degradada a monómeros de azúcar como la glucosa.

Tabla 1

Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Papel periódico ^(a)	58.0	17.7	16.7
Papel periódico ^(b)	60.3	16.4	12.4
Papel periódico ^(c)	53.3	26.3	11.2
Madera dura ^(d)	40-55	24-40	18-25
Madera suave ^(d)	45-50	25-35	25-35
Papel periódico ^(d)	40-55	25-40	18-30

Fuente: ^(a) Chen *et al.* (2015), ^(b) Lee *et al.* (2010), ^(c) Xin *et al.* (2010), ^(d) Sun y Chen (2002).

2.3. Reciclaje del papel periódico

El reciclaje es un proceso que reconsidera el ciclo de vida actual de los materiales y residuos finales para la creación de productos. Por tanto, el reciclaje de papel es el proceso de recuperación de residuos de papel para rehacer nuevos productos. El reciclaje proporciona varios beneficios para el desarrollo socio-económico, así como los beneficios ambientales.

La bioconversión de materiales lignocelulósicos es ahora un tema de intensa investigación como una contribución al desarrollo del proceso de transformación a gran escala en beneficio de la humanidad (Kumakura, 1997).

2.4. Degradación de celulosa por microorganismos

Los microorganismos degradadores de celulosa incluyen hongos y bacterias, aerobios y anaerobios, mesofílicos y termofílicos que ocupan una variedad de habitats (Aubert, 1988). Entre los microorganismos celulolíticos, se destacan:

- Hongos: *Trichoderma reesei*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma koningii*, *Sporotrix* sp., *Alternaria* sp., *Geotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp., *Trametes* sp., *Paecilomyces* sp., *Mucor* sp., *Cladosporium* sp., *Bulgaria* sp., *Chaetomium* sp., *Helotium* sp. y *Aspergillus* sp.
- Bacterias aerobias: *Cellulomonas* sp., *Microbispora bispora*, *Thermomonospora* sp., *Cytophaga* sp., *Corynebacterium* sp., *Vibrio* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Thermobifida* sp.
- Bacterias anaerobias: *Acetivibrio cellulolyticus*, *Butirivibrio* sp., *Bacteroides cellulosolvens*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* (Lynd et al., 2002).
- Actinomicetes: *Streptomyces drozdowiczii*, *Streptomyces cellulolyticus* (Semedo et al., 2004; Grigorevski et al., 2005 & Li, 1997), *Thermomonospora curvata*, *Thermomonospora alba* y *Thermomobifida fusca* (Ramírez y Cocha, 2003).

El pH óptimo para la actividad de las celulasas producidas por bacterias abarca un amplio rango, el cual incluye condiciones ácidas y alcalinas. (Tabla 2).

Tabla 2

Bacterias con alta actividad específica de celulasas

Microorganismo	Actividad Específica (U/mg)	pH óptimo
<i>Bacillus subtilis</i>	51.4	5-7
<i>Streptomyces murinus</i>	6.7	6
<i>Bacillus macerans</i>	50.3	6

Fuente: Howard *et al.* (2003).

2.5. Productos de degradación de la celulosa e importancia industrial

Las bacterias aerobias, generalmente, convierten la celulosa en dos productos principales: CO₂ y biomasa. No existen acumulaciones significativas de intermediarios carbonados y la concentración de ácidos orgánicos, raramente, alcanza un nivel apreciable. Por otro lado, en condiciones anaerobias las bacterias son incapaces de metabolizar completamente dicho sustrato, siendo los principales productos de acumulación, CO₂, CH₄, H₂, etanol y ácidos acético, fórmico, succínico, butírico y láctico (Alexander, 1980).

La celulosa es empleada a nivel industrial en la manufactura de papel y cartón, telas, películas fotográficas, celofanes, explosivos, diluyentes, jabones, aromas y alimentos (Alexander, 1980).

Además de nuevas alternativas para la utilización de celulosa fibra, como diseño, fórmula, elaboración y evaluación de excipientes, coprocesado a base de celulosa, fibra para la elaboración de formas farmacéuticas sólidas (tabletas) por

el método de compresión directa (Sánchez y Zuluaga, 1999), utilización de residuos vegetales en la elaboración de papel manual, obtención de etanol como biocombustible a partir de residuos lignocelulósicos y amiláceos mediante ensayo de hidrólisis y fermentación de azúcares, destintado de periódico mediante la combinación de celulasa / hemicelulasa con el sistema ácido-lacasa violuric.

2.6. Celulasa

La celulasa es *una glicosil hidrolasa* producida por hongos y bacterias. Esta enzima posee un rol muy importante en la biosfera, ya que es responsable de la degradación de la celulosa, la que comprende la fuente de carbono más abundante en la tierra.

Los materiales naturales de celulosa pueden proporcionar energía bajo la forma de glucosa, a través de su hidrólisis por enzimas celulolíticas de origen microbiana. La clasificación de celulasas, de acuerdo con su lugar de acción sobre el substrato celulósico, se divide en tres grandes grupos: endoglucanasa (EnG), exoglucanasa (ExG) y beta-glucosidasa (BG) que, en conjunto, constituye un complejo de enzimas denominada celulasas. Por consiguiente, los substratos insolubles celulósicos son convertidos en azúcares solubles por acción sinérgica de esas enzimas (Bagga et al., 1990; Castro y Pereira, 2010).

La endoglucanasa (EC 3.2.1.4) ataca internamente la celulosa de forma aleatoria en la parte amorfa de la fibra celulósica, liberando oligosacáridos de varios tamaños y, en consecuencia, nuevos terminales. Siendo, reductores,

cuando la glucosa tiene un hidroxilo heterosídico libre y, no reductores, cuando el hidroxilo heterosídico final de una molécula participa como ligando con una glucosa adyacente (Castro y Pereira, 2010).

Las exoglucanasas, también conocidas como celobiohidrolasas y glucanohidrolasas, operan sobre porciones reductoras y no reductoras siendo capaces de actuar sobre la celulosa microcristalina acortando cadenas de polisacáridos. Dos clasificaciones se utilizan para definir este tipo de actividad de la enzima: 1,4-D-glucano hidrolasas y celobiohidrolasas.

- La 1,4-D-glucano hidrolasa (GH), también conocida como exo-glucosidasa (EC. 3.2.1.74), son responsables de la liberación de glucosa directamente a partir del polímero por hidrólisis de la fibra celulósica.

- La Celobiohidrolasa (CBH), también conocida como exo-glucanasa (EC 3.2.1.91), se puede dividir en dos tipos: Enzima de tipo I (CBH I), que hidroliza terminales reductores (R), mientras que la de tipo II (CBH II) hidroliza terminales no reductores (NR). Estas enzimas generalmente sufren inhibición por su producto de hidrólisis, la celobiosa (Castro y Pereira, 2010). Tienen acción limitada sobre sustratos de carboximetilcelulosa (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC) (Lynd *et al.*, 2002; Bhat y Bhat, 1997).

La β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) hidroliza celobiosa y elimina glucosa de terminales no reductores de pequeñas celodextrinas (Bhat y Bhat, 1997). Tienen un papel importante en la hidrólisis de materiales lignocelulosos, debido a que la celobiosa, siendo un potente inhibidor de exocelulasas, es su sustrato principal.

Por lo tanto, su ausencia disminuye el proceso de sacarificación de la biomasa (Almeida, 2009; Lynd *et al.*, 2002).

Muchas celulasas se componen de dos áreas distintas: el dominio de unión sustrato (DUS) y dominio catalítico (DC), que alberga el sitio activo (SA). El sitio activo tiene como función la hidrólisis de enlaces glucosídicos de la celulosa y cada clase de celulasa posee una forma diferente de hidrólisis de los enlaces situados en diferentes regiones del sustrato, tanto en los enlaces terminales en los extremos de las cadenas, como en los enlaces internos.

El dominio de unión con el sustrato está vinculado a una adsorción a la celulosa, que permite una mayor concentración de la celulasa en la superficie del polímero por interacciones no covalentes, que implican enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas (Martins, 2005).

Cada enzima por sí sola no puede hidrolizar eficientemente la celulosa cristalina compleja; pero trabajando sinérgicamente con otros tipos de celulasas, incrementan significativamente la velocidad de hidrólisis (Dwivedi *et al.*, 2009; Lynd *et al.*, 2002).

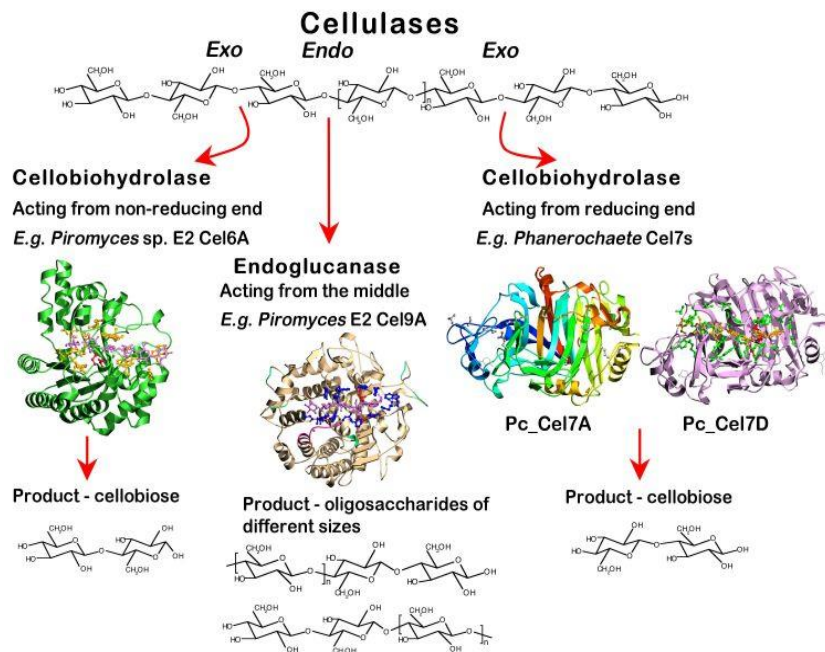


Figura 3: Mecanismo de degradación de la celulosa por sinergismo de las enzimas.

Fuente: <http://xray.bmc.uu.se/~wimal/projects/research.html>

2.7. Evaluación de la actividad de celulasas

La actividad enzimática de celulasas puede ser medida de dos formas básicas:

- Medición de la actividad total de las celulasas.
- Medición de la actividad individual de cada celulasa (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas).

2.7.1. Celulasas totales

El sistema de celulasas está conformado por endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, las cuales hidrolizan sinérgicamente la celulosa cristalina. La evaluación de la actividad de las enzimas celulolíticas es con frecuencia evaluada usando sustratos insolubles que incluyen: papel filtro Whatman N° 1 y celulosa microcristalina. La heterogeneidad de la celulosa insoluble y la complejidad del sistema celulasa causan problemas en la medición de la actividad total. Los resultados experimentales muestran que la estructura heterogénea de la celulosa insoluble induce la disminución en la tasa de hidrólisis en corto tiempo (menos de una hora) provocando la desactivación de las celulasas (Zhang *et al*, 2006).

2.8. Ensayo cualitativo con Rojo Congo [3,3'-([1,1'-bifenil]-4,4'-diyl)bis(4-aminonaftalen-1-ácido sulfónico) de sodio]

Diferentes procedimientos utilizados en la identificación y enumeración de los microorganismos capaces de utilizar la celulosa han sido descritos, siendo la base de estos la hidrólisis de sustratos celulósicos. La utilización de medios líquidos que contienen celulosa permite estimar cualitativa y cuantitativamente los microorganismos degradadores, los medios sólidos son generalmente más usados; pero en estos, las colonias de microorganismos que utilizan el sustrato son con frecuencia difíciles de diferenciar de otros microorganismos que no lo hacen. Teather y Wood (1982), observaron que el rojo Congo podía ser usado en los ensayos para evidenciar hidrólisis de polisacáridos, debido a que este

colorante forma complejos con moléculas aún no hidrolizadas, facilitando así, la diferenciación entre microorganismos celulolíticos y no celulolíticos por la formación de zonas de aclaramiento alrededor de las colonias (Hendricks *et al.*, 1995).

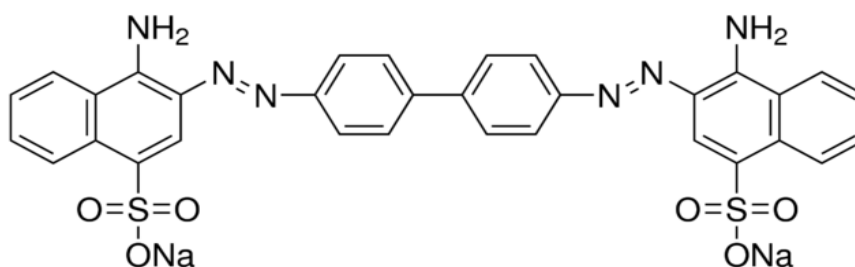


Figura 4. Estructura molecular del Rojo Congo

Fuente: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c6767>

2.9. Ensayo cuantitativo con DNS [ácido 3,5- dinitrosalicílico]

La actividad del sistema enzimático en el complejo celulolítico puede medirse determinando la cantidad de glucosa liberada mediante DNS. Esta técnica demuestra la presencia del grupo carbonilo libre (C=O) de los azúcares reductores que implica la oxidación del grupo funcional aldehído de la glucosa (Miller, 1959).

En este método, el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que los grupos aldehídos son oxidados a grupos carboxilos. La reducción del ácido genera un color amarillo-marrón, el cual es proporcional a la concentración del azúcar reductor presente y se evidencia por

medio de la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro, lo que implica la aplicación de la ley de Beer Lambert (Miller, 1959).

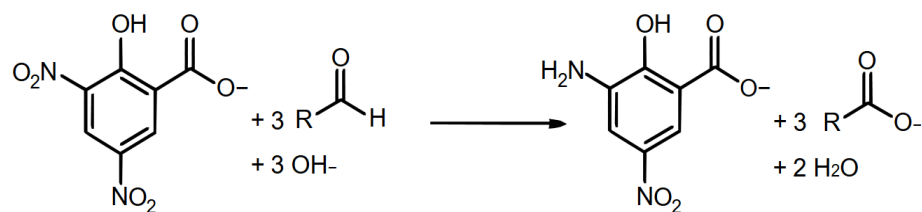


Figura 5. Reducción del 3,5-dinitrosalicilato a 3-amino-5-nitrosalicilato.

Fuente: Herráez, 2017.

La lectura del ensayo de DNS es altamente influenciada por las mismas condiciones de la prueba, como la temperatura del agua de calentamiento, la transferencia de calor, el tiempo de reacción, la proporción de glucosa, celobiosa y celodextrinas presentes y el tiempo de preparación del reactivo, el cual con frecuencia es ignorado (Zhang *et al.*, 2006).

2.10. Factores que influyen en la actividad de celulasas

Diversos factores asociados con la naturaleza del sistema enzimático de las celulasas han sido sugeridos por influenciar el proceso hidrolítico.

Estos incluyen: inhibición del complejo de celulasas por el producto final, inactivación térmica, sinergismo e irreversible adsorción de las enzimas; teniendo estos dos últimos la mayor influencia en la tasa de degradación del polisacárido (Mansfield *et al.*, 1999).

2.10.1. Sinergismo

El sinergismo ocurre cuando la acción combinada de dos o más enzimas aumenta la tasa de acción sobre el sustrato respecto a la acción individual.

Se han hecho estudios en los que se ha observado una actividad cooperada de las celulasas de *Trichoderma reesei*, en el que las endoglucanasas actúan al azar a lo largo de las cadenas de celulosa generando sitios donde actúan las exoglucanasas que liberan celobiosa como producto principal. Una tercera enzima, la β -glucosidasa, es necesaria para hidrolizar la celobiosa previniendo de esta manera la inhibición de las exoglucanasas por acumulación de producto y por tanto generando un aumento en la tasa hidrolítica (Mansfield *et al.*, 1999).

2.10.2. Adsorción

La hidrólisis de la celulosa difiere de otras reacciones enzimáticas en que el sustrato es insoluble y requiere una previa adsorción de la enzima al sustrato. La adsorción de las celulasas es facilitada por la presencia de dominios de unión con el sustrato, hacia las zonas susceptibles de clivaje proteolítico, mediante fuerzas de Van Der Waals y puentes de hidrogeno.

Además, dichos dominios cuentan con aminoácidos aromáticos que confieren una especificidad adicional y estabilidad al complejo enzima – sustrato (Mansfield *et al.*, 1999).

Existen dos teorías para explicar la interacción de los dominios con la celulosa. La primera se basa en que los dominios incrementan la concentración local de enzimas en la superficie de la celulosa. Y la segunda propone que los dominios son un instrumento que permite el rompimiento de cadenas de celulosa cristalina pero no de tipo amorfa (Mansfield *et al.*, 1999).

2.11. Aplicación industrial de las celulasas

Las celulasas y enzimas relacionadas tienen una amplia gama de aplicaciones; con su uso intenso en primeros años de la década del 80, en primer lugar, en la industria de la alimentación animal, a raíz de la aplicación en la industria alimentaria. Posteriormente, estas enzimas se aplicaron en industria textil y de lavandería (Bhat, 2000).

La gran gama de aplicaciones las hace muy atractivas y demuestran su enorme valor comercial en la industria biotecnológica. Por ejemplo, en la industria del papel, que alcanza ventas de millones de dólares en Estados Unidos y Europa (Beilen y Li, 2002), las celulasas y hemicelulasas usadas en etapas de pretratamiento permiten una mejor deslignificación y ahorro en reactivos químicos en la etapa posterior de blanqueamiento (Dienes *et al.*, 2003). Asimismo, mejoran la remoción de tintas de papeles de diario viejos, dando mejores resultados que cuando se utilizan agentes químicos (Pélach *et al.*, 2002).

En la industria de la cerveza y el vino, las celulasas tienen diversas y atractivas aplicaciones, una de ellas es en el proceso de producción de la cerveza, en donde

las celulasas del tipo endoglucanasa son utilizadas para la hidrólisis del enlace 1,4- β -glucosídicos de las semillas de cebada, lo que reduce la viscosidad y libera azúcares reducidos durante la primera fermentación. Con esto, se obtiene un aumento de eficiencia en dicha etapa, y en la etapa de filtración, y un mejoramiento en la calidad de la cerveza.

En la industria del vino, las celulasas del tipo β -glucosidasa son utilizadas para el mejoramiento del aroma del vino. Del mismo modo, el uso de celulasas es conocido para el mejoramiento en las eficiencias de las etapas de maceración, clarificación y filtración, así como también para a la obtención de un vino de mejor calidad y estabilidad (Bhat, 2000).

En los detergentes deben actuar en un amplio rango de pH, yendo desde pH 6 a hasta alrededor de 10, deben también ser resistentes a surfactantes aniónicos, condiciones de blanqueamiento, durante el tiempo que dura el lavado, así como también durante el periodo de almacenamiento (Shirai *et al.*, 2001)

2.12. Identificación bacteriana por secuenciación del gen ARNr 16S

Los ribosomas son orgánulos complejos, altamente especializados, que utilizan los organismos para el complicado proceso de síntesis de proteínas. El ribosoma bacteriano (Figura 6) tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg), y puede disociarse en dos subunidades, la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S). Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr

específicas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas diferentes, mientras que la subunidad 50S contiene los ARNr 5S y 23S junto con unas 34 proteínas (Rodicio y Mendoza, 2004).

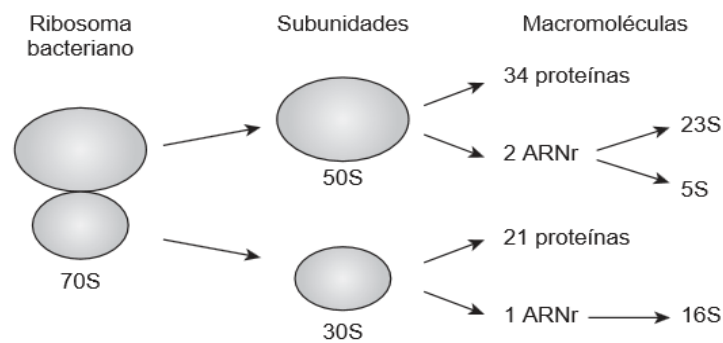


Figura 6. El ribosoma bacteriano, esquema de su estructura, subunidades y macromoléculas que lo componen.

Fuente: Rodicio y Mendoza, 2004

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nt, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla, como se representa en la figura 7 (Rodicio y Mendoza, 2004).

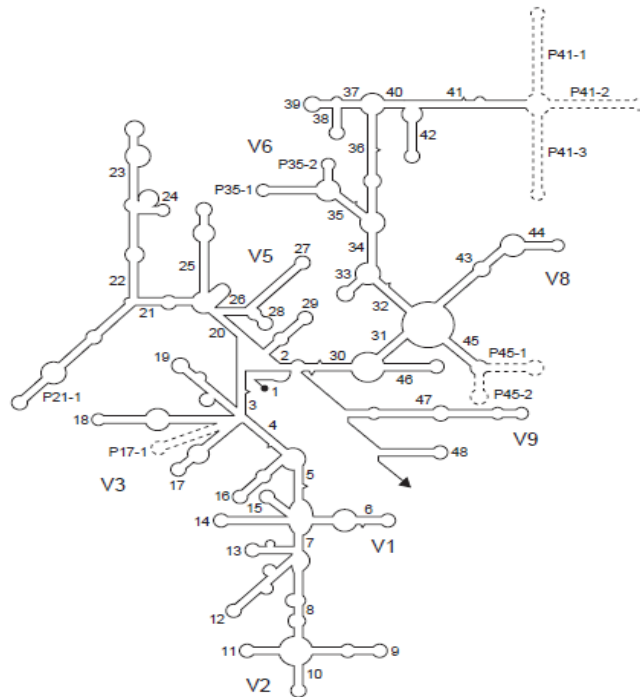


Figura 7: Estructura secundaria del ARNr 16S.

Las regiones relativamente conservadas se presentan en negrilla.

Fuente: Neefs *et al.*, (1990)

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ADNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva (Rodicio y Mendoza, 2004).

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluye tres etapas:

- Amplificación del gen a partir de la muestra apropiada.
- Determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón.
- Análisis de la secuencia.

III. METODOLOGÍA

3.1. Estrategia de trabajo

Se trabajó con un grupo de bacterias que se sometieron a una selección en dos niveles, con el fin de obtener una sola bacteria, la misma que se aplicó en ensayos de fermentación para la obtención de celulasas. Además, se la identificó molecularmente, se le optimizó el medio fermentativo para mejorar la producción y se caracterizó las enzimas producidas; el detalle del diseño de investigación ejecutado se muestra a continuación.

3.1.1. Ubicación y delimitación del área de estudio

En el presente trabajo, el área de estudio está comprendido por las dimensiones donde tienen lugar las praxis para la dilucidación y comprobación de la tesis. Que incluye técnicas y métodos bioquímicos, enzimológicos y analíticos. Con ubicación física en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

En los mencionados espacios se encuentran las bacterias termófilas, almacenadas en un cepario, dispuestas para selección y aplicación.

3.1.2. Población y muestra

3.1.2.1. Población

La población estuvo constituida por 18 bacterias con capacidad para producir celulasas, según el carácter cualitativo de la actividad enzimática, aisladas de los Géiseres de Calientes, Candarave – Tacna, obtenidas por muestreo in situ en los años 2014 y 2015.

3.1.2.2. Muestra

La muestra estuvo constituida por 4 bacterias, obtenida por muestreo dirigido de acuerdo con las características de la población y los objetivos propuestos.

Se hizo una selección en base al carácter cuantitativo de la respuesta en estudio; donde finalmente solo una, se utilizó para el estudio de producción de enzimas.

3.1.3. Diseño estadístico de los experimentos

En general, el tipo de investigación fue básica – experimental; donde todos los experimentos se realizaron por triplicado y se tomaron datos representativos como sus valores medios. Los diseños y análisis aplicados, según el propósito, se detallan a continuación:

Para la selección cualitativa, se hizo un análisis ordinario de varianza para variable respuesta diámetro de la zona de hidrólisis originado por cada bacteria en las condiciones de evaluación. Y se aplicó la prueba de múltiples rangos de Duncan para obtener grupos homogéneos entre los cuales exista diferencia significativa.

Para la determinación de componentes influyentes en la producción, se utilizó el diseño experimental de Plackett-Burman con 10 factores 1 bloque con 3 repeticiones; el bloque generado estuvo constituido por 12 ensayos.

Para la optimización de la aplicación de factores influyentes en la producción de la enzima, se usó el diseño de superficie respuesta de Box-Behnken con 3 factores, 1 bloque con 3 repeticiones; generando 14 ensayos diferentes y 1 repetido. El diseño y análisis de estos experimentos se llevó a cabo utilizando los softwares Minitab 17 y Stat graphics Centurion XVI que incluyeron, análisis ordinario de varianza (ANOVA), para comparar efectos principales, y prueba de Duncan, para generar interacciones comparativas entre las medias, respectivamente.

Para la determinación del pH y la temperatura óptima de las enzimas, por hallazgo de un promedio mayor con diferencia estadísticamente significativa en la actividad celulolítica, se usó el análisis de varianza ordinario (ANOVA) donde:

- Número de factores: 2 (pH / Temperatura).
- Número de variables respuesta: 1 (actividad enzimática).
- Número de niveles por factor: 7 y 4, respectivamente.
- Número de bloques: 3 repeticiones.

Tabla 3

Resumen de los valores de entrada en el ANOVA para la comparación de promedios de actividad celulolítica por efecto del pH y la temperatura.

Factores	Valor mínimo	Valor máximo	Nivel	Unidad
pH	4	10	7	pH
Temperatura	60	90	4	°C

Fuente: Elaboración propia

Para la determinación de la estabilidad térmica, por hallazgo de una diferencia estadísticamente significativa en la actividad celulolítica, se usó el análisis de varianza ordinario (ANOVA) donde:

- Número de factores: 2 (tiempo y temperatura).
- Número de respuestas: 1 (actividad residual %).
- Número de bloques: 3 repeticiones.
- Número de niveles por factor: 4.

Tabla 4

Resumen de los valores de entrada en el ANOVA para la determinación de termoestabilidad enzimática.

Factores	Valor mínimo	Valor máximo	Nivel	Unidad
Temperatura	60	90	4	°C
Tiempo	0.5	4	4	horas

Fuente: Elaboración propia

3.2. Materiales

3.2.1. Microorganismos utilizados

Se utilizaron 18 bacterias como punto de partida para la selección de una sola, que responda efectivamente a la evaluación cualitativa y cuantitativa. Las mismas, fueron gentilmente cedidas por el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, aisladas de los Géiseres de Calientes – Candarave (4300 msnm).

3.2.2. Reactivos

Denominación del reactivo	Marca
p-nitrofenilglucopiranosido (pNPG)	SYGMA
Lactosa	MERCK
Sucrosa	MERCK
Maltosa	MERCK
Papel filtro cualitativo grado 1	WHATMAN®
Peptona	CDH
Cloruro de sodio (NaCl)	CDH
Extracto de levadura	CDH

Denominación del reactivo	Marca
Hidróxido de sodio (NaOH) 50mM	MERCK
Acetato de sodio	CDH
Ácido clorhídrico (HCl) 0.5 M	PANREAC
Tris base	HIMEDIA
Glicina	MERCK
Acetona	MERCK
CaCl ₂	MERCK
Cristal violeta	CDH
Yoduro de potasio	MERCK
Etanol	MERCK
Safranina	CDH
KH ₂ PO ₄	CDH
MgSO ₄ .7H ₂ O	CDH
BaCl ₂	MERCK

3.2.3. Equipos

Marca y modelo	Denominación del equipo
GEMMY Modelo YCO-010	Esterilizador de aire seco
GEMMY Modelo YCW-010E	Baño maria
GEMMY Modelo IN – 010	Incubadora
UNICO, Modelo NV-203	Espectrofotómetro UV-VIS
GREETMED	Esterilizador a vapor (Autoclave)
CAT	Agitador magnético
MILIPORE AMICON	Dispositivo de diafiltración
EPPENDORF 5418	Microcentrífuga
LABNET	Vórtex
AND	Balanza analítica
DAKOTA	Balanza de precisión
SURGE	Cocina Eléctrica

Marca y modelo	Denominación del equipo
DRAGON LAB	Micropipeta 5-50µL
BOECO Germany	Micropipeta 100-1000 µL
BOECO Germany	Micropipeta 100 µL
DRAGON LAB	Micropipeta 0,5-10 µL
MRC	Incubador agitado

3.3. Métodos

3.3.1. Mantenimiento del material biológico

3.3.1.1. Reactivación de bacterias, determinación de pureza

Las bacterias fueron reactivadas en caldo Luria Bertani (Peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L). La pureza de las bacterias fue corroborada mediante tinción Gram y vista al microscopio con aceite de inmersión.

3.3.1.2. Caracterización macroscópica y microscópica

Se reactivó las cepas en medio Luria Bertani a 60 °C por 24 horas, se procedió a sembrarla por estría en Agar LB incubadoras a 60 °C por 24 horas, detallando las formas, borde, elevación y color de la colonia aislada en las últimas estrías. Para la caracterización microscópica, se utilizaron muestras puras de bacterias, coloreadas por tinción Gram, que luego fueron visualizadas en microscopio óptico compuesto de luz blanca en inmersión con aceite de cedro.

3.3.2. Cuantificación de proteínas totales

Se hizo por el método de Bradford (1976) bajo el principio de la unión del colorante Coomassie Blue G250 a las proteínas, en donde parece unirse más fácilmente a los residuos de arginil y lisil de las proteínas (Congdon y Muth, 1993).

Estudios detallados indican que el colorante libre puede existir en tres formas iónicas diferentes, para las cuales el pK tiene los valores de 1.15, 1.82 y 12.4, respectivamente (Chial, 1993). De las tres formas cargadas del colorante que predominan en la solución de reactivo ácido, las formas verdes tienen máximos de absorbancia a 470 nm y 650 nm, respectivamente. A diferencia de la forma azul, la más aniónica del colorante, que se une a la proteína, tiene un máximo de absorbancia principal a 590 nm. (Kruger, 2002). Por lo tanto, la cantidad de proteína puede estimarse determinando la cantidad de colorante en la forma iónica azul. Esto se logra generalmente midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm.

Para los ensayos, se fijaron volúmenes de 100 y 1000 μ L para la muestra y reactivo, respectivamente. Se consideró mezclado y un tiempo de hasta 2 minutos para asegurar, a cabalidad, el final de la reacción. Se determinó una curva de calibración con solución de albumina sérica bovina como patrón de contenido proteico, midiéndose la densidad óptica de la reacción a la longitud de onda señalada (Anexo 6).

3.3.3. Pretratamiento y proceso del papel periódico

Se hizo un pretratamiento físico de acuerdo con las ventajas descritas por Binti (2013) que consistió en sumergir el papel periódico en agua por 10 minutos, para luego triturarse en licuadora en una concentración del 0,2 % (p/v).

Finalmente, el homogeneizado se llevó a ebullición por 2 minutos y se filtró para eliminar el agua; se dejó secar a 60 °C por espacio de 4 horas y se almacenó en frasco hermético.

3.3.4. Producción de celulosas

3.3.4.1. Caracterización cualitativa de actividad

Se llevó a cabo empleando como inóculo 50 µL de cultivos bacterianos puros de 18 a 21 horas reactivados en caldo LB, que fueron sembrados por incorporación con 150 µL de medio de producción para celulosas [(NH₄)₂SO₄ 11,7 g/L; KH₂PO₄ 3,7 g/L; MgSO₄.7H₂O 0,6 g/L; CaCl₂.2H₂O 0,8 g/L; extracto de levadura 0,5 g/L; peptona 0,5 g/L; FeSO₄.7H₂O 500 mg/L; MnSO₄.H₂O 160 mg/L, ZnSO₄.7H₂O 140 mg/L, CoCl₂.6H₂O 370 mg/L, sustrato para celulosas 1% (p/v) y agar 2 % (p/v); pH 6] en microplacas de 96 pozos con fondo plano, incubadas a 60 °C por 72 horas (Mandels y Reese, 1956).

El contenido de cada pocillo, después de comprobado el crecimiento microbiano, se retiró con sacabocado estéril y se colocó en medios sólidos

[sustrato al 0.5% (p/v), tampón fosfato 50 mM pH6 y agar al 2% (p/v)] para visualizar actividad de celulasas (Meza *et al.*, 1995); incubándose a 60 °C en baño maría por 24 horas.

Finalmente, para el revelado de las zonas de hidrólisis por celulasas, se agregó solución Rojo de Congo al 0,1% (p/v) hasta cubrir la totalidad de la placa, se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos y luego se retiró el exceso de colorante con solución NaCl 1M.

Los ensayos se hicieron por triplicado para cada bacteria. Se midieron los diámetros de las zonas de hidrólisis como respuesta para la selección.

3.3.4.2. Caracterización cuantitativa de actividad

3.3.4.2.1. Inóculo y condiciones de producción

Por cada bacteria evaluada, se originó un cultivo en fase log (DO ~0,3) que se utilizó como inóculo (5 % v/v) en medio de producción para celulasas [(NH₄)₂SO₄ 11,7 g/L; KH₂PO₄ 3,7 g/L; MgSO₄·7H₂O 0,6 g/L; CaCl₂·2H₂O 0,8 g/L; extracto de levadura 0,5 g/L; peptona 0,5 g/L; FeSO₄·7H₂O 500 mg/L; MnSO₄·H₂O 160 mg/L; ZnSO₄·7H₂O 140 mg/L; CoCl₂·6H₂O 370 mg/L y sustrato 1% (p/v); pH 6] (Mandels y Reese, 1956).

Para la obtención del extracto crudo enzimático, se procedió a centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos, separando biomasa y sustrato como pellet, del sobrenadante a ~4 °C.

3.3.4.2.2. Determinación de actividad celulolítica

3.3.4.2.2.1. Celulasas totales

Para la determinación de la actividad de celulasas totales en FPU.mL⁻¹, se calculó la concentración de azúcares reductores liberados en reacción, según el método de Miller (1959), fijándose volúmenes a razón de 1:1:5 para diluciones de glucosa, reactivo DNS (ácido 3-dinitrosalicílico) y agua destilada, respectivamente. Se determinó una curva de calibración utilizando una solución de dextrosa de 5 mg/mL en tampón acetato de sodio (pH 5,8) como patrón para generar las diluciones; midiéndose la densidad óptica a la longitud de onda de 540 nm (Anexo 7).

Asimismo, los ensayos enzimáticos se hicieron en base al método descrito por Ghose (1987) en una mezcla de reacción con volumen final de 300 µL, a la que se le calculó el contenido de azúcares reductores según el método anteriormente detallado.

A. Cálculo de azúcares reductores

Se realizó por lectura de ensayos de reacción, detallados en la tabla 5, en espectrofotómetro a 540 nm para determinar la absorbancia del ácido 3-amino-5-nitrosalicílico originado por los azúcares reductores liberados durante la reacción, que están en una relación de correspondencia, explicada por la ecuación de la curva de calibración.

Tabla 5*Detalle del ensayo enzimático de celulasas totales*

Reactivos	BR	BS	BE	ES*
Tampón acetato pH 5,8 – 6,0 100mM (μL)	200	200	200	200
Dilución de enzima (μL)	0	0	100	100
Agua destilada (μL)	100	100	0	0
Incubar los tubos en baño maría a 60 °C por 5 minutos				
Papel filtro (mg)	0	10	0	10
Incubar los tubos en baño maría a 60 °C por 60 minutos				
Reactivo DNS (mL)	300	300	300	300
Colocar los tubos en baño de agua hirviendo durante 5 minutos e inmediatamente enfriarlos en baño de agua corriente				
Agua destilada (mL)	500	500	500	500

* ES: Reacción
BE: Blanco de la dilución de enzima
BR: Blanco de reactivo
BS: Blanco de sustrato

Fuente: Elaboración propia

Se agitó bien los tubos y se leyó las absorbancias a 540 nm contra el blanco de reactivo (BR). Se calculó la concentración de azúcares reductores en el blanco del sustrato (BS), en el blanco de la dilución de enzima (BE) y en la reacción (ES), utilizando la curva estándar de glucosa con la ecuación de regresión encontrada previamente. En el caso de los valores de la absorbancia de la muestra que escaparon del rango de la curva estándar, se realizaron diluciones de 1/2 y 1/4 según correspondió.

La concentración de glucosa real en la reacción se determinó de la siguiente manera:

$$[AR] = [ES] - ([BE] + [BS])$$

Donde [AR]: concentración de azúcares reductores tomados como glucosa en mg/mL

B. Cálculo de la actividad catalítica

La actividad enzimática catalítica se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{FPU (UI/ml)} = \text{AR liberados} \times 0.185 \times \text{dilución}$$

Donde 0.185 es un factor para obtener el número de μmoles de glucosa formados en un minuto.

La actividad de celulasa total fue expresada en $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$, donde una unidad de enzima (UI) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto (Ghose, 1987).

A partir de este ensayo, se seleccionó la bacteria con mayor actividad enzimática de celulasa total para ser evaluada en sus condiciones culturales y optimizada en su medio de fermentación para a producción de las enzimas.

C. Cálculo de la actividad específica

Se determinó dividiendo la actividad catalítica de la enzima con el contenido proteico de la dilución de enzima empleado en la reacción:

$$FPU (UI/mg) = \frac{UI/mL \text{ dil. de enzima}}{mg \text{ proteina/mL dil. de enzima}}$$

3.3.4.2.2. β -glucosidasas

La actividad β -glucosidasa se determinó usando p-nitrofenil glucopiranosido (pNPG) como sustrato de acuerdo con Parry *et al.* (2001) y Kaur *et al.* (2007). La mezcla de ensayo contenía 100 μ l de pNPG (2 mM), 100 μ L de tampón acetato 50 mM (pH 5.8) y 200 μ L de solución de enzima diluida. Después de la incubación, durante 30 min a 60 °C, la reacción fue detenida por la adición de 400 μ L de tampón glicina-NaOH pH 10 (0.4 M). La absorbancia se midió a 405 nm y se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que liberó 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto en la mezcla de reacción.

3.3.5. Determinación de componentes influyentes y niveles óptimos en el medio fermentativo

Para el propósito de la selección, varios componentes del medio y parámetros de cultivo se han evaluado.

Basado en el diseño factorial Plackett-Burman, cada factor independiente fue examinado en dos niveles: 1 para nivel bajo y +1 para nivel alto. Este es una fracción de un diseño factorial de dos niveles y permite la investigación de n-1 variables en al menos n experimentos (Plackett y Burman, 1946).

Diez variables independientes (factores) se seleccionaron en 12 combinaciones de acuerdo con el diseño mostrado en la sección de resultados y discusión.

El efecto principal de cada variable se calculó simplemente como la diferencia entre el promedio de mediciones realizadas en el ajuste alto (+1) y el promedio de mediciones observadas en el ajuste bajo (-1) de ese factor.

Todos los ensayos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL que contenían 20 mL del medio fermentativo.

El diseño de Plackett-Burman se basa en el modelo de primer orden:

$$Y = B_0 + \sum B_i X_i$$

Donde, Y es la respuesta (actividad celulolítica), B_0 es el intercepto del modelo, B_i es la estimación de la variable y X_i representa la variable.

La significancia de las variables se determinó mediante el cálculo del valor de p (P-valor) a través del análisis de regresión estándar.

Después de estimar la importancia relativa de las variables independientes, se seleccionaron las tres variables más significativas para determinar su nivel óptimo con respecto a la actividad enzimática como respuesta. Por esta razón, se aplicó el diseño de Box-Behnken, que implica tres pasos principales: realizar los experimentos diseñados estadísticamente, estimar los coeficientes del modelo matemático estructurado y predecir la respuesta y comprobar la adecuación del modelo (Box y Behnken, 1960).

Se evaluaron los efectos del sulfato de magnesio, peptona y fosfato monobásico de potasio sobre la actividad celulasa. Los niveles de estos factores se optimizaron para la máxima producción de celulasa (la respuesta). En los resultados muestra un diseño experimental de 14 ensayos, donde cada variable se probó en tres niveles diferentes: bajo (-1), medio (0) y alto (+1).

Una vez que se midió la actividad de la celulasa, se ajustó el modelo polinomial de segundo orden a los datos de respuesta obtenidos a partir del diseño, para generar la predicción mediante la herramienta *Optimizador de respuesta* del programa Minitab 17.

La ecuación polinomial tiene la siguiente forma:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3.$$

Donde, Y es la respuesta pronosticada; B_0 es la constante del modelo; X_1 , X_2 y X_3 son variables independientes; B_1 , B_2 y B_3 son coeficientes lineales; B_{12} , B_{13} y B_{23} son coeficientes de los productos cruzados y B_{11} , B_{22} y B_{33} son los coeficientes cuadráticos.

3.3.6. Recuperación, separación y purificación

Para la etapa de recuperación de la enzima, se procedió a precipitar las proteínas del extracto crudo; obtenido de medio líquido fermentativo de 72 horas centrifugando a 10000 rpm por 5 minutos; con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70 %, seguido de su diafiltración utilizando los dispositivos Amicon™ MWCO 30 kDa para quitar el exceso de sulfato de amonio y a la vez equilibrar las proteínas en buffer Tris-HCl pH 8,5 y almacenarse para la siguiente fase.

Para la etapa de separación y purificación parcial, se realizó un ensayo cromatográfico de intercambio iónico, utilizando la matriz DEAE-Sepharose GE Healthcare. Para esto, se dejó interactuar la resina, pre-equilibrada en el mismo buffer, con la muestra anterior por espacio de 1 hora. Al mismo tiempo, se preparó una curva de NaCl desde concentraciones de 0 a 1000 mM para generar los eluatos. Para todas las etapas mencionadas se trabajó a temperaturas de ~ 4 °C.

Y, para el seguimiento, se ejecutó el respectivo análisis electroforético, según el método descrito por Laemmli en 1970, de las muestras colectadas desde la primera etapa.

3.3.7. Caracterización funcional de celulasas totales

3.3.7.1. Determinación del efecto al cambio de pH

Se asignaron 7 niveles de pH, ejecutados con buffer Brinton-Robinson pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 para las mezclas de reacción. Fijando 3 réplicas de reacción por nivel de pH. Los valores de entrada para el análisis de varianza ordinario de la actividad por pH se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Cuadro resumen de valores de entrada para el ANOVA de pH vs AE

Factor experimental	Valor mínimo	Valor máximo	Niveles	Unidad
pH	4	10	7	pH

Número de observaciones: 28
Variable dependiente: Actividad

Fuente: Elaboración propia

3.3.7.2. Determinación del efecto al cambio de temperatura

Se asignaron 4 niveles de temperatura, ejecutados en incubadoras con flujo de aire continuo a 60, 70, 80 y 90 °C; estableciéndose 3 réplicas de reacción por nivel de temperatura y un análisis de varianza ordinario para comparar las medias de actividad por temperatura.

Tabla 7

Cuadro resumen de valores de entrada para el ANOVA de temperatura vs AE

Factor experimental	Valor mínimo	Valor máximo	Niveles	Unidad
Temperatura	60	90	4	°C

Número de observaciones:12
Variable dependiente: Actividad

Fuente: Elaboración propia

3.3.7.3. Determinación de la estabilidad térmica

Se repartieron alícuotas de extracto crudo enzimático en microtubos de 2 mL, los mismos que se expusieron a tratamientos térmicos de 60, 70, 80 y 90 °C por 30, 60, 120 y 240 minutos. En donde, inmediatamente, al término del tiempo de exposición, se iniciaron las mezclas de reacción fijando 3 réplicas por cada una, generando los resultados de actividad residual que fueron expresados en porcentaje, tomando como 100 % la actividad de la enzima sin exposición a alguna temperatura y cuya actividad fue medida en su temperatura y pH óptimo.

3.3.8. Identificación molecular de la bacteria selecta

La bacteria seleccionada se masificó en caldo Luria Bertoni 0,5 %, centrifugada a 6000 rpm y lavadas con solución salina fisiológica tres veces,

para luego almacenarse en glicerol al 15 % (Sambrook *et al.*, 1989) generando crioviales para su envío.

El procesamiento para el secuenciamiento del gen ARNr 16S y sus productos se encargaron por contrato a la empresa Macrogen Inc. de Seúl, Corea del Sur.

Finalmente, para el análisis de la secuenciación del gen ARNr 16S, se usó la herramienta informática de alineamiento de secuencias de tipo local, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool); disponible en internet por el NCBI (National Center for Biotechnology Information) para el uso de la base de datos correspondiente a secuencias que son recopiladas por el mismo a nivel mundial.

3.3.9. Procesamiento y análisis estadístico de datos

Se utilizó Microsoft Excel para el cálculo de medidas de tendencia central, de dispersión y para la construcción de gráficos de sector circular y de barras. Los datos de la actividad enzimática de los experimentos se procesaron usando Microsoft Excel, Minitab 17 y Stat Graphic Centurion XVI.

El valor óptimo de los niveles para la mayor actividad celulolítica en el experimento de Box-Behnken se calculó utilizando la función *Optimizador de respuesta* de las herramientas de Minitab 17. Los efectos simultáneos de los tres factores más significativos, factores independientes en cada respuesta, se visualizaron utilizando gráficos tridimensionales generados por Minitab 17.

Para el análisis de la secuenciación del gen ARNr 16S, se utilizó la herramienta informática de alineamiento de secuencias de tipo local, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool); disponible en internet en el NCBI (National Center for Biotechnology Information)

IV. RESULTADOS

4.1. Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias

Se reactivó un total de 18 cultivos bacterianos del Cepario de Bacterias Termófilas del Laboratorio de Bioquímica, que posteriormente se sometieron a una selección en dos niveles para establecer una bacteria modelo con mayor eficiencia para producir celulasas.

Se analizaron las características particulares de los microorganismos a nivel macroscópico en base a las diferencias en la morfología de colonia y microscópico en base a su reactividad con la tinción Gram.

Esto se realizó mediante el registro en tabla por observación de colonias aisladas en el estriado por agotamiento (Anexo 3), y de bacterias individuales, fijadas en lámina portaobjeto sometidas a tinción Gram (Anexo 4); provenientes de cultivos de 18 – 21 horas, utilizando un estereoscopio binocular de luz amarilla y microscopio binocular de luz blanca, respectivamente.

El indicado registro se detalla en el anexo 1 y 2.

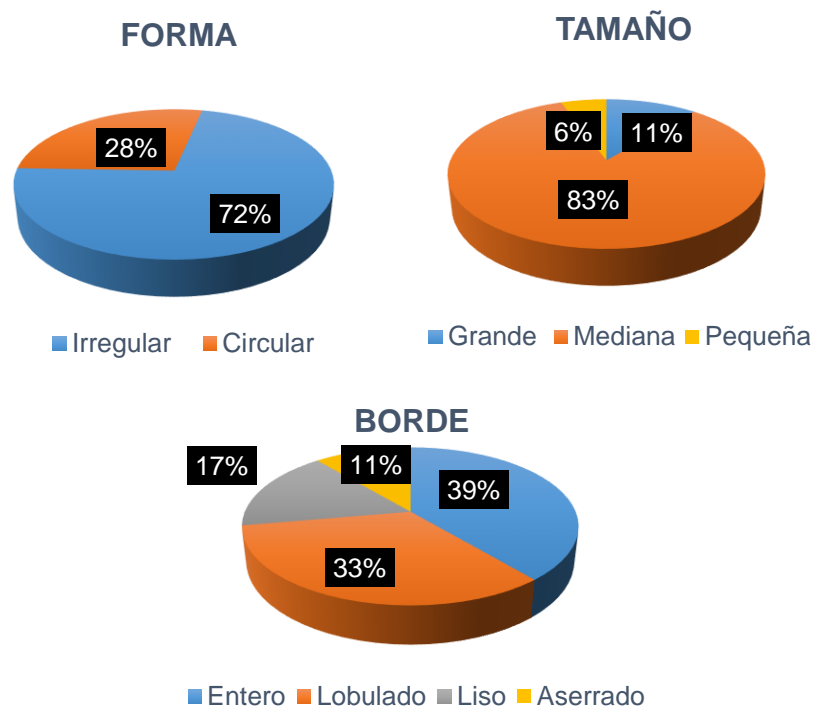


Figura 8. Distribución porcentual del tamaño, forma y borde colonial.

Fuente: Elaboración propia.

Se obtuvo que el 72 % de las 18 bacterias reactivadas mostraron forma circular, el 83% tamaño mediano, el 33 % borde lobulado; y todas presentaron color blanquecino a beige, algunas con centro blanco (Anexo 1 y 3). Asimismo, el 100 % resultaron Gram positivos (Anexo 4).

4.2. Selección de una bacteria modelo

Las bacterias reactivadas se sometieron a una selección en dos niveles; una anterior, en base al carácter cualitativo de la actividad enzimática para el primer nivel y, posteriormente, al carácter cuantitativo de la actividad enzimática.

4.2.1. Por carácter cualitativo de la actividad enzimática

Se determinaron los diámetros de las zonas con hidrólisis mediante tinción con Rojo de Congo; se evidenció actividad enzimática por la aparición de áreas no teñidas que indican la acción del rompimiento de los enlaces β -1, 4 de la celulosa, tras el revelado (Anexo 5). Los diámetros de las zonas de hidrólisis para el medio sólido de papel periódico se muestran en la tabla 8.

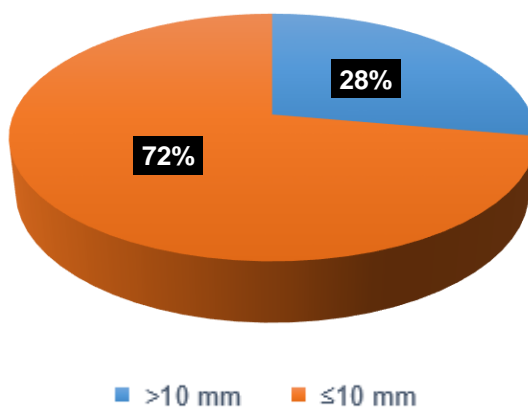


Figura 9. Distribución porcentual de las bacterias con mayor actividad celulolítica en base al diámetro de hidrólisis > 10 mm.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8

Descripción de diámetros de hidrólisis como respuesta de actividad de celulasas en papel periódico

Bacteria	Diámetro (mm)			Desviación estándar
	I	II	Promedio	
TM-8	9,0	9,0	9,0	0,00
CB-16	8,0	7,0	7,5	0,71
CB-20	7,0	7,0	7,0	0,00
BT-13	9,0	9,0	9,0	0,00
BT-14	10,0	10,0	10,0	0,00
BT-16	11,0	10,5	10,8	0,35
BT-19	8,0	8,5	8,3	0,35
BT-20	9,0	9,0	9,0	0,00
CB-13	18,0	19,0	18,5	0,71
TM-12	13,5	14,0	13,8	0,35
FT-3	6,0	5,0	5,5	0,71
FT-4	22,5	21,0	21,8	1,06
FT-8	0,0	0,0	0,0	0,00
FT-10	8,0	9,0	8,5	0,71
FT-13	9,0	8,0	8,5	0,71
FT-14	8,0	7,0	7,5	0,71
Cel-7	18,0	19,0	18,5	0,71
Cel-10	7,0	7,5	7,3	0,35

Fuente: Elaboración propia

Según el ANOVA, para la variable “diámetro de la zona de hidrólisis”, resultó haber diferencias significativas entre varias de las bacterias tratadas (Anexo 9), con un nivel de confianza del 95 %, indicando la existencia de diferencias reales entre sus promedios de la actividad cualitativa de celulasas

entre cada bacteria en las condiciones evaluadas. Para determinar las mejores bacterias productoras de celulasas se hizo la comparación múltiple de Duncan para determinar cuáles promedios, de diámetros de la zona de hidrólisis, son significativamente diferentes de otros.

Tabla 9

Comparación múltiple de Duncan para los promedios del diámetro de la zona de hidrólisis

Bacteria	Casos	Media	Grupos Homogéneos
FT-3	2	5,50	a
FT-8	2	6,00	ab
CB-20	2	7,00	bc
Cel-10	2	7,25	bcd
CB-16	2	7,50	cd
FT-14	2	7,50	cd
BT-19	2	8,25	cde
FT-13	2	8,50	de
FT-10	2	8,50	de
BT-13	2	9,00	ef
TM-8	2	9,00	ef
BT-20	2	9,00	ef
BT-14	2	10,00	fg
BT-16	2	10,75	g
TM-12	2	13,75	h
Cel-7	2	18,50	i
CB-13	2	18,50	i
FT-4	2	21,75	j

Fuente: Elaboración propia.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras con un nivel del 95,0 % de confianza. Se han identificado 10 grupos homogéneos. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de “letras”.

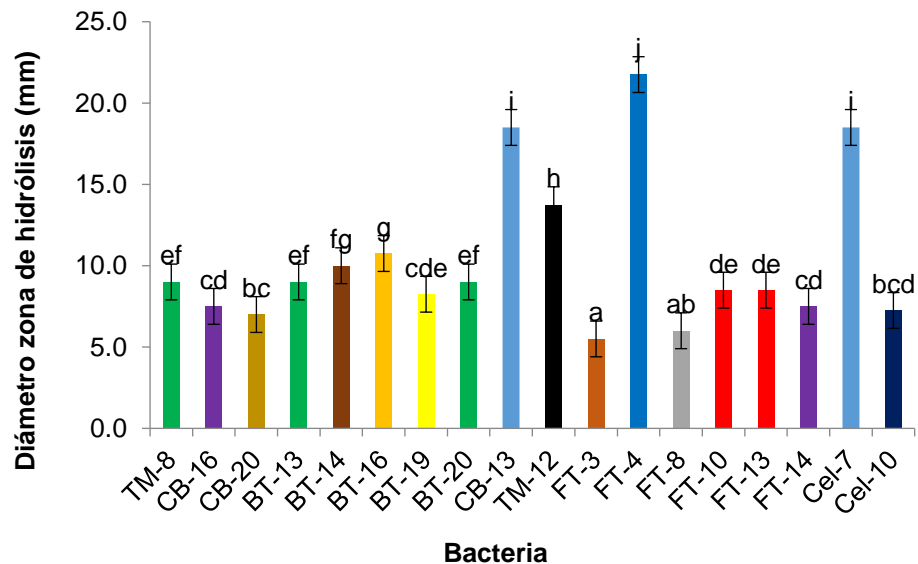


Figura 10. Distribución de los diámetros de la zona de hidrólisis por bacteria productora de celulasas.

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 9, se observa que la FT-4 superó estadísticamente en promedio al resto de bacterias con 21,75 mm de diámetro en área de hidrólisis de celulasas, seguido de la CB-13 y Cel-7, ambas con 18,5 mm. A partir de aquí, se sub-seleccionaron 4 bacterias para el ulterior nivel de selección.

4.2.2. Por carácter cuantitativo de la actividad enzimática

De las bacterias sub-seleccionadas anteriormente, se determinó la actividad de celulasas totales (FPasa) a los 4, 5 y 6 días de fermentación, de extractos crudos obtenidos por fermentación sumergida, partiendo de las 4 bacterias con reporte de mayor actividad cualitativa de celulasas (Tabla 8 y 9). La comparación de la actividad FPasa se muestra en la figura 10.

Tabla 10

Actividad de celulasas totales en el tiempo

Cepa	CB-13		FT-4		TM-12		CEL-7	
Días	FPU/mL	DS*	FPU/mL	DS	FPU/mL	DS	FPU/mL	DS
0	0,006	0,001	0,001	0,002	0,000	0,003	0,002	0,003
4	0,082	0,010	0,090	0,001	0,010	0,006	0,050	0,003
5	0,103	0,006	0,149	0,001	0,010	0,003	0,029	0,003
6	0,133	0,004	0,074	0,002	0,007	0,002	0,061	0,003

*DS: Desviación estándar

Fuente: Elaboración propia.

Notoriamente, el extracto crudo enzimático de CB-13 y FT-4 presentaron la mayor actividad enzimática; sin embargo, CB-13 mostró incremento de actividad hasta el sexto día, mientras que FT-4 tuvo máxima actividad hasta el quinto día.

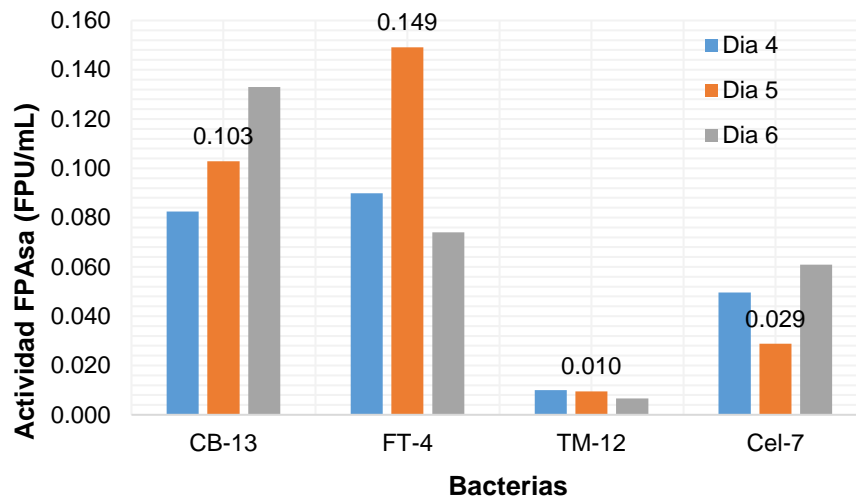


Figura 11. Actividad celulolítica de las bacterias evaluadas por día de fermentación

Fuente: Elaboración propia

La figura 11 describe la actividad generada por las cuatro bacterias subseleccionadas en un medio de producción con papel periódico, donde la bacteria que mayor actividad generó fue la bacteria FT-4 con 0,149 FPU/mL al quinto día, seguida de la CB-13 con 0,103 FPU/mL y las de menor promedio fueron las bacterias TM-12 y Cel-7 con valores inferiores a 0,050 FPU/mL.

Así también, se realizó un análisis de varianza para los promedios generales de actividad por bacteria evaluada (Anexo 10), determinando la existencia de diferencias significativas. En consecuencia, se recurrió a ejecutar el procedimiento de comparación múltiple de Duncan para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Tabla 11

Comparación múltiple de Duncan para los promedios generales de actividad en FPU.mL⁻¹

Bacteria	Casos	Media	Grupos Homogéneos
TM-12	3	0,009	a
Cel-7	3	0,046	a
FT-4	3	0,104	b
CB-13	3	0,106	b

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con la tabla 11, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las letras en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de letra, indicando que existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95,0 % de confianza entre los grupos bacterianos FT-4, CB-13 y TM-12, Cel-7.

Por lo tanto, la bacteria CB-13 con actividad FPAsa de 0,082; 0,103 y 0,133 FPU.mL⁻¹ al tercer, cuarto y quinto día, respectivamente; fue seleccionada para la optimización del medio de fermentación, requerido para la producción de la enzima, por describir la mayor media general de actividad con un valor de 0,106 FPU.mL⁻¹.

4.3. Identificación molecular por análisis de secuencias del gen ARNr 16S

El resultado del secuenciamiento del gen ARNr 16S notifica sobre la identidad de la bacteria respecto con la depositada en la base de datos de GenBank (búsqueda en BLAST), que presentó mayor similitud con la bacteria problema, indicando el porcentaje de identidad y el porcentaje de cobertura con la secuencia que ha sido comparada.

Tabla 12

Similitud de secuencias para el gen ARNr 16S en BLASTN

Bacteria	Descripción	BLASTN			Acceso
		Cobertura %	E value	Identidad %	
CB-13	<i>Geobacillus thermoparaffinivorans</i> strain Ba3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	0,0	99	KC252977.1
	<i>Geobacillus thermoparaffinivorans</i> strain Et2/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97	0,0	99	KJ722455.1

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 12, se observa que el 99 % del query secuenciado de la bacteria CB-13 presenta matches con el hit de la cepa *Geobacillus thermoparaffinivorans* strain Ba3 depositada en la base de datos (identidad) y un 99 % de la secuencia del query fue alineado con dicho hit (cobertura). Además, se obtuvo para el

alineamiento un valor de E-value menor a 0,02, que es indicador de haber ejecutado un alineamiento muy confiable.

4.4. Optimización del medio de fermentativo

Para este propósito, se aplicó estratégicamente un diseño experimental de tamizaje para evidenciar los componentes con mayor influencia sobre el medio fermentativo y otro de superficie respuesta para ubicar las cantidades necesarias de cada uno en mezcla fermentativa que genera la mayor actividad celulolítica; se hace mención al diseño factorial parcial de Plackett-Burman y de Box-Behnken, respectivamente.

4.4.1. Selección de componentes influyentes

Se examinaron diez variables de cultivo independientes, en donde el medio basal tuvo la siguiente composición: 11,7 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3,7 g/L KH_2PO_4 ; 0,6 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,8 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/L extracto de levadura; 0,5 g/L peptona; 10,0 g/L papel periódico; pH 6,0.

Y, al mismo tiempo, se incorporó inductores de producción de celulasas, tales como lactosa y sucrosa.

Las variables independientes examinadas y sus configuraciones se muestran en la tabla 13. La matriz de diseño junto con la correspondiente respuesta (actividad celulolítica en $\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$) se muestra en la tabla 14.

Tabla 13

Componentes del medio fermentativo y niveles de prueba para el experimento de Plackett-Burman

Código	Factor (g/100 mL)	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
A	Papel periódico	0,30	0,50
B	Lactosa	0,25	0,50
C	Sucrosa	0,25	0,50
D	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,171	1,757
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,06	0,11
F	KH ₂ PO ₄	0,57	1,00
G	CaCl ₂	0,06	0,11
H	Extracto de levadura	0,05	0,50
I	Peptona	0,05	0,075
J	pH	6	7

Fuente: Elaboración propia

Se demostró una amplia variación en la productividad de los diferentes ensayos del experimento. La variación osciló de 0 a 0,127 FPU.mL⁻¹.

Esto refleja el efecto significativo de la composición del medio y otras condiciones ambientales en la producción de celulasa. El efecto principal de las variables examinadas en la producción de enzimas celulolíticas se calculó e ilustró gráficamente (Figura 13).

Tabla 14

Diseño experimental aleatorizado de Plackett-Burman para evaluar los factores que influyen en la producción de celulasa

Ensayo	Variables independientes*										Actividad celulasa
	N°	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	0,082
2	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	0,000
3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	0,000
4	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	0,013
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,069
6	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	0,030
7	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	0,011
8	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	0,000
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	0,093
10	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	0,000
11	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	0,108
12	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	0,127

*Variables codificadas igual como se detalla en la tabla 13.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 15*Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman*

Variable	Efecto principal	Coefficientes	Valor t	Valor p
Constante		0,0444167	11,84	0,054
Papel periódico	-0,0328333	-0,0164167	-4,38	0,143
Lactosa	-0,0448333	-0,0224167	-5,98	0,106
Sucrosa	-0,0118333	-0,0059167	-1,58	0,360
(NH ₄) ₂ SO ₄	-0,0205000	-0,0102500	-2,73	0,223
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0515000	0,0257500	6,87	0,092
KH ₂ PO ₄	0,0025000	0,0012500	0,33	0,795
CaCl ₂	-0,0148333	-0,0074167	-1,98	0,298
Extracto de levadura	-0,0225000	-0,0112500	-3,00	0,205
Peptona	0,0205000	0,0102500	2,73	0,223
pH	0,0311667	0,0155833	4,16	0,150

Fuente: Elaboración propia

Los coeficientes de regresión, los valores de t, p y los porcentajes de nivel de confianza para las diez variables experimentales se muestran en la tabla 14.

El nivel de significación (p-valor) se determina usando la prueba t de Student. La prueba t, para cualquier efecto individual permite una evaluación de la probabilidad de encontrar el efecto observado puramente por casualidad; de esta probabilidad que es suficientemente pequeña, se acepta

la idea de que el efecto fue causado por la variación del nivel de la variable bajo prueba.

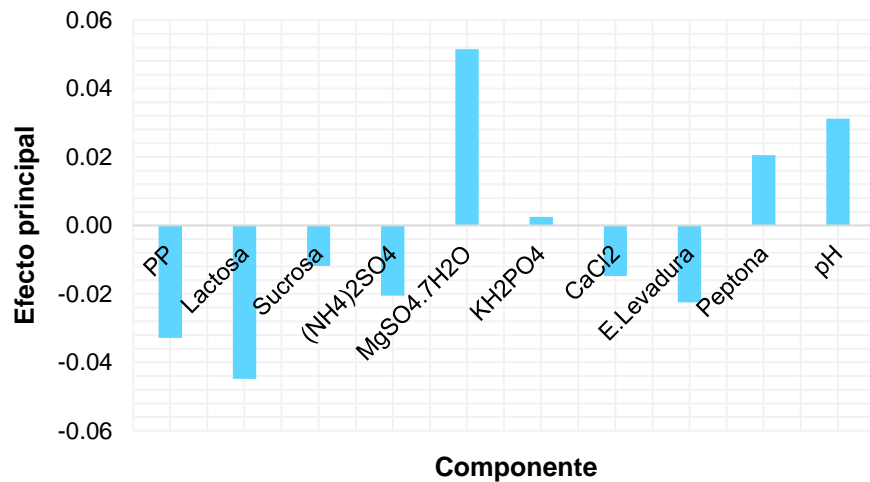


Figura 12. Efecto de las condiciones ambientales sobre la producción de celulasa

Fuente: Elaboración propia

El signo de una estimación de factor indica, en promedio, cuál factor de ajuste da lugar a grados más altos de respuesta. Una estimación grande, ya sea positiva o negativa, cercana de cero, significa que un factor tiene poco o ningún efecto.

Sobre la base de estos resultados, fue comprensible que la actividad celulolítica estuvo directamente relacionada con $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, peptona y pH; en consecuencia, fueron seleccionados para su optimización los dos primeros y, aunque fue el componente con menor influencia según el experimento, el

KH₂PO₄, debido a que su incremento o descenso en masa influye directamente sobre el pH, porque genera el tampón del medio fermentativo con una capacidad amortiguadora determinada que, en todos los casos con actividad superior a cero, fue sobrepasada, generando el cambio de pH detectado durante la fermentación.

Por otra parte, la lactosa y el papel periódico en exceso reprimieron parcialmente la actividad enzimática durante el bioproceso. Mientras que el extracto de levadura, CaCl₂, (NH₄)₂SO₄ y sucrosa, solo ligeramente. Por lo que se mantuvieron en su nivel bajo para el siguiente experimento.

4.4.2. Maximización y predicción de la respuesta

Se aplicó un segundo experimento multifactorial de acuerdo con el diseño de Box-Behnken para determinar el nivel óptimo de cada una de las variables independientes más significativas para obtener la máxima producción de enzima celulasa.

Tabla 16

Niveles de las variables elegidas para el experimento de optimización Box-Behnken

Variable (g/100mL)	Código	Nivel bajo (-1)	Nivel medio (0)	Nivel alto (+)
MgSO ₄ .7H ₂ O	X ₁	0,110	0,275	0,440
KH ₂ PO ₄	X ₂	0,900	1,350	1,800
Peptona	X ₃	0,075	0,1125	0,150

Fuente: Elaboración propia.

Se examinó cada uno de los tres factores de las influencias más elevadas como se dilució a través del diseño experimental de Plackett-Burman, siendo $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (X_1), KH_2PO_4 (X_2) y peptona (X_3) en tres niveles diferentes codificados (Tabla 16).

Tabla 17

Respuesta de la actividad celulolítica influenciada por X_1 , X_2 y X_3 en el experimento Box-Behnken

N°	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KH_2PO_4	Peptona	FPU.mL ⁻¹
1	0,275	0,9	0,150	0,146
2	0,275	1,8	0,075	0,151
3	0,275	1,35	0,1125	0,141
4*	0,275	1,35	0,1125	0,146
5	0,44	0,9	0,1125	0,124
6	0,44	1,35	0,075	0,137
7	0,11	0,9	0,1125	0,138
8	0,275	1,35	0,1125	0,125
9	0,11	1,8	0,1125	0,098
10	0,11	1,35	0,075	0,135
11	0,44	1,8	0,1125	0,138
12	0,44	1,35	0,150	0,124
13	0,11	1,35	0,15	0,112
14	0,275	1,8	0,15	0,106
15	0,275	0,9	0,075	0,108

*Ensayo repetido

Fuente: Elaboración propia.

Las 14 combinaciones examinadas diferentes se muestran en la tabla 17; en donde todos los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizó el promedio de las observaciones.

Los resultados experimentales se introdujeron en forma de gráficos de superficie (Figura 13), donde mostró que los niveles de 0.11 g/100mL; 0,90 g/100mL y 0,15 g/100mL de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 y peptona, respectivamente, apoyan una actividad celulasa alta.

Para predecir el punto óptimo, dentro de las restricciones experimentales, una función polinomial de segundo orden se ajustó a los resultados experimentales (algoritmo de optimización no lineal) de la actividad celulasa:

$$FPU = 0,562 - 0,351X_1 - 0,272X_2 - 0,75X_3 + 0,023X_1^2 + 0,0262 X_2^2 + 4,33X_3^2 + 0,496X_1X_2 - 2,93X_1X_3 + 0,279X_2X_3.$$

A nivel de modelo, las medidas de correlación para la estimación de la ecuación de regresión son los coeficientes de correlación múltiple R y el coeficiente de determinación R^2 . Cuanto más cercano sea el valor de R^2 a 1, mejor es la correlación entre los valores medidos y los predichos.

Tabla 18*Análisis de varianza para actividad celulasa*

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:MgSO ₄ .7H ₂ O	5.E-7	1	5.E-7	0,00	0,9777
B:KH ₂ PO ₄	0,001860	1	0,0018605	3,22	0,1329
C:Peptona	0,000480	1	0,0004805	0,83	0,4039
AA	0,000001	1	0,0000018	0,00	0,9571
AB	0,005402	1	0,0054022	9,34	0,0282
AC	0,001332	1	0,0013322	2,30	0,1896
BB	0,000100	1	0,0001001	0,17	0,6946
BC	0,000090	1	0,0000902	0,16	0,7092
CC	0,000142	1	0,0001423	0,25	0,6409
Error total	0,002892	5	0,0005785		
Total (corr.)	0,012284	14			

R-cuadrada = 76,4525 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 34,0671 por ciento

Fuente: Elaboración propia.

En este experimento, el valor de R^2 fue de 0,7645 para la actividad de la celulasa, indicando que el modelo, así ajustado, explica 76,5 % de la variabilidad de la actividad celulasa. Además, se observa que el valor 0.0006 como cuadrado medio del error, que llega a constituir la varianza del error, es menor que la unidad, por lo que la variabilidad de los datos es adecuada para el trabajo realizado.

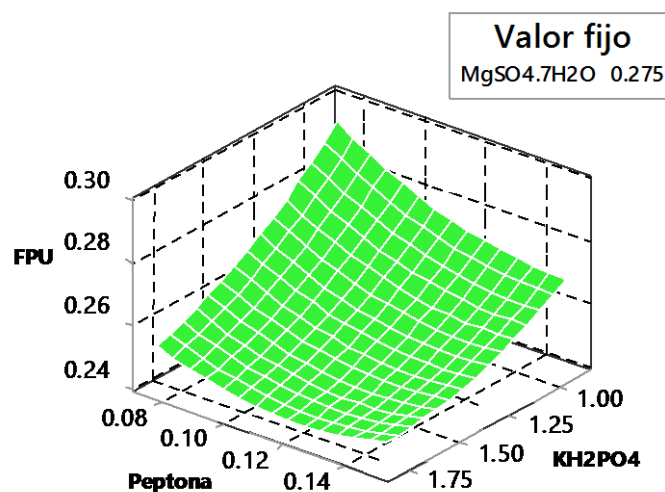
Tabla 19

Resumen de valores de salida del optimizador de respuesta con meta a maximizar actividad celulasa

Factor (mg/100mL)	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel óptimo
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,11	0,44	0,11
KH ₂ PO ₄	0,9	1,8	0,90
Peptona	0,075	0,15	0,15

Fuente: Elaboración propia.

Se calcularon los niveles óptimos de los tres componentes obtenidos del punto máximo del modelo polinomial utilizando la función de optimizador de respuesta de las herramientas de Minitab 17.0 y se encontró que eran: MgSO₄.7H₂O 0,11 g/100mL; KH₂PO₄ 0,90 g/100mL y peptona 0,15 g/100mL, con una respuesta máxima prevista de 0,324 FPU.mL⁻¹.



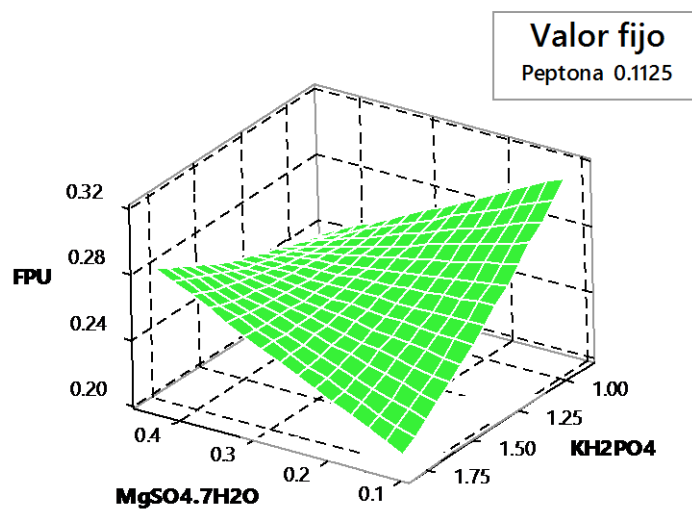
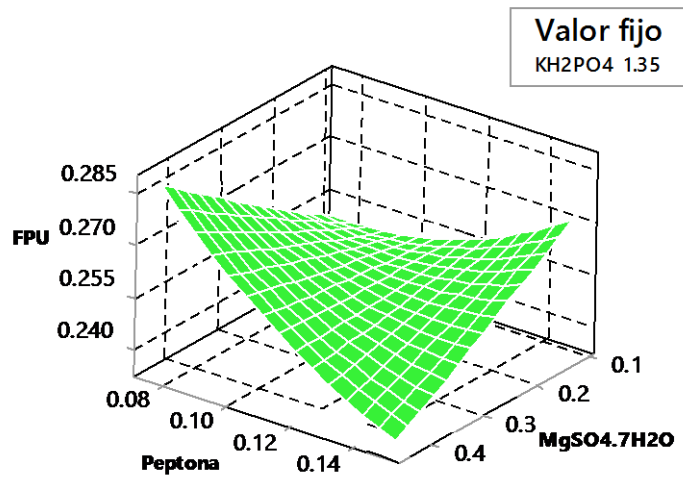


Figura 13. Gráficos tridimensionales que muestran la superficie respuesta afectada por las variables de cultivo durante la producción de enzimas celulolíticas.

Fuente: Elaboración propia

La fórmula del medio optimizado, para 100 mL, es la siguiente: 0,30 g papel periódico; 0,25 g lactosa; 0,25 g sucrosa; 1,17 g (NH₄)₂SO₄; 0,06 g CaCl₂; 0,2

g extracto de levadura; 0,11 g MgSO₄.7H₂O; 0,90 g KH₂PO₄; 0,15 g peptona; pH 6,5; temperatura de cultivo 60 °C y tiempo de incubación 72 horas.

La actividad enzimática medida en un experimento de verificación, utilizando este medio, fue de 0,292 FPU.mL⁻¹.

4.5. Contraste de la recuperación de celulasas totales

El extracto crudo enzimático recuperado del ensayo fermentativo se constituyó en un solo volumen, al cual se le hizo determinaciones de proteína, actividad específica y rendimiento, en función del peso seco de sustrato. Y se compararon los resultados obtenidos antes y después del experimento de optimización.

Tabla 20

Comparación de resultados mediante indicadores de producción

Indicador	Fuente de enzima		Relación (veces)
	Extracto crudo		
	Antes	Después	
Rendimiento (U/gss*)	10,61	97,44	9,18
Actividad específica (U/mg)	2,81	1,56	0,55
Proteína total (mg/mL)	0,04	0,20	5,00

*Gramos de sustrato seco

Fuente:

Elaboración propia

4.6. Separación y purificación de la β -glucosidasa

El extracto crudo enzimático recuperado del ensayo fermentativo de volumen final 50 mL, realizado por triplicado, se constituyó en un volumen total de 120 mL, al cual se le sometió a los pasos de recuperación y concentración proteica detallados en los métodos anteriores. Decurso a esto, se intentó separar y purificar la enzima β -glucosidasa mediante cromatografía de intercambio aniónico, generando fracciones de composición proteica distintas.

4.6.1. Cromatografía de intercambio iónico (IEX)

En la cromatografía, las fracciones eluidas con actividad glucosidasa se hallaron principalmente a lo largo del tercer al sexto segmento del gradiente, es decir, eluyeron entre 250 mM y 550 mM de eluyente (amortiguador con sal).

Los eluatos con actividad positiva con valores de DO_{595} mayores a 0,2 fueron juntados y concentrados para su almacenamiento y futura caracterización. Asimismo, se elaboró el cromatograma correspondiente que se detalla en la figura 14.

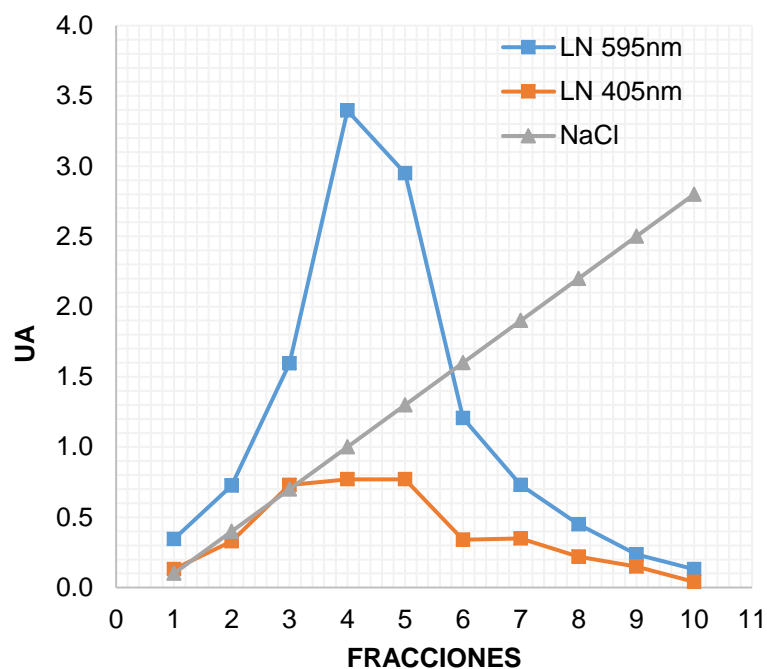


Figura 14. Cromatograma de intercambio aniónico

Fuente: Elaboración propia

Se observa el perfil de absorbancia a 595 nm y 405 nm para la detección de las proteínas y la actividad β -glucosidasa, respectivamente. Así mismo se evidencia la separación de la enzima en las fracciones 3, 4 y 5 debido a que el pico de proteína y actividad en el cromatograma se corresponden.

4.6.2. Análisis electroforético de proteínas (SDS-PAGE)

Para el seguimiento y análisis de pureza de la muestra final, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % (p/v), el cual se ilustra en la figura 15.

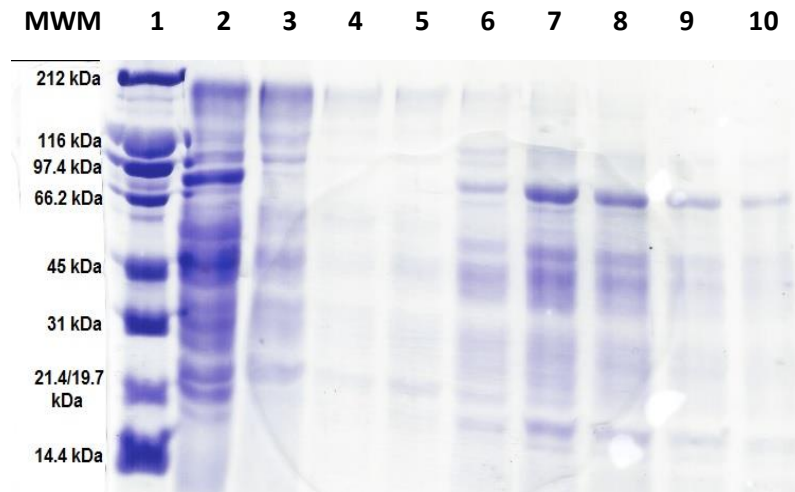


Figura 15. Análisis electroforético de la purificación por IEX de la enzima glucosidasa. Carril 1: Marcador de masa molecular. Carril 2: Diafiltrado. Carril 3: Excluido. Carril 4: Remanente. Carril 5 al 10: Fracciones (100 – 1000 mM NaCl).

Fuente: Elaboración propia

Se observa una banda única pronunciada, entre los 97,4 kDa y 66,2 kDa, aislada respecto de otras más tenues (carriles 3 y 4), en donde se encontró actividad β -glucosidasa, lo que indica que, dentro de la composición proteica de la fracción en cuestión, existen todavía otras proteínas que no son enzimas.

Sin embargo, el carril 3 correspondiente al excluido muestra una buena cantidad de proteínas que no establecieron una unión lo suficientemente fuerte como para ser retenidas por el grupo DEAE.

4.7. Caracterización funcional de celulasas totales

Con el fin de caracterizar la enzima recuperada y ver su comportamiento frente a la temperatura y el pH, se realizaron ensayos de actividad catalítica y estabilidad térmica para que con ello se permita dilucidar mejor el enfoque de su uso para su futura aplicación.

4.7.1. Efecto del cambio de temperatura sobre la actividad de la enzima.

Se determinó el efecto del cambio de temperatura sobre la actividad enzimática expresado en FPU.mL⁻¹, realizando ensayos de reacción en un gradiente de temperatura desde los 60 a 90 °C; los resultados se visualizan a continuación.

Tabla 21

Actividad promedio de celulasas totales frente a la variación de temperatura

Temperatura (°C)	FPU.mL ⁻¹	Desv. Estándar
60	0,097	±0,006
70	0,172	±0,017
80	0,152	±0,007
90	0,059	±0,005

Fuente: Elaboración propia

Tabla 22

Análisis ordinario de varianza para la media de actividad celulolítica por efecto de temperatura

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0237663	3	0,00792211	81,11	0,0000
Intra grupos	0,0007813	8	0,0009766		
Total (Corr.)	0,0245477	11			

Fuente: Elaboración propia.

La tabla ANOVA descompone la varianza de la actividad celulolítica en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 81,11, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-p de la prueba-F es menor que 0,05 existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de AE entre un nivel de temperatura y otro, con un nivel del 95.0 % de confianza.

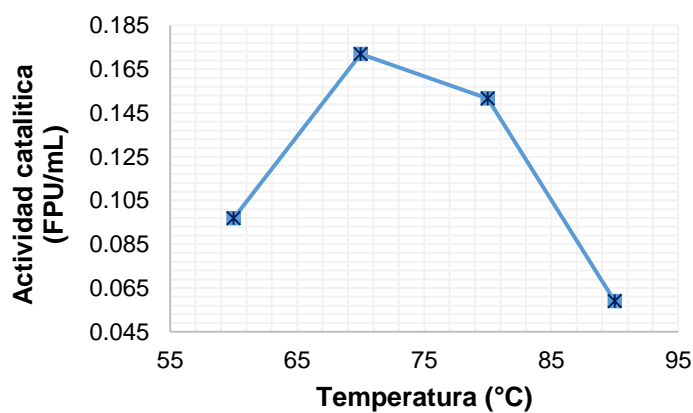


Figura 16. Curva de temperatura para la actividad de celulasas totales

Fuente: Elaboración propia.

4.7.2. Efecto del cambio de pH sobre la actividad de la enzima

Se determinó el efecto del cambio de pH sobre la actividad enzimática expresado en FPU.mL⁻¹ realizando ensayos de reacción en un gradiente de pH desde valores de 4 a 10; los resultados se detallan en la tabla 23.

Tabla 23

Actividad promedio de celulasas totales frente a la variación del pH

pH	FPU.mL ⁻¹	Desv. Estándar
4	0,0078	±0,0010
5	0,0091	±0,0006
6	0,0093	±0,0009
7	0,0101	±0,0010
8	0,0074	±0,0007
9	0,0063	±0,0014
10	0,0061	±0,0007

Fuente: Elaboración propia.

Así mismo, se ejecutó un análisis de varianza ordinario para la Actividad, en donde se compararon los valores medios de Actividad para los 7 diferentes niveles de pH. Los ítems de salida se describen a continuación en la tabla 24.

Tabla 24

Análisis ordinario de varianza para la actividad por pH

Fuente	Suma de cuadrado	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0057499	6	0,000958321	10,80	0,0000
Intra grupos	0,0018627	21	0,000088702		
Total (Corr.)	0,0076126	27			

Fuente: Elaboración propia.

La tabla ANOVA descompone la varianza de la actividad de celulasas en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 10.80, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Como el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05; existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de actividad celulolítica entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

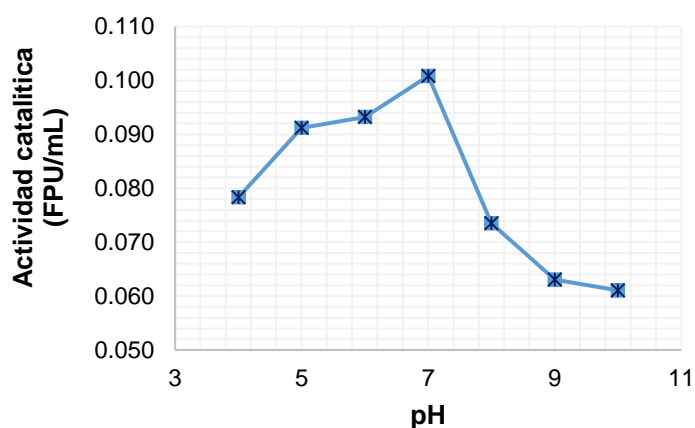


Figura 17. Curva de pH para la actividad de celulasas totales

Fuente: Elaboración propia.

4.7.3. Estabilidad térmica

Se determinó la termostabilidad de la enzima frente a 60, 70, 80 y 90 °C; en donde se evidencia la existencia de actividad residual para todos los tiempos de cada exposición. Además, los descensos súbitos solo se observan para los tratamientos a 80 y 90 °C después de los 120 minutos; mientras que,

para los demás casos, la actividad residual supera el 45 % de la actividad de la enzima a tiempo cero.

Tabla 25

Actividad residual de celulasas totales frente a tiempos de exposición y temperaturas de tratamiento

TE (min)	Actividad residual							
	60 °C		70 °C		80 °C		90 °C	
	FPU/mL	DE	FPU/mL	DE	FPU/mL	DE	FPU/mL	DE
30	0,08	±0,001	0,12	±0,006	0,11	±0,009	0,09	±0,001
60	0,15	±0,000	0,18	±0,003	0,19	±0,001	0,09	±0,002
120	0,11	±0,001	0,13	±0,002	0,13	±0,002	0,08	±0,005
240	0,12	±0,002	0,10	±0,002	0,07	±0,001	0,07	±0,003

TE: Tiempo de exposición
DE: Desviación estándar

Fuente: Elaboración propia.

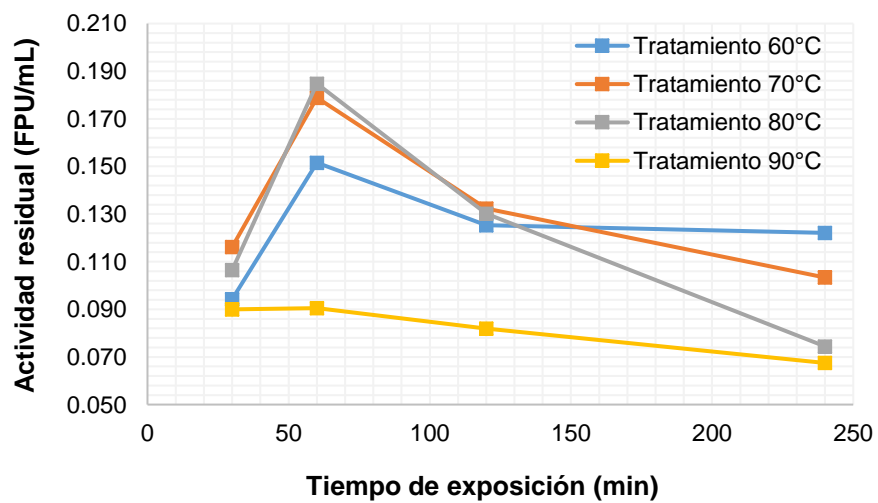


Figura 18. Curvas de actividad residual frente a tiempos de exposición.

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con la estabilidad de la enzima frente a distintas temperaturas por tiempos de hasta 240 minutos, cabe resaltar el incremento de la actividad a los 60 minutos de exposición para todos los casos y el descenso súbito de la actividad para los tratamientos de 80 y 90 °C; de los cuales, para este último, la actividad residual resultó con los valores más bajos en comparación a los otros tratamientos y con poca variación durante los tiempos de exposición.

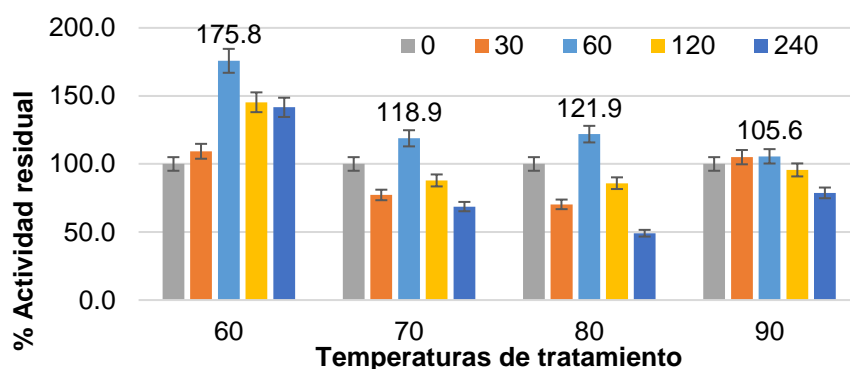


Figura 19. Diagrama de barras del porcentaje de actividad residual frente a las temperaturas de tratamiento

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 19, se observa el comportamiento que sigue la actividad residual en el avance del tiempo de exposición que independientemente del valor inicial de la actividad a exposición cero minutos (sin tratamiento) hay un aumento y una buena estabilidad para 60°C, por lo que se encuentran concentrados allí los mayores valores en % de actividad residual; mientras que en los demás casos, hay un descenso de actividad residual progresivo por el tiempo de exposición.

V. DISCUSIÓN

Identificación molecular

La bacteria CB-13 presenta un 99 % de identidad con la cepa *Geobacillus thermoparaffinivorans* strain Ba3, la cual es termófila y productora de celulasas, tiene correlación con el reporte de Zhao *et al.* (2015), quienes identificaron y mostraron también que bacterias termofilas del genero *Geobacillus* aisladas originalmente de un géiser son capaces de producir celulasas termoestables; encontradas junto a *Desulfotomaculum*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Paenibacillus* y *Enterobacter*, a las cuales denominó Consorcio XM70 para su estudio.

Componentes influyentes.

Se observó que el papel periódico en exceso influyó negativamente sobre la actividad celulasa; una causa probable de esto, además de los productos de degradación acidificantes, es que el material lignocelulósico presente en el papel periódico tiene inhibidores de celulasas, tales como sustancias con grupos SH-, metales como el hierro, mercurio, níquel y cobre (Guerfali *et al.*, 2014); procedentes del procesamiento para la impresión del mismo.

En los ensayos fermentativos anteriores a la optimización, se observó la caída en el valor de pH del medio y detención del crecimiento al mismo tiempo; esto se corresponde con Marquina (1991), quien concluyó que un descenso en los valores de pH del medio produce un descenso en el rendimiento y,

consecuentemente, en la tasa específica de crecimiento. Y, en consecuencia, explica por que fue detectado al pH como factor influyente en el experimento de Plackett-Burman.

Producción de celulasas.

Los valores del rendimiento de producción en celulasas bacterianas del género *Bacillus*, reportados son en algunos casos similares y hasta superados, tales como FPAsa 2,8 UI/gds y B-glucosidasa 4,5 UI/gds; obtenido de *Bacillus subtilis* por FSS de residuos de banana (Heck et al., 2002). Además, de actividad FPAsa de 1,08 UI/mg obtenido de *Bacillus subtilis* por fermentación, en biorreactor cilíndrico, de residuos de la industria de soya (Krishna et al., 1999). Y por dos cepas de *Bacillus licheniformis* termotolerantes con 0,02 FPU/mg y 0,10 FPU/ mg, respectivamente (Fijimoto et al., 2011).

Zhao et al. (2015) obtuvo actividades máximas sobre celulosa de papel de filtro y β -glucosidasa del consorcio XM70 después de incubación a 80 °C y pH 7,0 (2 días) y 70 °C y pH 8,0 (4 días), respectivamente.

Inducción por fuentes de carbono y nitrógeno

El mejoramiento del medio de fermentativo se explica en gran parte, por el fundamento de inducción de Sachslehner et al. (1998), quien señala que la formación simultánea de las glicanasas podría ser provocado por varios polisacáridos estructuralmente semejantes a los constituyentes de carbohidratos

del material lignocelulósico, tras haber obtenido buenos resultados en la inducción de mananasas, xylanases y glucanasas. Esto se refuerza con los resultados de Shankar y Isaiarasu (2011), quienes detallan el efecto de las fuentes de carbono sobre la producción de celulasa por *Bacillus pumilus* EWBCM1; en donde tras 72 horas de período de incubación a 37 °C, se registró la máxima producción de celulasa en medio suplementado con galactosa ($0,5851 \pm 0,006$ UI/mL), mientras que la producción mínima de celulasa se registró en medio no suplementado, es decir, solo celulosa ($0,0419 \pm 0,004$ UI/mL).

Además, para Asha *et al.* (2012) la presencia de 0.5 % de extracto de levadura indujo en un mismo ensayo fermentativo la máxima producción de celulasa y biomasa por la bacteria termófila *Paenibacillus barcinonensis*. Asimismo, es importante señalar que para Shahzadi *et al.* (2014) la producción patrón de enzimas cambia por la interacción entre fuentes de carbono y nitrógeno; es así que, en su estudio, la combinación de glucosa y sulfato de amonio resultó ser la mejor para una producción máxima de exoglucanasa ($399 \pm 4,1$ U) y β -glucosidasa ($230 \pm 3,6$ U).

Caracterización funcional

La mayor actividad enzimática de celulasas según Nataraja *et al.* (2010), depende, entre otros factores, del pH y temperatura óptima, lo que se comprobó para la enzima inmersa en el extracto crudo, reportando un pH y temperatura óptima de 7 y 70 °C, respectivamente. Encontrándose la existencia de un efecto real sobre dichos factores. De aquí, también resalta que existe relación con el pH

y la temperatura óptima de actividad FPasa de enzimas provenientes de bacterias del orden Firmicutes y algunos de la Familia Bacillaceae, reportadas por Zhao *et al.* (2015), en donde la actividad máxima de celulasa del Consorcio XM70 (*Geobacillus*, *Desulfotomaculum*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Paenibacillus* y *Enterobacter*) purificada fue de 3,77 U/mg a pH 7,0 y 70 °C.

Además, su actividad se mantuvo alrededor del 70 % de su valor máximo después de una incubación a 80 °C durante 60 min. Concluyendo, que la celulasa purificada tiene cualidades para ser útil en aplicaciones industriales, debido a su alta estabilidad a la temperatura.

VI. CONCLUSIONES

Se obtuvo 4 bacterias CB13, Cel-7, FT-4 y TM-12 selectas en base al carácter cualitativo de la actividad celulasa sobre medio sólido con sustrato papel periódico; las cuales, conformaron los tres grupos homogéneos de mayor diámetro de la zona de hidrólisis de entre un conjunto total de 18 bacterias.

Se seleccionó la bacteria CB-13 en base al carácter cuantitativo de la actividad celulasa del extracto crudo enzimático recuperado de una fermentación sumergida con sustrato papel periódico, con un valor de 0,106 FPU.mL⁻¹ como promedio general. Asimismo, su identificación molecular con una similitud del 99 % con *Geobacillus thermoparaffinivorans* strain Ba3.

Se optimizó el medio fermentativo para la mayor producción de celulasas describiendo una nueva fórmula (para 100 mL): 0,30 g papel periódico; 0,25 g lactosa; 0,25 g sucrosa; 1,17 g (NH₄)₂SO₄; 0,06 CaCl₂; 0,2 extracto de levadura; 0,11 MgSO₄.7H₂O; 0,90 KH₂PO₄; 0,15 peptona; pH 6,5; temperatura de cultivo 60 °C y tiempo de incubación 72 horas. Con una actividad de 0,292 FPU.mL⁻¹, verificada experimentalmente utilizando este medio. Y un rendimiento de 97,44 U.gss⁻¹ que es 9,18 veces respecto del rendimiento sin optimizar.

El peso molecular aproximado de la β-glucosidasa, constituyente de las celulasas totales, en estudio tiene un valor aproximado de 92,6 kDa, según el análisis electroforético de la purificación.

La celulasa extracelular, secretada por el microorganismo *Geobacillus thermoparaffinivorans* es estable por 4 horas a temperatura de 70 °C y 2 horas a 80 °C. La actividad máxima se alcanza a pH 7,0 y su temperatura óptima de reacción es de 70 °C.

VII. RECOMENDACIONES

En la aplicación del diseño de Plackett-Burman configurar los valores de nivel bajo hasta cero para dispensar de algunas variables que su ausencia o presencia sea insignificante para el rendimiento de la producción de las enzimas.

Determinar el peso molecular de las enzimas por otras técnicas, tales como cromatografía de filtración en gel, modelado estructural de proteínas y análisis aminoacídico.

Añadir otros pasos de separación para la enzima β -glucosidasa, tales como cromatografía de filtración en gel y de interacción hidrofóbica.

Ejecutar una caracterización cinética, funcional, estructural y regulatoria de la β -glucosidasa y las otras enzimas constituyentes del sistema celulasa individualmente utilizando sustratos sintéticos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M.** (1980). *Introducción a la microbiología del suelo*. México: AGT Editor, S. A. pp. 162-177.
- Asha, B. M., Revathi, M., Yadav, A., & Sakthivel, N.** (2012). *Purification and characterization of a thermophilic cellulase from a novel cellulolytic strain, Paenibacillus barcinonensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(11), 1501-1509.
- Aubert, J.** (1988). *Biochemistry and genetic of cellulose degradation*. Academic press. USA. p. 11.
- Bagga, P. S.; Sandhu, D. K. & Sharm, S.** (1990). *Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by Aspergillus nidulans*. *Journal of Applied Bacteriology*, v.68, p. 61-68.
- Beilen, J. B. & Li, Z.** (2002). *Enzyme Technology: an overview*. *Current Opinion in Biotechnology*. 13, 338-344.
- Bhat, M. K & Bhat, S.** (1997). *Cellulose degrading enzymes and potential industrial applications*. *Biotechnology Advances*, v.15, p. 583-620.
- Bhat, M. K.** (2000). *Cellulases and related enzymes in Biotechnology*. *Biotechnology Advances*, 18, 355-383.

Binti, N. F. (2013). *Enzyme hydrolysis of old newspaper to produce simple sugar for fermentation process*. Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering, University Malaysia Pahang. UMP Institutional Repository, 24pp.

Box, G. & Behnken, D. (1960). *Some new three-level designs for the study of quantitative variables*. *Technometrics*. 2, 455–475.

Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Brown, R. M. J. & Saxena, I. M. (2007). *Cellulose: Molecular and structural biology*, Springer, ISBN 978-1-4020-5332-0, New York, NY.

Castro, A. M & Pereira, N. Jr. (2010). *Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais*. *Química Nova*, v. 33, n. 33, p. 181-188.

Chao, Z., Yunjin, D., Bin, L., Xiong, L., & Yifan, H. (2015). *Purification and characterization of thermostable cellulase from consortium XM70 in terrestrial hot spring with sugarcane bagasse*. Recuperado a partir de <http://or.nsf.gov.cn/handle/00001903-5/249088>

Chen, H., Han, Q., Venditti, R. A., & Jameel, H. (2015). *Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Newspaper Having High Lignin Content for Bioethanol*

Production. BioResources, 10(3). <https://doi.org/10.15376/biores.10.3.4077-4098>

Chial, H. J.; Thompson, H. B. & Splittgerber, A. G. (1993). *A spectral study of the charge forms of Coomassie Blue G*. *Analyt. Biochem.* 209, 258–266.

Congdon, R. W.; Muth, G. W. & Splittgerber, A. G. (1993) *The binding interaction of Coomassie Blue with proteins*. *Analyt. Biochem.* 213, 407–413.

Dienes, D.; Egyházi, A.; Réczey, K. (2003). *Treatment of recycled fiber with Trichoderma cellulases*. *Industrial Crops and Products*, 20, 11-21.

Dwivedi, P., Alavalapati, J. R. R., & Lal, P. (2009). *Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion technologies, current production status, economics, and emerging developments*. *Energy for Sustainable Development*, 13(3), 174-182. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2009.06.003>

Festucci - Buselli, R.; Otoni, W. & Joshi, C. (2007). *Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19 (1), pp. 1-13.

Freudenberg, K.; Knauber, H. & Cramer, F. (1951). *Die Übereinstimmung der Sophorose mit 2-[β -Glucosido]-glucose*. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 84 pp. 144-146.

Fujimoto, N., Kosaka, T., Nakao, T., & Yamada, M. (2011). *Bacillus licheniformis* bearing a high cellulose-degrading activity, which was isolated as a heat-resistant and micro-aerophilic microorganism from bovine rumen. *Open Biotechnology Journal*, 5, 7–13.

Ghose, T. (1987). *Measurement of cellulase activities*. *Pure and Applied Chemistry*, 59 (2) pp. 257-268.

Grigorevski-Lima, A. L.; Nascimento, R. P.; Bon, E. P. S. & Coelho, R. R. R. (2005). *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme and Microbial Technology*, 37pp. 272-277.

Guerfali, M., Saidi, A., Gargouri, A., & Belghith, H. (2015). *Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Waste Paper for Ethanol Production Using Separate Saccharification and Fermentation*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), 25-42. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1243-1>

Heck, J. X., Hertz, P. F., & Ayub, M. A. Z. (2002). *Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(3), 213-218. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000300005>

Hendricks, C. W.; Doyle J. D. & Hugley, B. (1995). *A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. Applied Environmental Microbiology*, 61 pp. 2016-2019.

Herráez, A. (2017). *Ensayo de actividad enzimática de la ramnosil glucosidasa*. Laboratorio virtual. Recuperado de http://biomodel.uah.es/lab/abs/activ_enz_reaccion.htm

Howard, R.L.; Abotsi E.; Jansen van Rensburg E.L. and Howard S. (2003). *Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology*, 2pp. 481–491.

Jahangeer, S., Khan, N., Jahangeer, S., Sohail, M., Shahzad, S., Ahmad, A. and Khan, SA. (2005). *Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. Pak. J. Bot*, 37(3): 739-748.

Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). *Microbial cellulases: Engineering, production and applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188-203. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>.

Kaur, J., Chadha, B. S., Kumar, B. A., Ghatora, S. K., & Saini, H. S. (2007). *Purification and characterization of β -glucosidase from Melanocarpus sp. MTCC 3922. Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 0-0. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue2-fulltext-4>.

Khan, J. A., & Singh, S. K. (2011). *Production of cellulase using cheap substrates by solid state fermentation*. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, 1(3), 179–187.

Khelil, O., Choubane, S., & Cheba, B. A. (2015). *Co-production of Cellulases and Manganese Peroxidases by Bacillus sp. R2 and Bacillus Cereus 11778 on Waste Newspaper: Application in Dyes Decolourization*. Procedia Technology, 19(1), 980-987. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2015.02.140>

Kontturi, E., Tammelin, T., & Österberg, M. (2006). *Cellulose—model films and the fundamental approach*. Chemical Society Reviews, 35(12), 1287-1304. <https://doi.org/10.1039/B601872F>

Krishna, C. (1999). *Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes*. Bioresource Technology, 69(3), 231-239. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00193-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00193-X)

Kruger, N.J. (2002) *The Bradford method for protein quantitation*. In Walker, J.M. (Ed). *The Protein Protocols Handbook*; Humana Press: Totowa, NJ. 4, 15-21.

Kumakura, M. (1997). *Preparation of immobilized cellulase beads and their application to hydrolysis of cellulosic materials*. Process Biochemistry, 32(7), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00011-3)

- Laemmli, U. K.** (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lee, D. H., Cho, E. Y., Kim, C.-J., & Kim, S. B.** (2010). Pretreatment of waste newspaper using ethylene glycol for bioethanol production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(6), 1094-1101. <https://doi.org/10.1007/s12257-010-0158-0>
- Li, Q., & Renneckar, S.** (2011). Supramolecular structure characterization of molecularly thin cellulose I nanoparticles. *Biomacromolecules*, 12(3), 650-659. <https://doi.org/10.1021/bm101315y>
- Li, X.** (1997). *Streptomyces cellulolyticus* sp. nov., a new celulolytic member of the genus *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology*, 47 pp. 443-445.
- Lynd, L., Weimer, P., Zyl, W. & Pretorius, I.** (2002). *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology*. USA. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3) pp. 506- 577.
- Mandels, M. y Reese, E.** (1957). *Induction of cellulase in Trichoderma viride as influenced by carbon sources and metals*. *Journal of Bacteriology*, 73(2) pp. 269-278.
- Mansfield, S. D., Mooney, C., & Saddler, J. N.** (1999). *Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis*. *Biotechnology Progress*, 15(5), 804-816. <https://doi.org/10.1021/bp9900864>

- Marquina, D.** (1991). *Producción de biomasa de hongos para la degradación de residuos celulósicos*. Tesis Doctoral, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid. pp. 0-279.
- Martins, L. F.** (2005). *Caracterização do complexo celulolítico de *Penicillium echinulatum**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná.
- Meza, V., Moreno, P., Tengerdy, R. y Gutiérrez, M.** (1995). *Transfer of a benomyl resistance marker by heat-inactivated *Trichoderma reesei* protoplasts*. *Biotechnology Letters*, 17(8) pp. 827–832.
- Miller, L.** (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. *Analytical Chemistry*, 31 pp. 426-428.
- Miyamoto, K.** (1997). *Renewable biological systems for alternative sustainable energy production*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agricultural Services Bulletin 128. ISBN 92-5-104059-1. Electronic version, chapter 3.
- Nataraja, S.; Chetan, D. y Krishnappa, M.** (2010), *Effect of temperature on cellulose enzyme activity in crude extracts isolated from solid wastes microbes*. *International Journal of Microbiology Research*, 2 (2) pp. 44-47.

- Neefs, J.-M., Van De Peer, Y., Hendriks, L., & De Wachter, R. (1990).** *Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences.* Nucleic Acids Research, 18(Suppl), 2237-2317.
- Parry, N. J., Beever, D. E., Owen, E., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., & Bhat, M. K. (2001).** Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemical Journal*, 353(Pt 1), 117-127.
- Pélach, M. A.; Pastor, F.J.; Puig J., Vilaseca, F.; Mutjé, P. (2002)** *Enzymic deinking of old newspapers with cellulase.* Process Biochemistry, 38, 1063-1067.
- Pérez, S., & Samain, D. (2010).** *Structure and Engineering of Celluloses.* Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 64, 25-116.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(10\)64003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(10)64003-6)
- Plackett, R.L. & Burman, J.P. (1946).** *The design of optimum multifactorial experiments.* Biometrika 33, 305–325.
- Quiroz-Castañeda R. E. & Folch-Mallof J. L. (2013).** *Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars.* Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, Dr. Anuj Chandel (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/53719.

- Ramírez, P. & Cocha, J.** (2003). *Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica*. Revista Peruana de Biología, 10(1) pp. 67-77.
- Rodicio, M. & Mendoza, M.** (2004). *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 22 (4) pp. 81-87.
- Sachslehner, A., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., & Haltrich, D.** (1998). *Induction of Mannanase, Xylanase, and Endoglucanase Activities in Sclerotium rolfsii*. Applied and Environmental Microbiology, 64(2), 594-600.
- Sánchez, G. C. y Zuluaga, M. F.** (1999). *Propuesta y elaboración de un prototipo de material para compresión directa a base de celulosa fibra*. Trabajo de grado. Carrera de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, (Ed. 2).
- Semedo, L. T.; Gomes, R. C.; Linhares, A. A.; Duarte, G. F.; Nascimento, R. P.; Rosado, A. S.; Margis-Pinheiro, M.; Margis, R.; Silva, K. R.; Alviano, C. S.; Manfio, G. P.; Soares, R. M.; Linhares, L.F. & Coelho, R. R.** (2004). *Streptomyces drozdowiczii sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from*

soil in Brazil. Journal of systematic and Evolutionary Microbiology, 54 pp. 1323-1328.

Shahzadi, T., Anwar, Z., Iqbal, Z., Anjum, A., Aqil, T., Bakh, T., ... Irshad, M. (2014). *Induced Production of Exoglucanase, and β -Glucosidase from Fungal Co-Culture of *T. viride* and *G. lucidum**. Advances in Bioscience and Biotechnology, 05(05), 426. <https://doi.org/10.4236/abb.2014.55051>

Shankar, T., & Isaiarasu, L. (2011). *Cellulase production by *Bacillus pumilus* EWBCM1 under varying cultural conditions*. Middle-East Journal of Scientific Research, 8(1), 40–45.

Shirai, T.; Ishida, H.; Noda, J.; Yamane, T.; Ozaki, K.; Hakamada, Y.; Ito S. (2001). *Cristal Structure of Alkaline Cellulase K: Insight into the Alkaline Adaptaron of an Industrial Enzyme*. J. Mol. Biol. 310, 1079-1087.

Spano, L; Alien, A., Tarssinane, T., Mandels, M. and Ryu, D.D. (1978). *Reassessment of economics of Technology for production of etanol*. Proceedings in Industrial fuel from biomass symposium. Troy, New York. pp. 671-674

Sun, Y., & Cheng, J. (2002). *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Bioresource Technology, 83(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)

- Teather, R. & Wood, P.** (1982). *Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen.* Applied and Environmental Microbiology, 43(4) pp.777-780.
- Xi, J., Du, W., & Zhong, L.** (2013). *Probing the Interaction Between Cellulose and Cellulase with a Nanomechanical Sensor.* En T. G. M. Van De Ven (Ed.), Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications. InTech. <https://doi.org/10.5772/50285>
- Xin, F., Geng, A., Chen, M. L., & Gum, M. J. M.** (2010). *Enzymatic hydrolysis of sodium dodecyl sulphate (SDS)-pretreated newspaper for cellulosic ethanol production by Saccharomyces cerevisiae and Pichia stipitis.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 162(4), 1052-1064. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8861-z>
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C.** (2007). *Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis.* Fuel, 86(12), 1781-1788. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.12.013>
- Zeikus, G.; Benbassat, A.; Ng, T. & Lamed, R.** (1981). *Thermophilic ethanol fermentations.* Editor Hollander, A. et al. Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals. Plenum Publishing Corp. New York, USA. pp. 441-461.

Zhang, Y.; Himmel, M. & Mielenz, J. (2006). *Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies*. *Biotechnology Advances*, 24 pp. 452-481.

Zugenmaier, P. (2001). *Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers*. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1341-1417.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00019-3)

IX. ANEXOS

Anexo 1. Características macroscópicas de las colonias de las 18 bacterias reactivadas

Colonia	Características						
	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Tamaño
CB-13	Irregular	Entero	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	G
CB-16	Irregular	Lobulado	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	M
CB-20	Irregular	Lobulado	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	M
BT-13	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	M
BT-14	Irregular	Lobulado	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	P
BT-16	Irregular	Aserrado	Plana	Brillante	Creмоса	Blanco	M
BT-19	Irregular	Lobulado	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	M
BT-20	Irregular	Entero	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	M
TM-8	Irregular	Entero	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	M
TM-12	Irregular	Entero	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	M
FT-3	Circular	Entero	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	M
FT-4	Irregular	Aserrado	Convexa	Brillante	Creмоса	Amarillo	G
FT-8	Irregular	Entero	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	M
FT-10	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Viscosa	Amarillo	M
FT-13	Irregular	Entero	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	M
FT-14	Circular	Entero	Convexa	Brillante	Creмоса	Amarillo	M
Cel-7	Irregular	Entero	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	M
Cel-10	Circular	Entero	Convexa	Brillante	Creмоса	Blanco	M
*P: pequeña (<1 mm); M: mediano (1 a 4 mm); G: grande (>4 mm)							

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 2. Tinción Gram de las 18 bacterias reactivadas

Bacteria	Tinción Gram	Características
CB-13	Positivos	Bacilos medianos y largos de regular diámetro, en cadenas de 2 y no presentan esporas.
CB-16	Positivos	Bacilos cortos y medianos, algunos con espora terminal no deformante, en cadenas de 2.
CB-20	Positivos	Bacilos cortos y medianos, algunos con espora terminal deformante y no filamentosos.
BT-13	Positivos	Bacilos cortos y medianos sin espora y de regular diámetro, en cadenas de 2.
BT-14	Positivos	Bacilos medianos y largos, de estrecho diámetro y algunos con espora subterminal deformante, en cadenas de 2.
BT-16	Positivos	Bacilos medianos y largos y de regular diámetro, presenten cadenas de 2.
BT-19	Positivos	Bacilos semicurvos de tamaño mediano a grande y de regular diámetro, presentan cadenas de 2.
BT-20	Positivos	Bacilos semicurvos de tamaño cortos a mediano y de regular diámetro; en cadenas de 2 con espora terminal no deformante.

Fuente: Elaboración propia.

Continúa...

Bacteria	Tinción Gram	Características
FT-3	Positivos	Bacilos pequeños y medianos, algunos con espora terminal, delgados, presencia de bacilos delgados largos.
FT-4	Positivos	Bacilos medianos, largos y delgados, algunos con espora terminal, agrupados en forma filamentosa.
FT-8	Positivos	Bacilos pequeños y delgados, algunos con espora terminal.
FT-10	Positivos	Bacilos medianos, delgados en cadenas de 2, algunos filamentosos, no presentan espora terminal.
FT-13	Positivos	Bacilos medianos, delgados, forma filamentosa, con esporas terminales, algunas en cadenas de dos.
FT-14	Positivos	Bacilos pequeños y grandes, delgados, con forma filamentosa, espora terminal, en cadenas de 2.
TM-8	Positivos	Bacilos medianos, largos, delgados, no filamentosos, no presentan espora terminal.
TM-12	Positivos	Bacilos medianos y largos filamentosos, delgados, no dispuestos en cadenas.
Cel-7	Positivos	Bacilos medianos y delgados, algunos con espora terminal.
Cel-10	Positivos	Bacilos semicurvos, delgados, forma filamentosa, algunas en cadenas de 2.

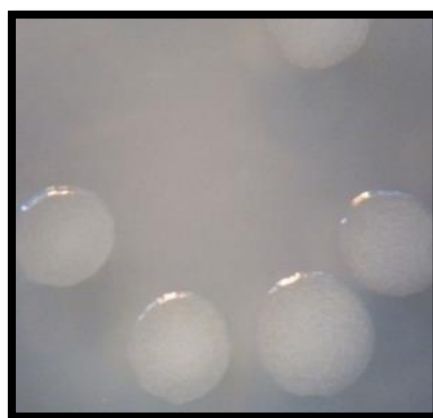
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 3. Fotografías del estriado por agotamiento de los 18 cultivos bacterianos reactivados

Vista panorámica del estriado por agotamiento



Vista superior de colonias a 40x



CB-13

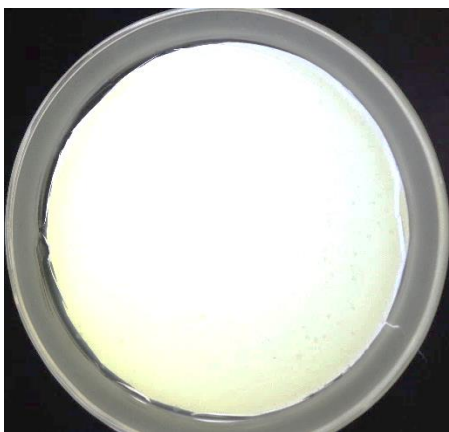


CB-16

Fuente: Elaboración propia

Continúa...

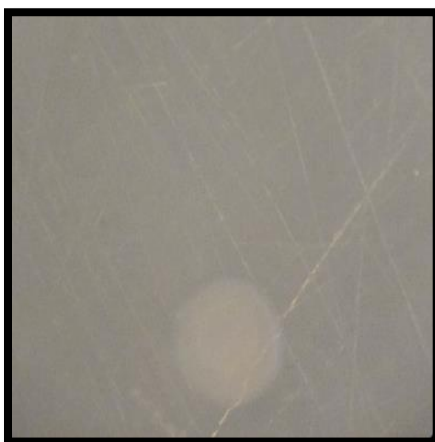
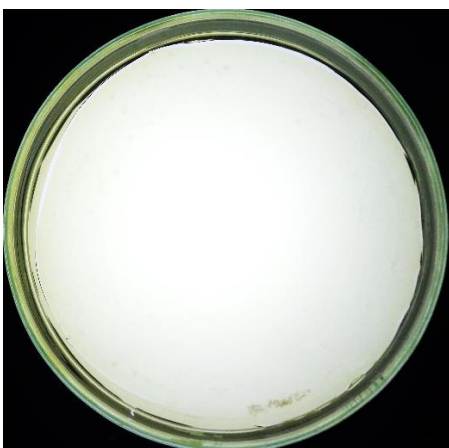
Vista panorámica del estriado por agotamiento



Vista superior de colonias a 40x



CB-20

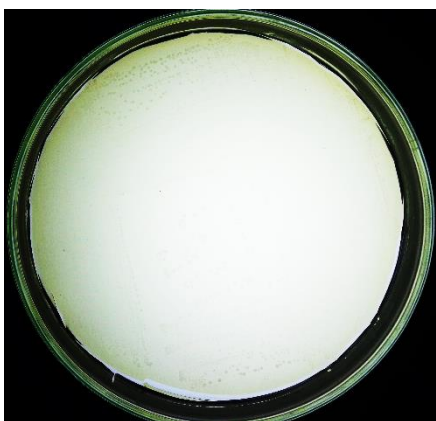


BT-13

Fuente: Elaboración propia

Continúa...

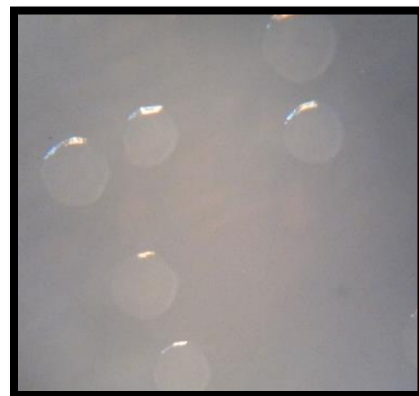
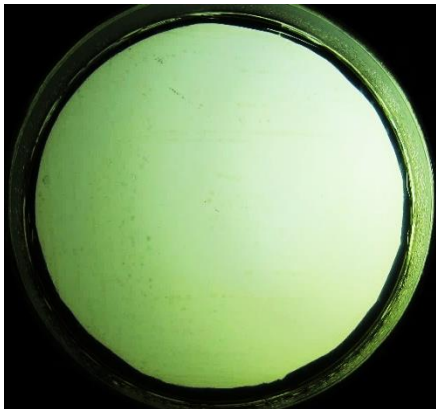
Vista panorámica del estriado por agotamiento



Vista superior de colonias a 40x



BT-14

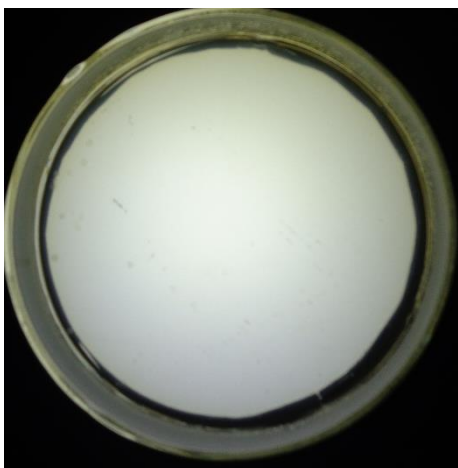


BT-16

Fuente: Elaboración propia

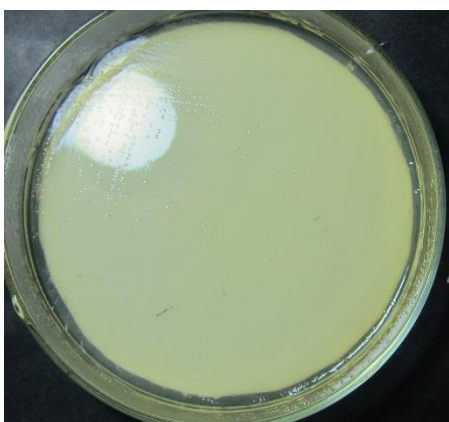
Continúa...

Vista panorámica del estriado por agotamiento



BT-19

Vista superior de colonias a 40x



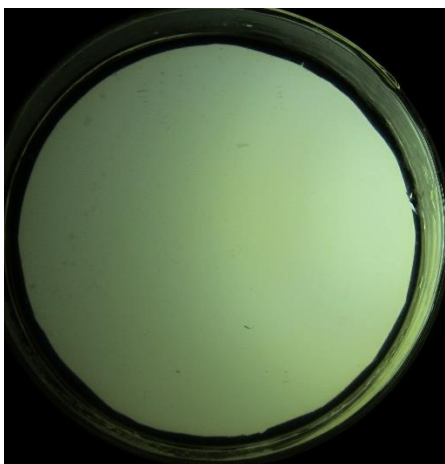
BT-20



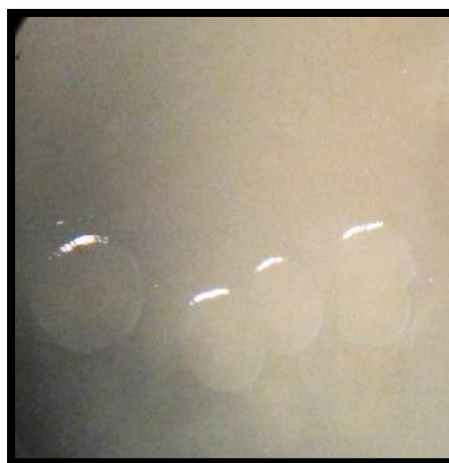
Fuente: Elaboración propia

Continúa...

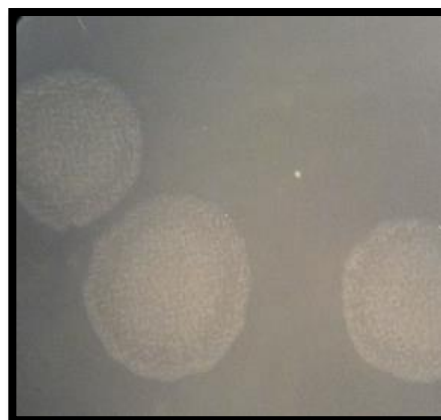
Vista panorámica del estriado por agotamiento



Vista superior de colonias a 40x



FT-3

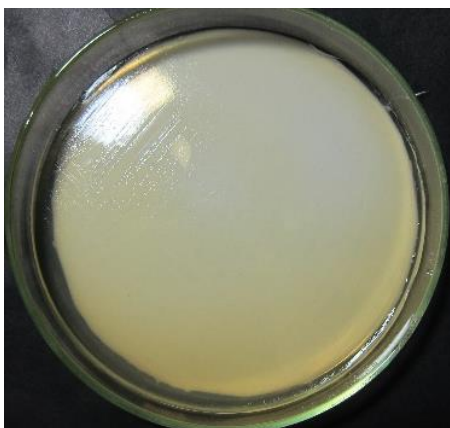


FT-4

Fuente: Elaboración propia

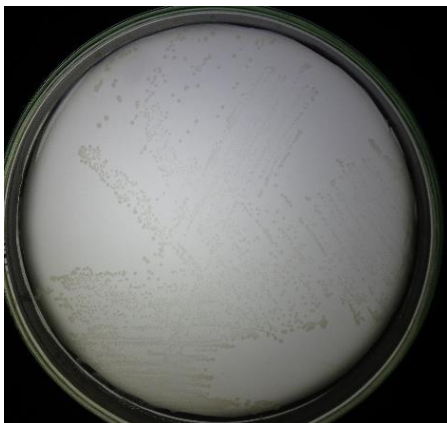
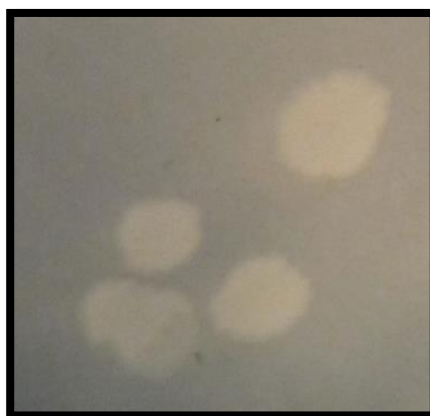
Continúa...

Vista panorámica del estriado por agotamiento

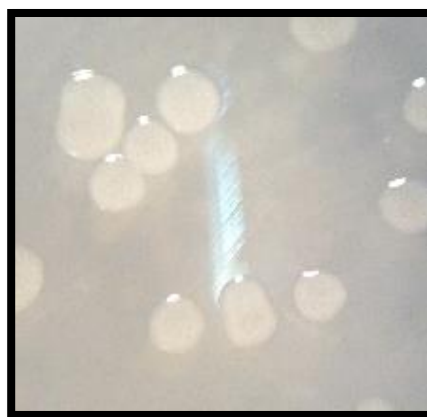


FT-8

Vista superior de colonias a 40x



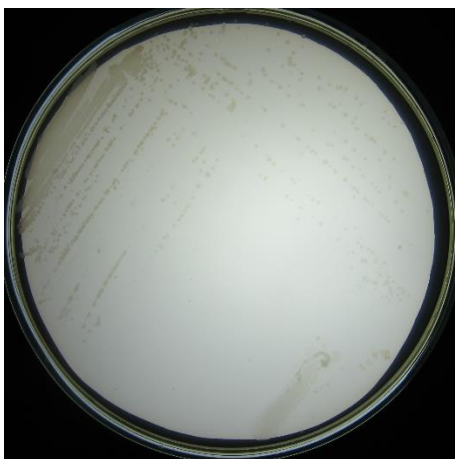
FT-10



Fuente: Elaboración propia

Continúa...

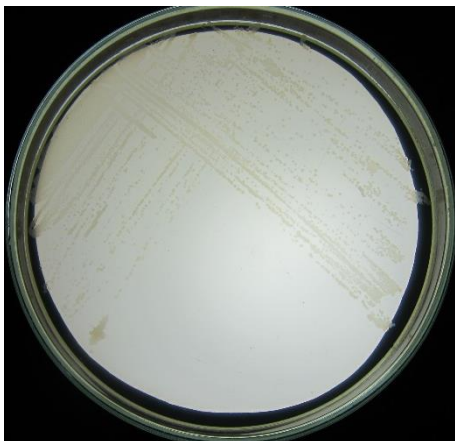
Vista panorámica del estriado por agotamiento



Vista superior de colonias a 40x



FT-13

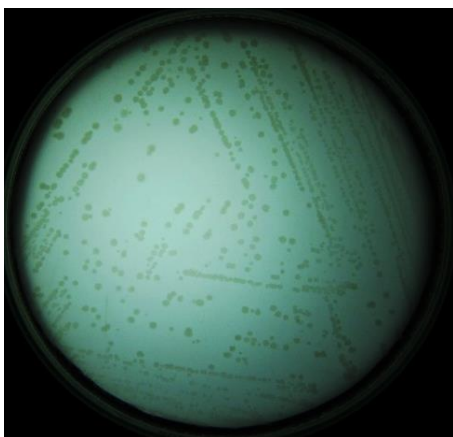


FT-14

Fuente: Elaboración propia

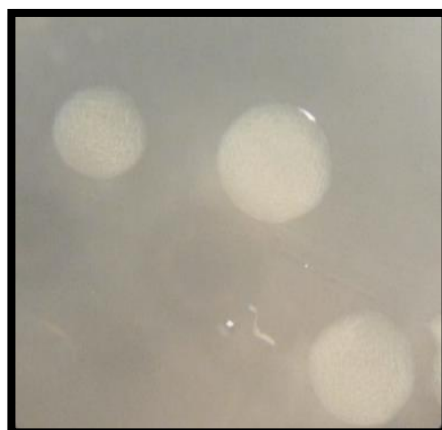
Continúa...

Vista panorámica del estriado por agotamiento

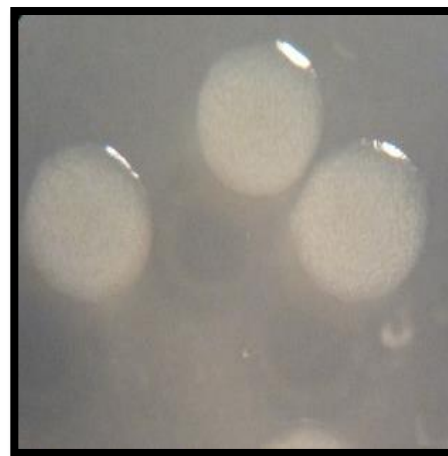


TM-8

Vista superior de colonias a 40x



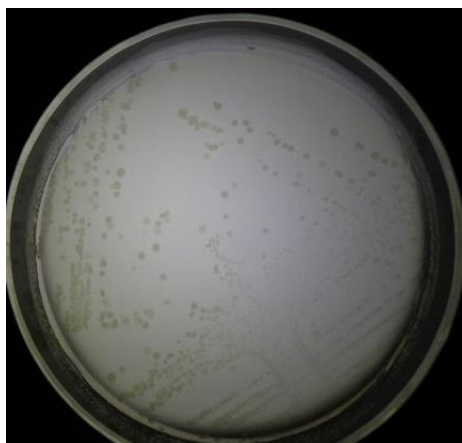
TM-12



Fuente: Elaboración propia

Continúa...

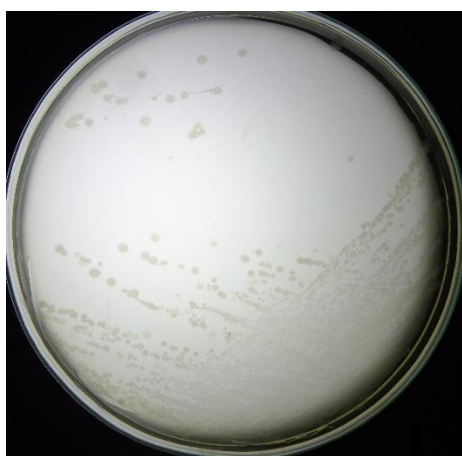
Vista panorámica del estriado por agotamiento



Vista superior de colonias a 40x



Cel-7

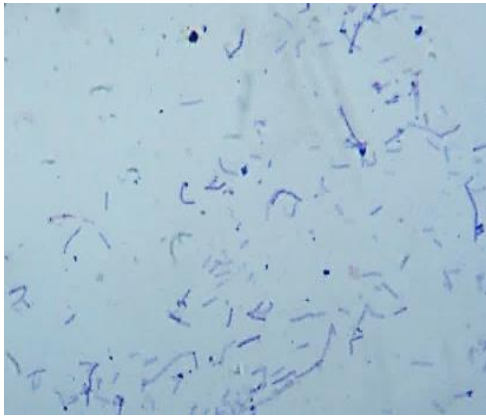


Cel-10

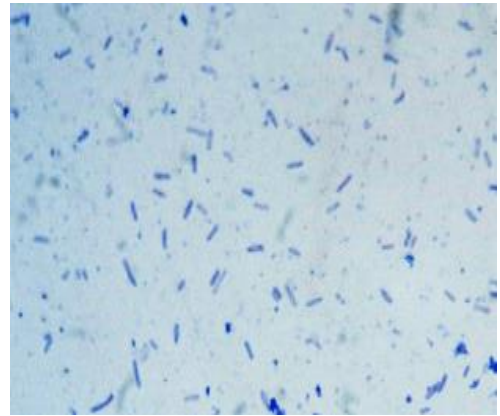


Fuente: Elaboración propia

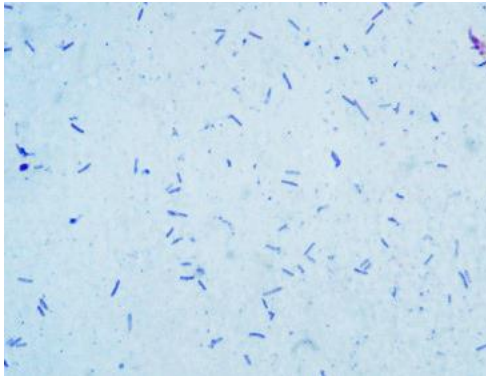
Anexo 4. Fotografías del campo microscópico de 1000x de los 18 cultivos bacterianos sometidos a tinción Gram



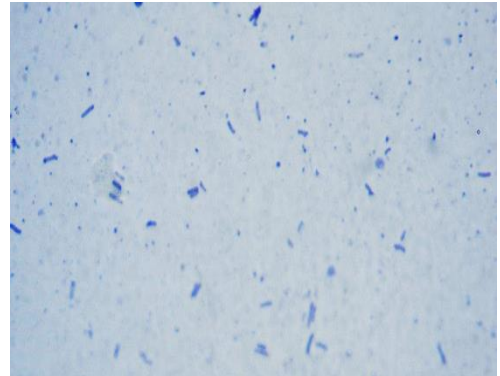
Bacteria CB-13



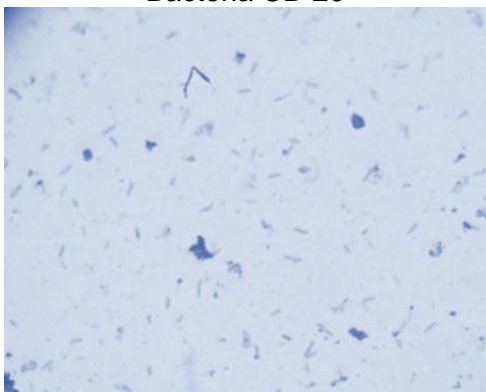
Bacteria CB-16



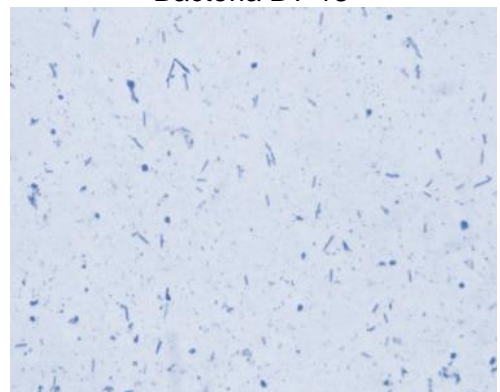
Bacteria CB-20



Bacteria BT-13



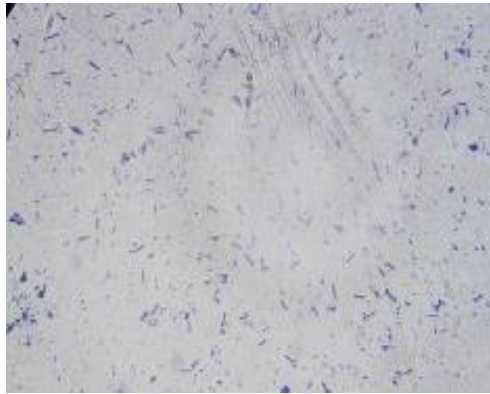
Bacteria BT-14



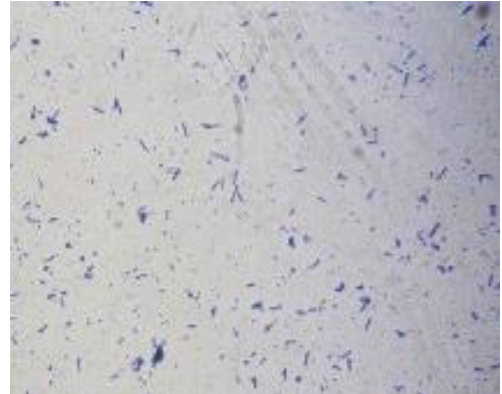
Bacteria BT-16

Fuente: Elaboración propia

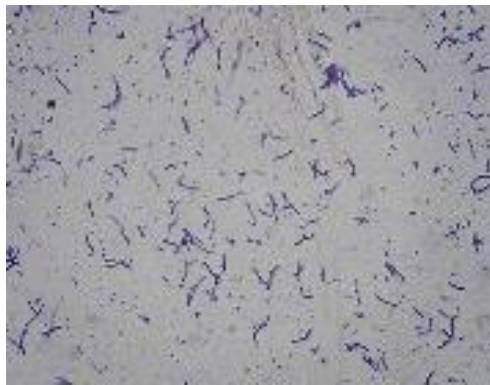
Continúa...



Bacteria FT-13



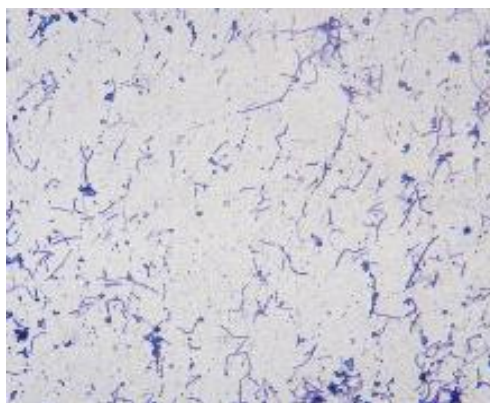
Bacteria FT-14



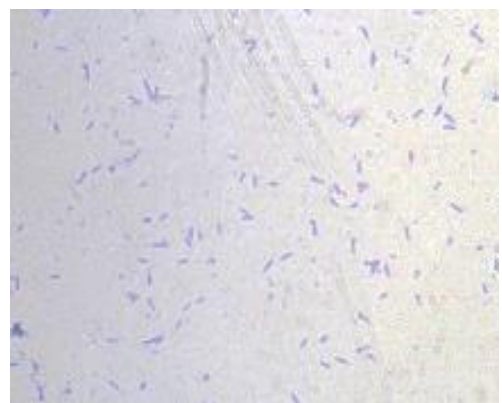
Bacteria TM-8



Bacteria TM-12



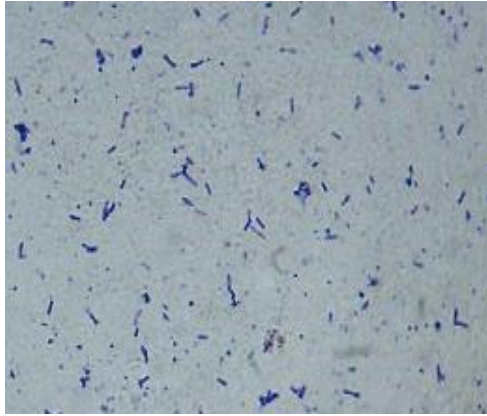
Bacteria Cel-7



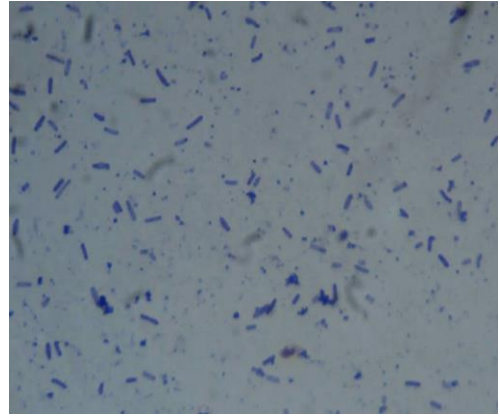
Bacteria Cel-10

Fuente: Elaboración propia

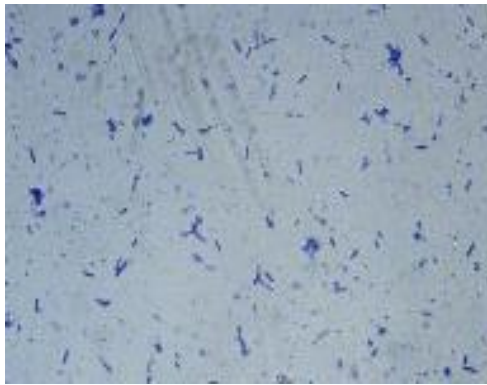
Continúa...



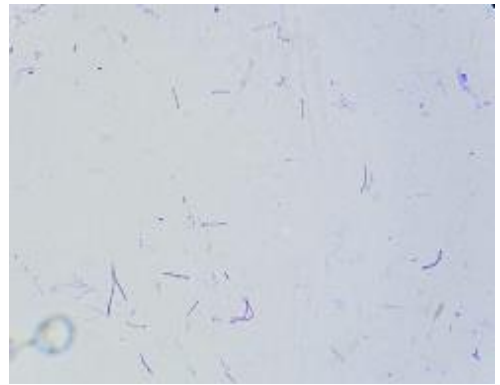
Bacteria BT-19



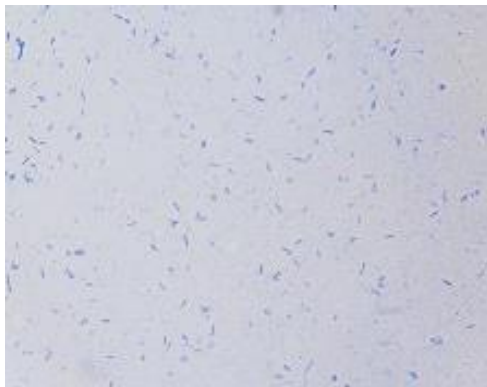
Bacteria BT-20



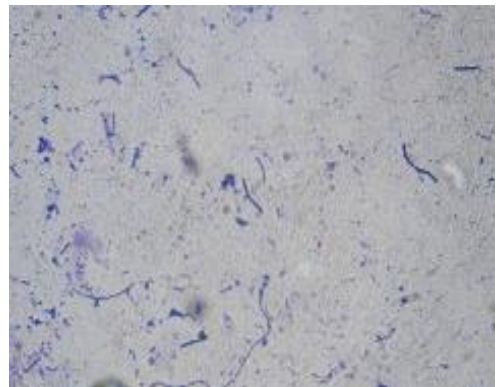
Bacteria FT-3



Bacteria FT-4



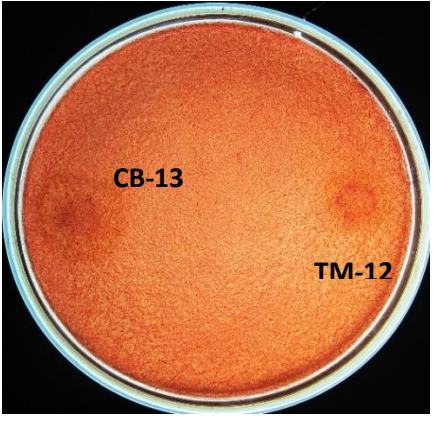
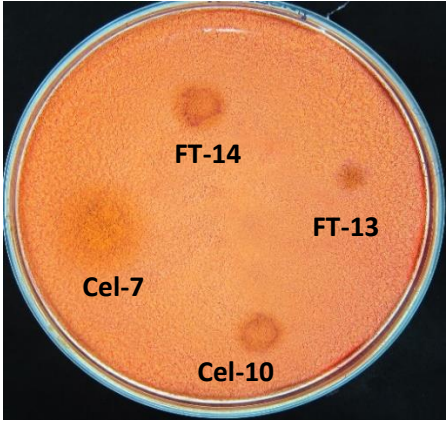
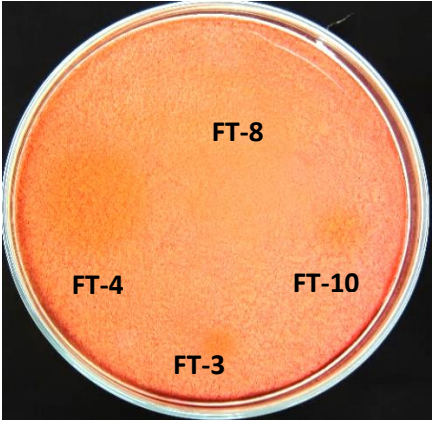
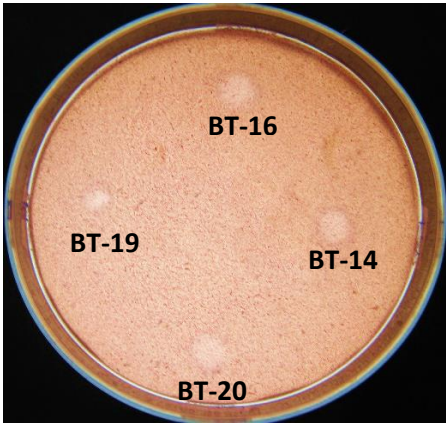
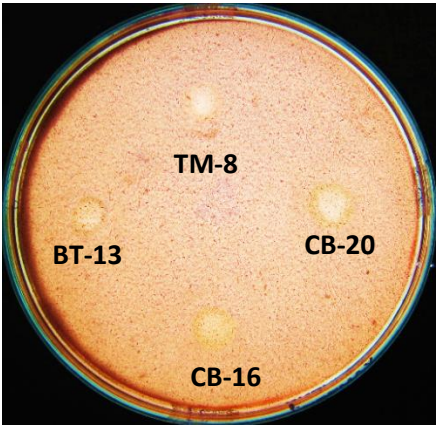
Bacteria FT-8



Bacteria FT-10

Fuente: Elaboración propia

Anexo 5. Visualización de zonas de hidrolisis originado por celulasas. Revelado con Rojo Congo 0.1% (p/v) pH 6.0

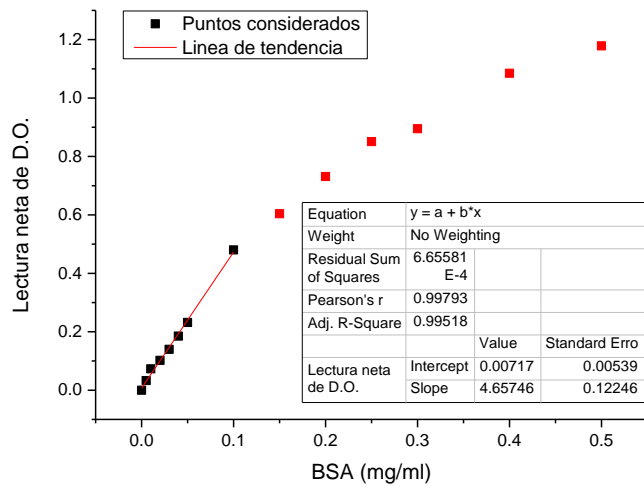


Fuente: Elaboración propia

Anexo 6. Curva de calibración del reactivo Bradford.

Se utilizó un gradiente de concentraciones de albumina sérica bovina entre 0.02 a 0.5 mg/mL; se registró la D.O. correspondientes a cada tubo reacción contra blanco de muestra. Se obtuvieron promedios de lectura de la densidad óptica como se muestra a continuación:

N° tubo reacción	BS A mg/mL	\bar{Y}_{DO}
1	0,02	0.102
2	0,03	0.140
3	0,04	0.185
4	0,05	0.232
5	0,10	0.480
6	0,15	0.604
7	0,20	0.732
8	0,25	0.851
9	0.4	1.085
10	0.5	1.179



Fuente: Elaboración propia.

De la curva patrón elaborada de BSA, se obtiene el modelo de regresión lineal que es la Ecuación 1; del cual, se despeja la Ecuación 2 que fue utilizada para estimar el contenido proteico de las muestras.

Ecuación 1:

$$y = 0,00717 + 4,65746x$$

Siendo:

y = Absorbancia

x = Concentración proteínas (mg/mL)

Ecuación 2:

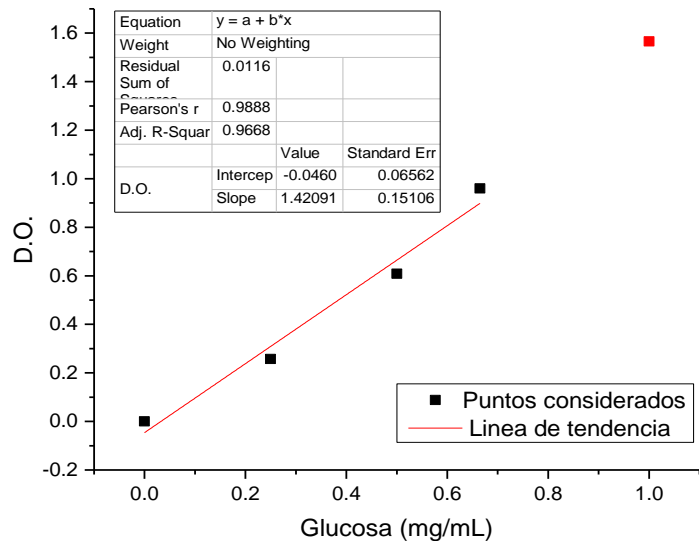
$$\text{Concentración} = 0,2147 (\text{Absorbancia})$$

Anexo 7. Curva de calibración del DNS

Se utilizó un gradiente de concentraciones de glucosa entre 0.02 a 0.5 mg/mL según Ghose (1987), se registró la D.O. correspondientes a cada tubo reacción contra blanco de muestra. Se obtuvieron promedios de lectura de la densidad óptica como se detalla a continuación:

N° tubo reacción	BS A mg/mL	\bar{Y}_{DO}
1	0,25	0,2575
2	0,5	0,609
3	0,665	0,96
4	1	1,566

Fuente: Elaboración propia



De la curva patrón de Glucosa, se obtiene la Ecuación 3; de la cual, se despejó la Ecuación 4 que fue utilizada para estimar las concentraciones de azúcares reductores de las muestras.

Ecuación 3:

$$y = -0,0460 + 0,7105x$$

Siendo:

y = Absorbancia

x = Concentración azucares reductores (mg/mL)

Ecuación 4:

$$\text{Concentración} = 0,81626 (\text{Absorbancia})$$

Anexo 8. Análisis de varianza de diámetro de zona de hidrólisis por actividad de celulasas

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	741,785	17	43,6344	110,23	0,0000
Intra grupos	7,125	18	0,395833		
Total (Corr.)	74,.91	35			

Fuente: Elaboración propia

Anexo 9. Análisis de varianza de medias generales de actividad en FPU de las bacterias FT-4, CB-13, TM-12 y Cel-7

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0200737	3	0,00669122	10,77	0,0035
Intra grupos	0,00496933	8	0,000621167		
Total (Corr.)	0,025043	11			

Fuente: Elaboración propia

Anexo 10. Glosario de términos

- **Ácido desoxirribonucleico (ADN):** Un ácido nucleico de doble cadena, compuesto de adenina, guanina, citosina, timina, desoxirribosa y fosfato.
- **Ácido ribonucleico (ARN):** Un ácido nucleico de una sola cadena, compuesto de adenina, guanina, citosina, uracilo, ribosa y fosfato.
- **Ácido ribonucleico mensajero (ARNm):** Un ácido ribonucleico que se transcribe a partir de la matriz de ADN.
- **Ácido ribonucleico ribosomal (ARNr):** Un ácido ribonucleico que participa en la formación de los ribosomas.
- **Biomasa:** Cantidad de materia producida o existente en un ser vivo y que se encuentra en forma de proteínas, carbohidratos, lípidos y otros compuestos orgánicos. Normalmente, se mide en peso seco (una vez que se ha sometido a desecación a temperaturas moderadas). La biomasa se puede utilizar como materia prima renovable y como energía material.
- **Celobiosa:** Un disacárido formado por dos glucosas unidas por los grupos hidroxilo del carbono 1 en posición beta de una glucosa y del carbono 4 de la otra glucosa. Por ello, este compuesto también se llama beta - D -

glucopiranosil (1 - 4) beta - D - glucopiranososa. La celobiosa aparece en la hidrólisis de la celulosa.

- **Celodextrina:** Polímeros de glucosa de diverso tamaño (dos o más monómeros de glucosa), producto de la hidrólisis incompleta de la celulosa insoluble

- **Cromatografía de intercambio iónico:** Es un método que permite la separación de moléculas basado en las propiedades de carga eléctrica.

- **E – value:** Representa el número de hits con el mismo o similar score que se puede esperar de encontrar al azar.

- **Enzima termoestable:** Catalizador biológico, capaz de describir actividad frente a altas temperaturas sin perjuicio de desnaturalizarse ni afectarse su conformación proteica.

- **Hit:** Secuencia de nucleótidos de ADN, ARN o proteínas, previamente caracterizada, presente en una determinada base de datos de un programa informático.

- **Match:** Homología de la secuencia problema de nucleótidos (query) con la secuencia previamente caracterizada en la base de datos (hit), siendo los nucleótidos que coinciden en el alineamiento.
- **Query:** Secuencia problema de nucleótidos de ADN, ARN o proteínas, la cual va a ser alineada con otras secuencias en una base de datos determinada, como por ejemplo, BLAST.
- **Sustrato:** Especie química que se considera, de forma explícita, objeto de la acción de otros reactivos. Por ejemplo, un compuesto cuya transformación está afectada por un catalizador.

Anexo 11. Pulpa de papel periódico tratado para utilización en ensayos de fermentación



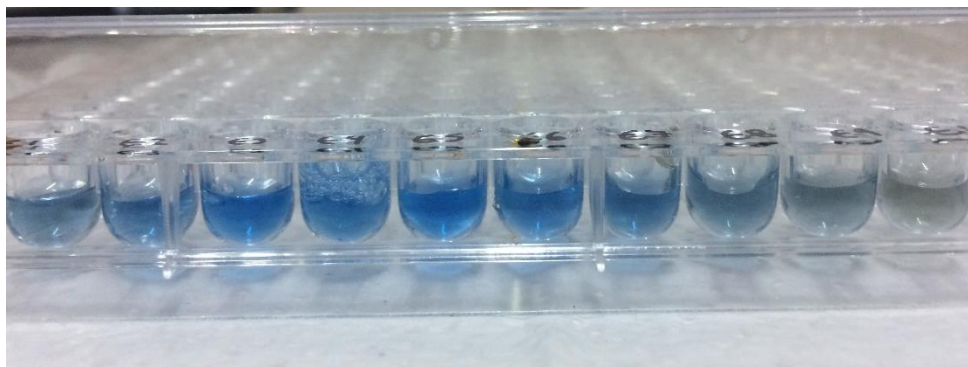
Fuente: Elaboración propia

Anexo 12. Ensayos de fermentación sumergida según el experimento de Plackett-Burman



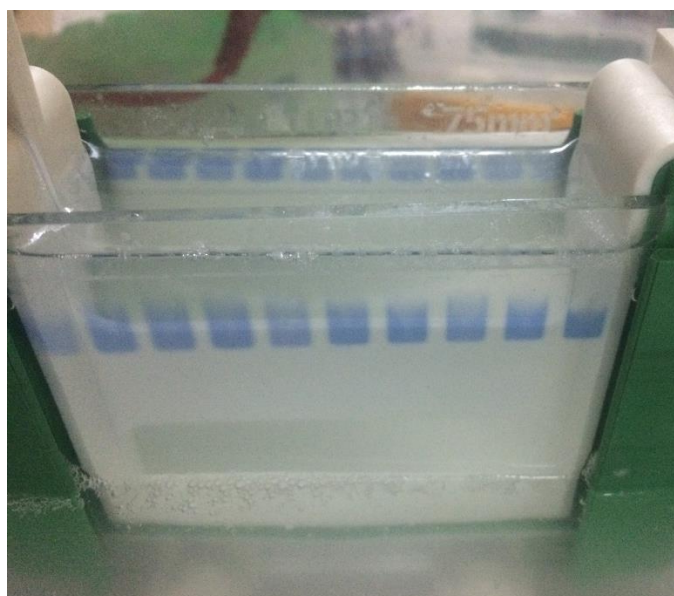
Fuente: Elaboración propia

Anexo 13. Cuantificación de proteínas solubles de las fracciones colectadas durante la cromatografía de intercambio aniónico por método de Bradford



Fuente: Elaboración propia

Anexo 14. Corrida electroforética de las fracciones colectadas durante la separación y purificación de la β -glucosidasa



Fuente: Elaboración propia

.....
Bach. Héber Esaú Ramírez Arua
TESISTA

.....
Mgr. Roberto Castellanos Cabrera
ASESOR