

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología

**PURIFICACION Y CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA CELULASA  
PRODUCIDA POR *Bacillus* sp. AISLADA DE LOS GÉISERES DE  
CANDARAVE-TACNA, 2013**

TESIS

Presentada por

Bach. ISRAEL JOSÉ SALAZAR QUISPE

Para optar el título profesional de  
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA- PERÚ

2014

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

TESIS N° 242

TÍTULO PROFESIONAL DE:  
BIOLÓGO MICROBIÓLOGO

El secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias certifica que con Resolución de Facultad N° 7993-2014-FACI-UN/JBG ha designado como jurados para la sustentación de la Tesis: **“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA CELULASA PRODUCIDA POR *Bacillus* sp. AISLADA DE LOS GÉISERES DE CANDARAVE-TACNA, 2013”** el mismo que está conformado por:

PRESIDENTE : Dr. SEGUNDO MANUEL ALVARADO CONTRERAS

SECRETARIO : Dra. ROSA AMELIA CAFFO MARRUFFO

VOCAL : Mgr. DALADIER CASTILLO COTRINA

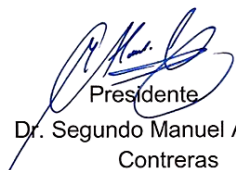
Para examinar y calificar el trabajo de Tesis sustentado en acto público el día 19 de Diciembre del 2014.

Presentado por el señor Bachiller: **ISRAEL JOSÉ SALAZAR QUISPE**, de la Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología.

El jurado calificador, en forma secreta e individual se pronunció sobre el calificativo del trabajo expuesto y procedió a emitir el siguiente resultado:

Aprobado por unanimidad con tres votos a favor y promedio sobresaliente de Diecisiete (17)

Para ratificar lo detallado firman:

  
Presidente  
Dr. Segundo Manuel Alvarado  
Contreras

  
Secretario(a)  
Dra. Rosa Amelia Caffo  
Marruffo

  
Vocal

Mgr. Daladier Castillo Cotrina

## **DEDICATORIA**

A mis padres Braulia y Juan que siempre me brindaron su amor y su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos, a mi hermana Erika, a mi tíos, tía Vicky, Janeth y a mi tía Hilda por sus consejos y cuidados y a mi hermano Josué que siempre me cuida desde el cielo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por ser mi guía, a mis asesores Dr. Roberto Castellanos y Dr. Mario Esparza, al Dr. Daladier Castillo y a todos aquellos profesores que me brindaron su apoyo, paciencia y su motivación constante hacia mi persona y mis compañeros, de igual manera a cada uno de los integrantes del grupo de investigación en biotecnología de extremófilos.

## CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
CONTENIDO GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Planteamiento del estudio.....	4
1.2 Hipótesis.....	4
1.3 Justificación.....	4
1.4 Objetivos	
1.4.1. Objetivo General.....	6
1.4.2. Objetivos Específicos.....	6
II. MARCO TEÓRICO	
2.1 Celulosa.....	7
2.2 Características de la enzima celulasa.....	13
2.3 Tipos de celulasas.....	22
2.4 Microorganismos productores de celulasas.....	24

2.5 Factores ambientales que determinan la degradación microbiológica de la celulosa.....	27
2.6 Ventajas de las celulasas bacterianas en comparación a las de origen fúngico.....	29
2.7 Materiales lignocelulósicos como fuentes renovables de carbono.....	31
2.8 Aplicación de enzimas celulasas.	
2.8.1 Celulasas en la industria energética: Biocombustibles.....	36
2.9 Determinación de la actividad celulolítica	
2.9.1 Prueba cualitativa con Lugol.....	43
2.9.2 Prueba cuantitativa del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico.....	45
2.9.3 Determinación de proteínas totales.....	45
2.10 Caracterización cinética de enzimas.....	45

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

3.1.1 Cepa bacteriana.....	56
3.1.2 Reactivos.....	56
3.1.3 Equipos.....	56

## 3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Estrategia de trabajo.....	58
3.2.2 Diseño de la investigación.....	59
3.2.3 Universo y localización del proyecto.....	59
3.2.4 Población y muestra	
3.2.4.1 Población.....	59
3.2.4.2 Muestreo.....	59
3.2.5 Procesamiento y análisis de datos.....	60

## 3.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.3.1 Activación y adaptación del microorganismo en medio CMC.....	61
3.3.1.1 Curva de crecimiento.....	62
3.3.1.2 Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.....	63
3.3.1.3 Determinación de glucosa por el método DNS.....	64
3.3.1.4 Actividad cualitativa de celulasas.....	66
3.3.2 Cultivo y masificación a 45°C de la bacteria termófila.....	67
3.3.3 Evaluación de la degradación de celulosa a diferentes sustratos.....	68

3.3.4 Purificación parcial de la enzima celulasa secretada por la bacteria termófila.....	69
3.3.5 Determinación de actividad celulasa.....	73
3.3.6 Determinación de parámetros cinéticos enzimáticos.....	76
a. Efecto del tiempo de reacción en la aparición de producto.	76
b. Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción.....	77
b.1 Representación de la velocidad de la reacción frente a la cantidad de enzima añadida.....	78
c. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción.....	78
c.1 Representación de la velocidad frente al cociente $v/[S]$ . (Representación de Eadie-Hofstee).....	80
c.2 Representación de $1/V$ frente a $1/[S]$ (Representación de Lineweaver-Burk).....	80
3.3.7 Caracterización enzimática de la enzima celulasa producida por <i>Bacillus</i> sp. a diferentes valores de pH y temperatura.....	81

## IV. RESULTADOS

4.1 Activación y adaptación del microorganismo en medio CMC.....	82
4.1.1 Curva de crecimiento.....	83
4.1.2 Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.....	85
4.1.3 Determinación de azúcares reductores por el método DNS..	87
4.1.4. Actividad cualitativa de celulasas.....	89
4.2 Cultivo y masificación a 45°C de la bacteria termófila.....	90
4.3 Evaluación de degradación de celulosa a diferentes sustratos.....	91
4.3.1 Análisis de los resultados a partir de la evaluación de sustratos.....	93
4.4 Purificación parcial y determinación de actividades de la enzima celulasa secretada por <i>Bacillus</i> sp. ....	102
4.5 Determinación de parámetros cinéticos enzimáticos.....	106
4.6 Caracterización enzimática de la enzima celulasa producida por <i>Bacillus</i> sp. a diferentes valores de pH y temperatura.....	119
4.6.1 Análisis de la caracterización cinética de la enzima celulasa a diferentes pHs y temperaturas.....	120

V. DISCUSIÓN.....	129
VI. CONCLUSIONES.....	142
VII. RECOMENDACIONES.....	146
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148
IX. ANEXOS.....	163

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de los volúmenes aplicados para evaluar el efecto del tiempo de reacción en la aparición de producto.....	76
Tabla 2: Resumen de los volúmenes aplicados para evaluar el efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción.....	77
Tabla 3: Resumen de los volúmenes aplicados para evaluar el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción.....	79
Tabla 4: Producción de proteínas Totales .....	85
Tabla 5: Producción de azúcares reductores a 45 °C.....	87
Tabla 6: Tabla de evaluación a diferentes sustratoscelulolíticos .....	92
Tabla 7: Análisis de producción de azúcares reductores.....	94
Tabla 8: Prueba de normalidad de evaluación de sustratos celulolíticos.....	95
Tabla 9: Prueba de homocedasticidad de sustratos celulolíticos.....	95
Tabla 10: Análisis de varianza de diferentes sustratos celulósicos con tres repeticiones.....	97
Tabla 11: Prueba de Tukey con programa SPSS.....	98

Tabla 12: Prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) para los diferentes sustratos según su orden de mérito de las medias.....	100
Tabla 13: Lectura de actividades específicas extracto crudo.....	102
Tabla 14: Lectura de actividades específicas del concentrado con sulfafo de amonio.....	104
Tabla 15: Lectura de actividades específicas del dializado.....	104
Tabla 16: Lectura de actividades específicas del sobrenadante restante....	105
Tabla 17: Tabla resumen de la purificación parcial de la enzima.....	105
Tabla 18: Efecto del tiempo de reacción en la aparición de producto.....	107
Tabla 19: Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción.....	109
Tabla 20: Representación de la velocidad de la reacción frente a la cantidad de enzima añadida.....	111
Tabla 21: Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción.....	112
Tabla 22: Representación de la velocidad frente al cociente $v/[S]$ .....	114
Tabla 23: Representación de Lineweaver-Burk.....	116
Tabla 24: Actividad enzimática a diferentes pHs y temperaturas.....	119

Tabla 25: Interacciones entre las temperaturas y pHs.....	120
Tabla 26: Prueba de normalidad para temperaturas mediante Kolmogorov-Smirnova.....	121
Tabla 27: Prueba de homogeneidad de varianzas para temperaturas.....	121
Tabla 28: Prueba de normalidad para pHs: Kolmogorov-Smirnova.....	123
Tabla 29: Prueba de homogeneidad de varianzas para pHs.....	124
Tabla 30: Análisis de varianza de interacciones pHs y temperaturas.....	128

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Diferentes tipos de organización de las fibras de celulosa generan dos conformaciones diferentes ordenadas, que comprenden la región cristalina, y desordenadas, que forman la región amorfa.....11
- Figura 2: Modelo de la interacción de los componentes de la pared celular. Las barras paralelas representan fibras de celulosa entrelazadas por las cadenas de hemicelulosa y proteínas estructurales.....13
- Figura 3: Modelo tridimensional de una celobiohidrolasa actuando sobre una cadena de celulosa. Se muestra el módulo catalítico en forma de túnel (liberando una molécula de celobiosa), la bisagra flexible y el CBM unido a la celulosa.....19
- Figura 4: Estructura de la lignocelulosa, La celulosa, la hemicelulosa y la lignina forman estructuras llamadas microfibrillas, organizadas en macrofibras que regulan la estabilidad de la pared celular de las plantas .....33

Figura 5: Pasos del proceso de producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos.....	37
Figura 6: Efecto del sustrato sobre la velocidad de una reacción.....	48
Figura 7: Curvas de sustrato. (A) Una enzima con dos sustratos. (B) Dos enzimas con el mismo sustrato.....	50
Figura 8: Efecto de la concentración de enzima en una reacción.....	51
Figura 9: Representación de Eadie-Hofstee: Velocidad frente al cociente $V/[S]$ .....	53
Figura 10: Representación de Lineweaver-Burk: Inversos de las velocidades enzimáticas frente a los inversos de las concentraciones de sustrato.....	55
Figura 11: Fotografía que muestra una imagen al microscopio de <i>Bacillus</i> sp. coloreada mediante tinción Gram, observada por el aumento del objetivo de inmersión de 100 x.....	83
Figura 12: Cinética de crecimiento celular en medio CMC a 45 °C y pH 7.....	84
Figura 13; Producción de proteínas totales vs días de incubación.....	86
Figura 14: Gráfica Producción de azúcares reductores vs días de incubación...	88
Figura 15: Fotografía que muestra las placas de Agar CMC en donde se puede apreciar los halos de hidrólisis.....	90

Figura 16: Diagrama de barras de producción de azúcares reductores a diferentes sustratos.....	93
Figura 17: Diagrama de barras de error de los diferentes sustratos.....	101
Figura 18: Efecto del tiempo de reacción.....	107
Figura 19: Representación del progreso de reacción: aparición de producto frente al tiempo de reacción.....	108
Figura 20: Representación absorbancias vs concentraciones de enzima.....	110
Figura 21: Representación del producto vs concentraciones de enzima.....	110
Figura 22: Representación de la velocidad frente a la concentración de enzima.....	111
Figura 23: Representación de azúcares reductores vs la concentración de sustrato.....	113
Figura 24: Representación de Eadie-Hofstee: Velocidad frente al cociente $V/[S]$ .....	115
Figura 25: Inversos de las velocidades enzimáticas frente a los inversos de las concentraciones de sustrato.....	116
Figura 26: Representación de Eadie- Hofstee.....	117
Figura 27: Representación de Lineweaver-Burk.....	118

Figura 28: Diagrama de caja y bigotes de actividad enzimática a diferentes temperaturas.....	122
Figura 29: Diagrama de caja y bigotes de actividad enzimática a diferentes pH.....	125

## RESUMEN

Se purificó parcialmente y se caracterizó la enzima celulasa producida por *Bacillus* aislada de los géiseres de Candarave, la fase logarítmica se dio a partir de las 24 horas. La producción enzimática se determinó a partir del método de DNS. El extracto enzimático se empleó en sustratos celulósicos como tallos, hojas de geranio (*Pelargonium hortorum*), papel y CMC para evaluar su potencial de degradación, obteniéndose valores de azúcares reductores de 3,499 mg/ml; 0,116 mg/ml; 0,083 mg/ml y 0,593 mg/ml respectivamente. Posteriormente, se concentró por evaporación y purificó parcialmente mediante el método de precipitación de sulfato de amonio a una concentración final del 90 %. Mediante un proceso posterior de diálisis se obtuvo una actividad de 5,9 U/ml y una concentración de proteínas de 1,3 mg/ml. Los parámetros de cinética enzimática, empleando el modelo Michaelis-Menten, para  $K_m$ , velocidad inicial y máxima fueron 2,3 mg de CMC/ml; 0,0054 mg/ml.min y 0,012 mg/ml.min respectivamente. Finalmente se evaluaron las actividades enzimáticas a diferentes rangos de pH y temperaturas, siendo las mejores actividades 3,4 U/ml a 45°C a pH 7,0; 2,5 U/ml a 25°C a pH 5,0; y 2,45 U/ml a 80 °C a pH de 10.

## ABSTRACT

It was partially purified enzyme and characterized the cellulase produced by *Bacillus* sp. Isolated from Candarave geysers, the logarithmic phase occurred after 24 hours. Enzyme production was determined from the DNS method. The enzyme extract was used in cellulosic substrates such as stems, leaves of geranium (*Pelargoniumx hortorum*), paper and CMC to assess their potential for degradation, yielding values of reducing sugars of 3,499 mg / ml; 0,116 mg / ml; 0,083 mg / ml and 0,593 mg / ml respectively. Subsequently, it was concentrated and partially purified by the method of ammonium sulfate precipitation to a final concentration of 90%. By subsequent dialysis process an activity of 5,9 U / ml and a protein concentration of 1,3 mg / ml was obtained. Enzyme kinetic parameters, they using Michaelis-Menten model, for  $K_m$ , initial and maximum speed of CMC were 2,3 mg / ml; 0,0054mg / ml.min and 0,012 mg / ml.min respectively. Finally the enzyme activities at different temperatures and pH ranges were tested, with the best activity 3,4 U / ml at 45 ° C at pH 7,0; 2,5 U / ml at 25 ° C at pH 5,0; and 2,45 U / ml at 80 ° C at pH 10.

## I. INTRODUCCIÓN

El extraordinario progreso de la biotecnología industrial desde hace 10 a 20 años, particularmente en biología molecular, ingeniería de proteínas y tecnología de fermentación, ha resultado en el desarrollo de nuevas aplicaciones enzimáticas. Actualmente las áreas industriales en donde se utilizan las enzimas son diversas, tales como en los biocombustibles, la de los detergentes, la del papel y pulpa, en manufacturera textil, industria del cuero, producción de farmacéuticos, industria de alimentos, cosmética y como herramientas para investigación y desarrollo (Galante *et al.*, 2003)

La tecnología enzimática es una de las tecnologías básicas de la biotecnología, el gasto mundial de enzimas se cifra en varios miles de millones de dólares anuales. Los procesos además de buscar la rentabilidad industrial y económica, buscan la reducción de los costos sobre el medio ambiente, al disminuir el uso de productos químicos contaminantes.

Sumándose a lo anterior, la búsqueda de la disminución de costos en la eficiencia de los pasos de calentamiento/enfriamiento en los procesos

biotecnológicos y aumentos en la recuperación de productos a partir de reacciones enzimáticas, hace aumentar el interés en las enzimas de los organismos extremófilos, por ser funcionales en condiciones en que los otros no lo son; por consiguiente, su utilización podría incrementar el rendimiento de los procesos industriales, reducir su costo económico y seguir mejorando las condiciones del medio ambiente (Cieslinski *et al.*, 2005).

Actualmente las enzimas utilizadas en muchas áreas industriales son del tipo mesófilo, las cuales tienen temperaturas óptimas de catálisis de alrededor de los 30°C, lo que obliga un aumento de temperatura para su óptimo funcionamiento. Con el fin de mejorar este proceso, en términos de un aumento de la temperatura y por consiguiente un ahorro energético, nace el interés en las enzimas producidas por organismos termófilos, microorganismos que habitan en ambientes con temperaturas elevadas. En particular en fuentes termales las cuales resultan ser una atractiva fuente de organismos que produzcan celulasas eficientes a elevadas temperaturas (>45 °C).

Para una óptima aplicación de las enzimas adaptadas a elevadas temperaturas en la industria, es necesario, su caracterización para obtener valores estándares de producción de esta enzima, con dichos antecedentes se centrará la investigación de este proyecto en la caracterización de la celulasa producida por *Bacillus* sp. aislado de los géiseres de Calientes Candarave (Tacna-Perú).

### **1.1 Planteamiento del estudio:**

Enunciado del problema científico

¿Cuáles son las características enzimáticas de la celulasa producida por *Bacillus* sp. aislado de los Géiseres de Candarave-Tacna?

### **1.2 Hipótesis:**

La enzima celulasa obtenida de la cepa bacteriana termofílica *Bacillus* sp., aislada de los Géiseres de Candarave-Tacna, presenta características enzimáticas optimizables para la degradación de la celulosa.

### **1.3 Justificación:**

Diversos grupos de investigación desde los trabajos pioneros de Reese y col. (1950); Ladish et al. (1983); Lee & Fan (1980); Sing & Hayashi (1995) hasta los últimos años investigaciones como de (Castellanos *et al.*, 2000) han concentrado el interés en enzimas adaptados a ambientes extremófilos los cuales ofrecen un potencial considerable en la industria biotecnológica por sus características.

La utilización de enzimas termoestables en procesos que involucran la transformación de polímeros en unidades simples ofrece ventajas con respecto al uso de enzimas mesofílicas, ya que a elevadas temperaturas la solubilidad de los sustratos poliméricos es más alta y además a altas temperaturas los riesgos de contaminación se reducen considerablemente (Gupta *et al.*, 2004).

En el Perú no hay muchos estudios y sobre todo en la región de Tacna existen pocos trabajos sobre enzimas que participen en la degradación de la celulosa. Por este motivo, en la presente investigación realizamos la caracterización enzimática de esta cepa termófila aislada de los géiseres de Calientes - Candarave con capacidad celulolítica dando a conocer caracterización enzimática a diferentes valores de pH y temperatura.

## **1.4 Objetivos:**

### **1.4.1 Objetivo General**

Purificar y caracterizar la enzima celulolítica producida por la cepa bacteriana termofílica *Bacillus* sp. aislada de los géiseres de Calientes, Candarave-Tacna.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la cinética de crecimiento, proteínas totales y azúcares reductores del extracto enzimático celulolítico.
- Evaluar el extracto enzimático a distintos tipos de sustratos celulolíticos para corroborar su potencial de degradación.
- Determinar los parámetros cinéticos de  $V_i$ ,  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  de la enzima.
- Evaluar la actividad enzimática de la celulosa a diferentes valores de pH y temperatura.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Celulosa

La celulosa es el componente de la biomasa de plantas de mayor abundancia en la naturaleza, normalmente se encuentra en las plantas. Es uno de los materiales más utilizados desde tiempos remotos, y en la actualidad es la fuente de los combustibles orgánicos, compuestos químicos, fibras y materiales necesarios para cubrir necesidades humanas tales como el papel, la pulpa, las maderas, etc. (Eriksson, 1990; Lynd *et al.*, 1999).

Se estima que alrededor de 180 billones de toneladas de celulosa son producidas por las plantas anualmente, por lo que constituye una de las fuentes de carbono renovables más importantes que hay sobre la tierra (Kadla & Gilbert, 2000). El contenido de celulosa en las plantas depende del grupo taxonómico al que pertenezcan y oscila entre 35 y 50% en peso seco. La celulosa se encuentra embebida en una matriz compuesta de un número de moléculas (pectinas, proteínas, almidón y lípidos), y la hemicelulosa y

la lignina que comprenden del 20 al 35%, y del 5 al 30% en peso seco, respectivamente (Peters, 2006).

#### *Estructura química de la celulosa.*

La celulosa es un biopolímero lineal compuesto por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos tipo  $\beta$  1-4. Los extremos del polímero son asimétricos, los que contienen el carbono anomérico (C1) libre de la molécula de glucosa pueden reducir a un número de oxidantes, y se conocen como extremos reductores. Mientras que el C4 con un radical hidroxilo libre es el extremo no reductor (Pettersen, 1984).

El arreglo de las moléculas de celulosa en la pared celular de las plantas es jerárquico. La configuración tridimensional es estabilizada mediante interacciones de Van der Waals, y consiste de 30 moléculas lineales, de entre 10 000 y hasta 14 000 moléculas de glucosa, que forman una estructura conocida como protofibrilla; ésta a su vez se asocia con otras protofibrillas para formar la fibrilla de celulosa. Por último, las fibrillas se ensamblan entre ellas para formar las fibras de

celulosa que son entrelazadas mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Lynd *et al.*, 2002).

Dentro de las fibras de celulosa se distinguen diferentes regiones que van desde las más organizadas (región cristalina) y hasta las desordenadas (región amorfa) (Figura 1). La característica cristalina de la celulosa se debe a que los componentes moleculares de las microfibrillas están organizados muy compactamente mediante puentes de hidrógeno.

Usando difracción por rayos X se ha determinado que una unidad básica de celulosa cristalina (conocida como tipo I) está formada por ocho moléculas de celobiosa (dímeros de glucosa) arregladas en capas de moléculas paralelas mediante interacciones débiles (ínter e intramoleculares) entre los átomos de glucosa adyacentes (Pettersen, 1984).

Aunque existen otros tipos de celulosas cristalinas, la más importante es la celulosa tipo II, que se obtiene de la regeneración de la celulosa nativa después de haber sido tratada con bases fuertes para solubilizarla (Pettersen, 1984). La naturaleza estructural de la celulosa cristalina la vuelve insoluble en la mayoría de los solventes,

incluyendo el agua, y evita que sea atacada por enzimas microbianas. Este fenómeno se le conoce como recalcitrancia (Himmel *et al.*, 2007). Las regiones menos ordenadas se conocen como celulosa paracristalina, y las regiones amorfas están compuestas de estructuras secundarias, que se encuentran en menor proporción dentro del arreglo molecular de la celulosa, tales como microfibrillas en formas de rosca o vueltas, o regiones vacías que dan forma a microporos superficiales, grandes hoyos y capilares.

La celulosa amorfa por estas razones es menos compacta que la región cristalina, por lo que tiene la capacidad de absorber moléculas de agua que le confieren flexibilidad y solubilidad (Cowling, 1975).

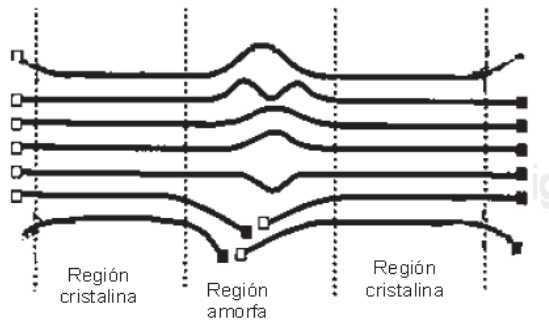


Figura 1: Diferentes tipos de organización de las fibras de celulosa generan dos conformaciones diferentes ordenadas, que comprenden la región cristalina, y desordenadas, que forman la región amorfa.

Fuente: (Lynd *et al.*, 2002)

### *La hemicelulosa.*

La hemicelulosa por su parte, es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. A diferencia de la celulosa su estructura no es homogénea.

Está formada de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa y manosa) y compuestos fenólicos (como el ácido ferúlico y p-cumárico) (Wilder & Albersheim, 1973). Las hemicelulosas son poli dispersas (lo que significa que tienen un grado de polimerización variable) y altamente ramificadas, con sustituyentes de diferentes tipos (Wong *et al.*, 1988); (Saha, 2003). La frecuencia y

composición de las cadenas depende de cada especie vegetal en particular y del método con el que fueron extraídas (Puls *et al.*, 2005).

Se han identificado dos tipos de hemicelulosa: en las maderas duras ésta existe mayormente en forma de xilanos, en las que los esqueletos homopoliméricos del xilano son cadenas de residuos de -D-xilopiranososa con uniones 1,4. Mientras que las maderas suaves contienen principalmente glucomanano. Se considera que las moléculas de hemicelulosa se encuentran altamente entrecruzadas mediante puentes diferúlicos formando una red en la que se encuentran embebidas las microfibrillas de celulosa (Figura 2), al tiempo que proteínas de la pared celular también forman puentes con el ácido ferúlico, dándole gran resistencia e insolubilidad a toda la estructura (Bidlack *et al.*, 1992). Estas propiedades, junto con la lignina, contribuyen a la elevada recalcitrancia de los materiales celulósicos.

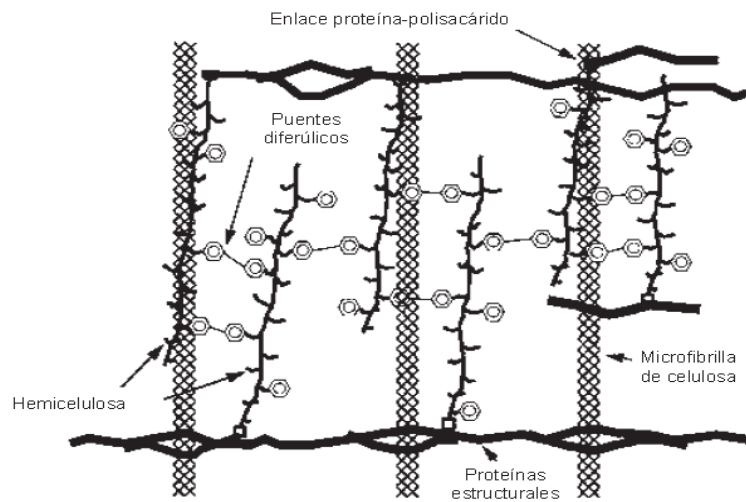


Figura 2: Modelo de la interacción de los componentes de la pared celular. Las barras paralelas representan fibras de celulosa entrelazadas por las cadenas de hemicelulosa (unida entre si por puentes diferúlicos) y proteínas estructurales (líneas negras).

Fuente: Saha, 2003.

## 2.2 Características de la Enzima Celulasa

La celulasa es una glicosil hidrolasa, producida por hongos y bacterias, así como también algunos animales. Esta enzima posee un rol muy importante en la biósfera, ya que es responsable de la

degradación de la celulosa, la que comprende la fuente de carbono más abundante en la tierra.

La naturaleza insoluble, recalcitrante de la celulosa representa un reto para el sistema de celulasas. Una característica general de la mayoría de las celulasas es una estructura modular que incluye tanto catalizadores y módulos de unión a hidratos de carbono (CBMs) (*Binding Modules Carbohydrates*). Los efectos de los CBMs se unen a la superficie de celulosa, presumiblemente para facilitar la hidrólisis de la celulosa por el rompimiento de los dominios catalíticos en estrecha proximidad al sustrato, la celulosa insoluble.

La presencia de CBMs es particularmente importante para el inicio y la capacidad de procesamiento de exoglucanasas (*Teunissen et al., 1992*).

Revisando el modelo original de la degradación de la celulosa propuesto por Reese(1950), un posible papel no-catalítico adicional por los CBMs en la hidrólisis de celulosa fue propuesto: llamado el "desprendimiento libre" de los fragmentos de celulosa de las superficies celulósicas, por ejemplo, fibras de algodón, de ese modo mejoran la hidrólisis de la celulosa. Los sistemas de celulasas exhiben

mayor actividad colectiva que la suma de las actividades de las enzimas individuales, un fenómeno conocido como sinergismo.

Cuatro formas de sinergismo han sido informadas:

(i) la sinergia endo-exo entre endoglucanasas y exoglucanasas, (ii) la sinergia exo-exo entre el procesamiento exoglucanasas de la reducción y no reducción de los extremos de las cadenas de celulosa, (iii) la sinergia entre Las exoglucanasas y B-glucosidasas que eliminan celobiosa (y celodextrinas) como productos finales de las dos primeras enzimas, y (iv) la sinergia intramolecular entre dominios catalíticos y las CBMs (Teeri, 1997) .

Sistemas de celulasas no son simplemente una aglomeración de enzimas que representan a los tres grupos de enzimas (endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -Glucosidasas, con o sin las CBMs), sino que más bien actúan de forma coordinada para hidrolizar eficientemente la celulosa. Los microorganismos han adaptado diferentes enfoques, métodos para hidrolizar eficazmente la celulosa, de origen natural en partículas insolubles o incrustadas dentro de la hemicelulosa y polímeros de lignina. Hongos filamentosos celulolíticos (y actinomicetos bacterias) tienen la

capacidad de penetrar sustratos celulósicos a través de extensiones de hifas ,por lo tanto, con frecuencia presentan sus sistemas de celulasas en las cavidades confinadas cerradas dentro de partículas celulósicas (Tomme *et al.*,1995)

Los microorganismos encargados de la degradación de sustratos celulósicos producen múltiples enzimas que actúan en sinergismo directamente sobre la celulosa (Murashima *et al.*, 2003).

Un tipo de enzimas de bacterias anaeróbicas actúan a través de un complejo multimérico asociado a la célula, a este complejo se le conoce como celulosoma (Bayer *et al.*, 2004).

Las celulasas son glicosil hidrolasas, y utilizan dos mecanismos de hidrólisis del enlace glucosídico que generandos posibles configuraciones estereoquímicas finales. Un tipo de enzimas llevan a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición  $\beta$  (mecanismo de retención) y otro tipo en la que se pierde (mecanismo de inversión) (Withers, 2001).

Las glicosil hidrolasas se clasifican en base a su secuenciade aminoácidos, este tipo de clasificación, por familias, permite identificar características estructurales de las enzimas, inferir su

mecanismo de acción y determinar relaciones evolutivas entre ellas (Henrissat & Romeu, 1995).

De acuerdo al sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se dividen en tres grandes grupos: Endoglucanasas, exoglucanasas y celobiohidrolasas las cuales se explicara más adelante. Para la efectiva digestión de la celulosa las enzimas han evolucionado mecanismos sinérgicos que les permiten contender con su recalcitrancia (Henrissat *et al.*, 1985).

Este fenómeno se refiere a la observación de que la actividad máxima de degradación de la celulosa no se da por enzimas individuales, sino por mezclas de tres o más enzimas (Nidetzky *et al.*, 1994).

Sinergismo modular: Muchas celulasas presentan una estructura modular. Típicamente, un péptido no catalítico comprende el módulo con la función de unión a carbohidratos (conocido como CBM). Éste se une mediante una bisagra flexible de aminoácidos hidroxilados (Ser y Tre) y altamente glicosilados, al siguiente módulo en donde se encuentra el sitio catalítico de la enzima, aproximándolo

íntima y prolongadamente al sustrato y potenciando su acción (Figura 3) (Linder & Teeri, 1996).

También se conocen enzimas compuestas de varios CBM y módulos catalíticos. Los CBM se clasifican a su vez, en familias según su secuencia de aminoácidos. Los CBM contienen desde 30 y hasta 200 aminoácidos, localizados hacia los extremos carboxilo o amino terminal, aunque ocasionalmente se encuentran posicionados en el centro de la cadena polipeptídica. A pesar de que cada familia de CBMs tiene características únicas se sabe que su afinidad por la celulosa se debe en parte a su superficie plana compuesta de aminoácidos aromáticos que le proporcionan cualidades hidrofóbicas (Hilden & Johansson, 2004). Se sabe también que mediante un mecanismo no catalítico el CBM de la endoglucanasa III de *T. reesei* altera la estructura de la celulosa cristalina (Xiao *et al.*, 2001). Otra evidencia del papel del CBM en la modificación de la estructura de la celulosa, es que sus homólogos en plantas, las expansinas (involucradas en la expansión de la pared celular durante el crecimiento), tienen actividades no hidrolíticas sobre las interacciones entre la celulosa y la hemicelulosa (Cosgrove, 2000).



Figura 3: Modelo tridimensional de una celobiohidrolasa actuando sobre una cadena de celulosa. Se muestra el módulo catalítico en forma de túnel (liberando una molécula de celobiososa), la bisagra flexible y el CBM unido a la celulosa.

Fuente: Divne, 2000

El siguiente nivel de sinergismo ocurre entre las diferentes enzimas secretadas al medio externo. Aunque los mecanismos que estas enzimas utilizan para potenciar su acción son controvertidos se han propuesto diferentes modelos (Valjamae *et al.*, 1998), de los que sobresalen los siguientes:

Sinergismo exo-endo: En éste las endoglucanasas inician el ataque de la molécula en los múltiples sitios internos de las regiones

amorfos de la fibrilla y crean extremos terminales para el subsecuente ataque de las exoglucanasas.

Las endoglucanasas también modifican la estructura de la celulosa al reducir las fuerzas de cohesión entre las fibrillas, lo que resulta en el hinchamiento de la estructura que permite un mejor acceso a las celobiohidrolasas (Josefsson *et al.*, 2008).

Sinergismo exo-exo: Se descubrió al analizar dos celobiohidrolasas de *T. Reesei* (Cel7A/CBHI y CBHII), y observar que las actividades de las dos era mayor que la suma de las actividades individuales (Barr *et al.*, 1996).

Se ha descubierto que estas enzimas tienen al sitio catalítico embebido en un túnel con sitios (desde 6 hasta 10) de unión para glucósidos. Estos sitios de unión permiten que la enzima siga en contacto con la hebra de glucano, aun después de la hidrólisis de la celobiosa (que es liberada del extremo más lejano del túnel, lo que resulta en una alta procesividad. (Kipper *et al.*, 2005).

El pre tratamiento de celulosa con Cel7A/ CBHI (que degrada el extremo reductor), con CBHII (que actúa sobre el no reductor), la hace más susceptible que si se tratara con cada enzima

individualmente, debido a que la acción de la primera enzima expone cadenas ocultas que son sustrato de la siguiente (Eveleigh, 1987).

La combinación de estas dos enzimas es tan potente que llevan a cabo la solubilización de cristales de celulosa, a baja velocidad, aun en ausencia de endoglucanasas (Teeri, 1997).

Inicialmente, los sistemas celulolíticos que recibieron mayor atención fueron los de organismos productores de grandes cantidades de enzima, tales como *T. reesei* y *Phanerochaete chrysosporium*. Este último degrada la celulosa y la hemicelulosa y es uno de los pocos basidiomicetos que se han utilizado como modelo para el estudio de la degradación de celulosa. Del análisis de la secuencia de su genoma se han predicho 240 enzimas que actúan sobre carbohidratos, de las que 40 son probables endoglucanasas, 7 celobiohidrolasas y 9  $\beta$ -glucosidasas (Martínez *et al.*, 2004). En *P. chrysosporium* también ha sido detectado el sinergismo de tipo endo-exo, en el que la endoglucanasa 28 y la celobiohidrolasa II actúan sinérgicamente para degradar microcelulosa cristalina comercial (Henriksson *et al.*, 1999).

Actividades celulolíticas hacia la celulosa amorfa y la cristalina, y dos tipos de xilanos han sido observadas también en otros dos basidiomicetos de la pudrición blanca (*Bjerkandera adusta* y *Pycnoporus sanguineus*).

### **2.3 Tipos de celulasas:**

Los microorganismos generalmente degradan la celulosa cristalina a celodextrinas y finalmente a glucosa por medio de un complejo celulolítico. El complejo, conocido de forma simplista como celulasa, en realidad está compuesto por tres tipos de enzimas: endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas.

Las endoglucanasas, también conocidas como endo- $\beta$ -1,4-glucan glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4) se agrupan en las familias 5, 6, 8, 9 y 12 principalmente, de las glicosil hidrolasas (Baldrian & Valaskova, 2008) son glucanasas de acción aleatoria que dividen las cadenas de celulosa de las secciones menos ordenadas de las fibras para producir secciones susceptibles al ataque de las exoglucanasas. Al actuar sobre derivados solubles de la celulosa los principales productos de su acción son la celobiosa y la celotriosa.

Estos compuestos son hidrolizados en un grado superior hasta glucosa por ciertas endoglucanasas.

Las exoglucanasas hidrolizan las celulodextrinas comenzando en su extremo. Una de estas enzimas, la exo-  $\beta$ -1,4-glucan glucohidrolasa, va desprendiendo unidades de glucosa del extremo no reductor de los glucanos. Esta acción es especialmente pronunciada en las pequeñas cadenas que resultan de la acción del ataque de las endoglucanasas. Otro tipo de exoglucanasas, las exo-  $\beta$ -glucancelobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) remueven unidades de celobiosa de los extremos no reductores de las cadenas, incluyendo aquellas de mayor longitud todavía adheridas a la matriz de celulosa cristalina. (Baldrian & Valaskova, 2008).

Las  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21) pertenecientes a las familias 1 y 3 de las glicosil hidrolasas y se encargan de degradar la celobiosa a monómeros de glucosa. Actúan sobre la celobiosa y en menor grado sobre otros oligosacáridos  $\beta$ -1,4 para producir glucosa. Su acción parece limitada a sustratos solubles (Baldrian & Valaskova, 2008; Lynd *et al.*, 2002; Schmid & Wandrey, 1987).

## 2.4 Microorganismos productores de celulasas

El material celulósico es particularmente atractivo como fuente de carbono y energía debido a su bajo costo y su gran abundancia. Sin embargo, debido a su carácter recalcitrante solamente ciertos organismos (como bacterias y hongos) producen las enzimas necesarias para utilizarlo (Béguin & Aubert, 1994).

Se han identificado dos importantes grupos con capacidades celulolíticas. El primero de ellos es el grupo anaeróbico, que comprende especies bacterianas y fúngicas habitantes de aguas residuales y el rumen y tracto intestinal de los animales herbívoros y algunos insectos como escarabajos y termitas (Cazemier *et al.*, 2003; Warnecke *et al.*, 2007). Como ejemplos bacterianos pertenecientes a este grupo, entre otros, se encuentran los géneros *Clostridium* y *Ruminococcus*. Mientras que algunos hongos identificados son: *Anaeromyces mucronatus*, *Caecomyces communis*, *Cyllamyces aberencis*, *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces sp.* Y *Piromyces sp.* (Doi, 2007; Teunissen & Op den Camp, 1993).

El segundo grupo incluye especies aeróbicas habitantes de los suelos, especialmente los boscosos, tales como las bacterias *Cellulomonas* y *Streptomyces* (Alani *et al.*, 2008), y los hongos basidiomicetos responsables de la pudrición de la madera (Baldrian & Valaskova, 2008; Martínez *et al.*, 2005).

*Trichoderma reesei* es un ascomiceto del que históricamente se han aislado celulasas y xilanasas con aplicaciones industriales (en las industrias de los alimentos-humana y animal, farmacéutica, textil, del papel, la pulpa, y energética), por lo que sus enzimas han sido ampliamente estudiadas y han servido como modelo de la degradación de la celulosa (Druzhinina *et al.*, 2006).

Bacterias del genero *Bacillus* aerobias y termofílicas producen enzimas celulolíticas con actividad básicamente endo- $\beta$ -1,4-glucanasa y exo- $\beta$ -1,4-glucanasa; pero tienen la característica particular de presentar resistencia a ser inhibidas por la glucosa o celobiosa que es liberada al medio luego de la hidrólisis (Erikson K. y Wood T., 1985).

En el caso específico del genero *Bacillus* sus especies son atractivas industrialmente por varias razones incluyendo sus altas

tasas de crecimiento que permiten tiempos de fermentación cortos, su gran capacidad de secreción extracelular de enzimas, esta capacidad secretoria presenta un potencial para la producción heteróloga de proteínas, además estas bacterias son consideradas (GRAS) generalmente como seguras (Schallmey *et al.*, 2004).

Actualmente el mercado mundial de las enzimas se estima en 1,6 millones de dólares, se ha determinado que las enzimas de *Bacillus* presentan cerca del 50% de este mercado. La mayor producción de estas enzimas (37%) pertenece a serin-proteasas alcalinas, el segundo grupo más importante son las amilasas con un 13% del mercado seguida por otras enzimas pectatoliasas y las  $\beta$ -glucanasas (Schallmey *et al.*, 2004).

## **2.5 Factores ambientales que determinan la degradación microbiológica de la celulosa.**

La tasa a la cual se metaboliza está dada por varios factores del medio ambiente, y los suelos que varían en sus características físicas y químicas poseen marcadas diferencias en su capacidad celulolítica. Los principales factores del medio ambiente que afectan la transformación son el nivel de nitrógeno disponible, la temperatura, aireación, humedad, pH, la presencia de otros carbohidratos y la proporción relativa de lignina en restos vegetales (Alexander, 1980).

### **2.5.1. Concentración de Nitrógeno en el suelo**

La aplicación de nitrógeno inorgánico a la descomposición de la celulosa en el suelo y tanto las sales de amonio como las de nitrato son buenas fuentes de este elemento. La respuesta a este indica que el nivel de nitrógeno en el suelo es un factor limitante (Alexander, 1980).

### **2.5.2.Temperatura**

La utilización biológica de la celulosa puede llevarse a cabo desde temperaturas cercanas a la congelación hasta alrededor de los 65°C. Cada una de las variedades de organismos celulolíticos es afectada en forma diferente por la temperatura. Los mesófilos dominan las temperaturas moderadas mientras que la microflora termófila puede degradar la celulosa por arriba de los 45 °C. Debido a los cambios en la composición de la flora inducidos por la temperatura, el calor aumenta la velocidad de transformación del sustrato a causa del efecto directo de esta sobre la acción enzimática (Alexander, 1980).

### **2.5.3.Aireación**

La aireación también rige la composición de la flora activa. A causa del proceso anaeróbico, el metabolismo de la celulosa es reducido significativamente en medios deficientes de oxígeno en comparación con habitats aireados (Alexander, 1980).

#### **2.5.4.pH**

En medios con pH neutro y alcalino, muchos microorganismos son capaces de crecer y liberar las enzimas apropiadas para la hidrólisis del polisacárido, bajo condiciones ácidas la desaparición de la celulosa se debe principalmente a hongos filamentosos. Aunque el proceso es rápido a pH menor a 5 y ocasionalmente por debajo de 4, los suelos con bajas concentraciones del ión hidrógeno degradan la celulosa mas fácilmente (Alexander, 1980).

#### **2.6. Ventajas de las celulasas bacterianas en comparación a las de origen fúngico.**

Tanto hongos como bacterias han sido fuertemente explotados por sus habilidades para producir una amplia variedad de celulasas y hemicelulasas. Sin embargo se ha tenido mayor énfasis en el uso de hongos debido a su capacidad para producir importantes cantidades de celulasas y hemicelulasas que son secretadas al medio siendo sencilla su extracción y purificación. No obstante el

aislamiento y caracterización de nuevas glicosidasas en eubacterias está siendo ampliamente estudiado.

Estos organismos presentan una serie de ventajas, la primera, es que tienen tasas de crecimiento mayores que los hongos permitiendo una mayor producción de enzimas. En segunda, las glicosidasas bacterianas son más complejas y son expresadas en complejos multienzimáticos aumentando su actividad y sinergismo.

Los factores favorables más importantes son la baja demanda de nutrientes para su crecimiento y la capacidad de desarrollarse en una amplia variedad de ambientes, teniendo cepas celulolíticas altamente resistentes a factores de estrés ambientales, entre las cuales se encuentran cepas termofílicas, psicrófilas, alcalófilas, acidófilas y cepas que son halófilas. Estas bacterias no solo pueden sobrevivir en estos ambientes, sino que producen enzimas que son estables bajo condiciones extremas que podrían mantenerse en procesos de bioconversión incrementando las tasas de actividad enzimática y fermentación (Maki *et al*, 2009).

## **2.7 Materiales lignocelulósicos como fuentes renovables de carbono.**

La biomasa lignocelulósica es producida mediante fotosíntesis la cual convierte la energía solar en energía química, almacenándola en carbohidratos mediante la fijación del carbono atmosférico, por lo cual la lignocelulosa es considerada el recurso natural renovable más abundante en el planeta, con cerca de 200 billones de toneladas producidas anualmente (Zhang, 2008).

La lignocelulosa proporciona la estructura de las plantas encontrándose en las raíces, tallos y hojas; como se muestra en la Figura 4 está formada de tres componentes principales: celulosa (38-50%), lignina (15-30%) y hemicelulosa (23-32%), esta proporción varía entre especies (Sierra *et al.*, 2008).

La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waalsintramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Ovando & Waliszewski, 2005), la lignina es un polímero

de unidades de fenil propano unidas mediante enlaces éter la cual actúa como pegamento en las fibras de celulosa, además actúa como barrera impidiendo la degradación enzimática. La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucorónico, los azúcares están unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3 (Perez, *et al*, 2002).

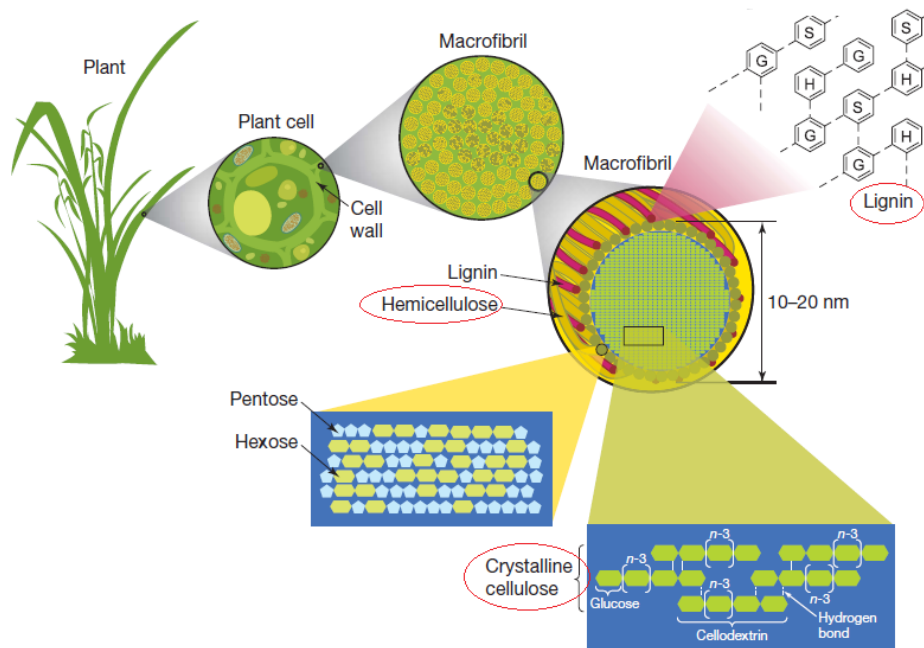


Figura 4: Estructura de la lignocelulosa, La celulosa, la hemicelulosa y la lignina forman estructuras llamadas microfibrillas, organizadas en macrofibras que regulan la estabilidad de la pared celular de las plantas

Fuente: Rubin, 2008

## **2.8 Aplicación de enzimas celulasas.**

Hoy en día, las enzimas se utilizan comúnmente en muchas aplicaciones industriales, y la demanda para las enzimas más estables, altamente activas y específicas está creciendo rápidamente.

Curiosamente, el 60 % de la oferta total mundial de enzimas industriales se produce en Europa, y el restante 40% de EE.UU. y Japón. Además, aproximadamente el 75 % de la industria de las enzimas son hidrolasas, seguido de las carbohidrolasas siendo el segundo grupo más grande. La biotecnología de celulasas y hemicelulasas comenzó a principios de la década de 1980, primero en la alimentación animal seguido de aplicaciones de alimentos (Chesson, 1987; Thomke, 1980; Voragen, 1992; Voragen, 1980,1986). Posteriormente, se utilizaron estas enzimas en la industria textil, de lavandería así como en las industrias de papel y celulosa (Godfrey 1996; Wong y Saddler, 1992, 1993).

Actualmente, las celulasas tienen un amplio rango de aplicaciones potenciales en biotecnología y muchas endoglucanasas termoestables tienen un gran potencial para usos industriales. En la

mayoría de los casos son usadas con las hemicelulasas, pectinasas, ligninasas y otras enzimas relacionadas (Karmakar, 2011) Específicamente tienen importantes aplicaciones en la agricultura, en la industria papelera, en textiles especialmente en la mejora de la calidad de telas así como en detergentes que proporcionan mejor limpieza sin degradar las fibras; en la industria de alimentos mejorando texturas, sabores y aromas; en la mejora de las fermentaciones de cervezas, vinos y otras bebidas alcohólicas; pero principalmente en la industria de la bioconversión de materiales celulósicos en alimentos para ganado altos en energía con mejores tasas de digestión y absorción de nutrientes, en la producción de proteína unicelular, lípidos, ácidos orgánicos, etanol solventes y otros productos químicos con un alto valor agregado como biocombustibles (Chander R. K. *et al.*,2011).

### **2.8.1 Celulasas en la industria energética: Biocombustibles:**

El reto principal de la industria y la biotecnología en la producción de combustibles es la bioconversión de la celulosa, por lo que las celulasas han adquirido una importancia enorme en estos procesos. Para contender con los grandes volúmenes de materiales lignocelulósicos requeridos en la producción de etanol a niveles industriales, se necesita enzimas con altas actividades en diferentes condiciones de temperatura, salinidad y pH (Sun & Cheng, 2002).

En la Figura 5 se muestra un resumen del proceso de obtención de etanol, y a continuación se detallan algunos pasos del proceso.

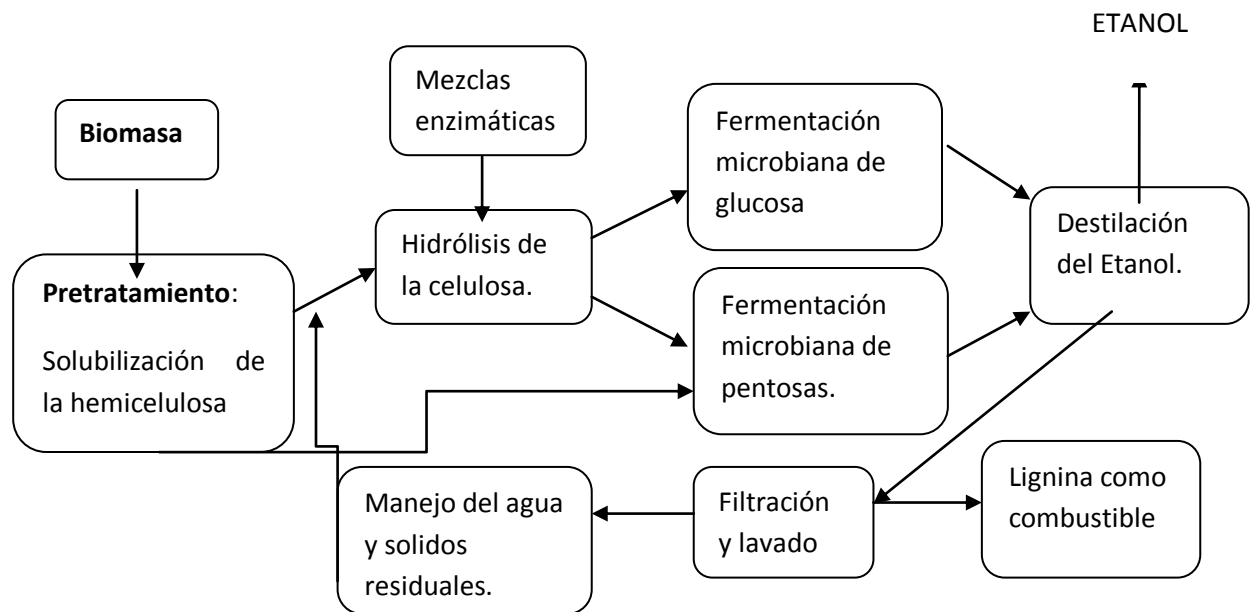


Figura 5: Pasos del proceso de producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos.

Fuente: Martínez Anaya, 2008

La producción mundial de bioetanol en 2007 fue de  $50 \times 10^9$  millones de litros, lo que equivale a más de cuatro veces de lo que se produjo en 2003 (Tollefson, 2008). Sin embargo, este aumento cubre solamente el 1% de las necesidades totales de combustible. Algunos estudios han demostrado la no sustentabilidad de la

tecnología actual que emplea maíz y caña de azúcar como materias primas en los principales países productores como los Estados Unidos de América y Brasil, respectivamente (Hill *et al.*, 2006).

Además de que las prácticas agrícolas actuales son dañinas al medio ambiente debido a la erosión de los suelos y la contaminación del agua que generan, lo que reduce los beneficios asociados a la limpieza del uso de etanol (Simpson *et al.*, 2008).

El concepto de la utilización de celulosa como materia prima de azúcares que puedan ser bioconvertidos a combustibles mediante el empleo de microorganismos, ha retomado gran importancia en los últimos años debido a los altos precios del petróleo y a las inconveniencias de los cultivos mencionados (Sun & Cheng, 2002; Wackett, 2008).

Las fuentes celulósicas potencialmente utilizables son los desechos de la industria maderera (en forma de aserrín), los agrícolas (bagazos), y los domésticos (Lin & Tanaka, 2006).

Sin embargo, una variedad de pastos de crecimiento rápido podrían ser una posibilidad más real mientras se desarrollan las

tecnologías que permitan el uso de otros sustratos. Las especies estudiadas hasta el momento son:

*Panicumvirgatum* (Sarath *et al.*, 2008; Schmer *et al.*, 2008), *Pennisetum purpureum* (Anderson *et al.*, 2008), y *Miscanthus giganteus* (Murnen *et al.*, 2007), este último originario del Este de Asia, ha podido sembrarse en América y Norte y Sur de Europa. *Miscanthus giganteus* un tipo de pasto alto perenne que presenta grandes ventajas, crece con altos rendimientos en suelos poco fértiles y con mínimos requerimientos de fertilizantes, nitrógeno, herbicidas y agua. Su contenido de celulosa es mayor al de muchos residuos agrícolas y semejante al de las maderas duras.

Una vez elegidos los materiales celulósicos es necesario tratarlos mediante métodos fisicoquímicos y biológicos (Galbe & Zacchi, 2007; Lee *et al.*, 2007).

Se ha determinado que la insolubilidad de la celulosa cristalina, responsable de su resistencia ante la hidrólisis, no es un criterio absoluto ni indicativo de la susceptibilidad a la digestión enzimática, sino que más bien el grado de hinchamiento y la estructura fibrilar son los parámetros importantes.

Un mayor número de poros formados durante tratamientos previos a la acción enzimática permite un mejor acceso de las enzimas a las microfibrillas, al aumentar el área superficial del sustrato (Mosier *et al.*, 2005). Los pre tratamientos se llevan a cabo en medios líquidos, lo que resulta en una fracción líquida compuesta entre otros compuestos, de carbohidratos monoméricos y poliméricos, y una fracción de material sólido (Galbe & Zacchi, 2007; Mosier *et al.*, 2005). Para obtener los máximos rendimientos de la biomasa el pre tratamiento debe ser muy eficiente, y permitir una alta recuperación de los carbohidratos y la lignina (sin descomponerlos).

Y para permitir una alta eficiencia de la subsiguiente hidrólisis enzimática de la celulosa, el líquido debe contener pocos o nulos inhibidores de la fermentación (ej. fenol, proveniente de la lignina, y ácido acético y 5-hidroximetilfurfural que son compuestos derivados de la degradación de hexosas y pentosas) evitando un paso extra para su eliminación, y mantener bajos los costos de operación (Klinke *et al.*, 2004). Diferentes tipos de pre tratamientos han sido usados buscando satisfacer las necesidades anteriores, y

en general son una combinación de condiciones físicas y químicas (Mosier *et al.*, 2005).

Hidrólisis y expresión heteróloga de celulasas: La hidrólisis de la celulosa con celulasas de microorganismos se lleva a cabo en un rango de 50 a 55 °C y alrededor de pH 5. Comercialmente se encuentra disponible una mezcla de celulasas conocida como Accellerase™ (de Genencor®) producida por una cepa recombinante de *Trichoderma Reesei*.

Sin embargo, otras enzimas necesitan ser estudiadas para el desarrollo de nuevas formulaciones comerciales. Para generar organismos recombinantes productores de grandes cantidades de enzimas, o para estudiar y mejorar su función enzimática se llevan a cabo experimentos de expresión heteróloga de celulasas.

Para el caso de organismos super productores, existen reportes de expresión heteróloga en varios sistemas, tanto bacterianos como fúngicos e incluso en células de animales (Boer *et al.*, 2000).

Se han expresado celulasas bacterianas en otras bacterias con un éxito razonable (Yao *et al.*, 2007)

Algunas de las enzimas de esta ruta han sido clonadas en *E. coli* para generar bacterias productoras de butanol, con la ventaja de que éstas no sintetizan acetona como la cepa original de *Clostridium* (Atsumi *et al.*, 2007). Se ha descrito la producción de etanol, propanol e isoprenos, especialmente en bacterias del género *Bacillus* (Kuzma *et al.*, 1995)

El estudio de los sistemas de degradación de lignocelulosa es complejo y aún falta mucho por hacer y descubrir en el campo de las celulasas. Sin embargo, el potencial de los materiales lignocelulósicos para la industria de los biocombustibles es importantísimo ya que representan una fuente renovable y su uso es más amigable con el medio ambiente. La producción de bioetanol a partir de cultivos agrícolas ha generado problemas tales como el desplazamiento de áreas cultivables de alimentos y el encarecimiento de los mismos, lo que pone en riesgo la seguridad alimentaria a nivel mundial. Los materiales lignocelulósicos para la producción de biocombustibles son una mejor alternativa, aunque se tienen que mejorar y desarrollar tecnologías eficientes que permitan su aprovechamiento.

## **2.9 Determinación de la actividad celulolítica**

### **2.9.1 Prueba cualitativa con Lugol**

El color que dan los polisacáridos con el lugol se debe a que el Iodo ocupa espacios vacíos en las hélices de la cadena de unidades de glucosa, formando un compuesto de inclusión que altera las propiedades físicas del polisacárido, especialmente la absorción lumínica.

Esta unión del Iodo a la cadena es reversible, y por calentamiento desaparece el color, que al enfriarse reaparece (Fooladi, 2010).

### **2.9.2 Prueba cuantitativa por la técnica del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)**

La actividad del sistema enzimático en el complejo celulolítico puede medirse determinando la cantidad 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)

Este método del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que los grupos aldehídos son oxidados a grupos carbonilos. La reducción del ácido genera un color amarillo 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).

La lectura de la prueba 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 en el tiempo de preparación del reactivo, el cual con frecuencia es ignorado. (Zhang *et al.*, 2006).

### **2.9.3 Determinación de proteínas totales: Método de Bradford**

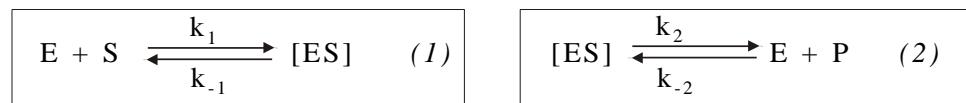
Este método constituye una forma rápida y confiable para la determinación de proteínas. Se basa en la cuantificación de la unión del colorante Azul Brillante de Coomassie a una proteína desconocida y la comparación de esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar. El complejo colorante-proteína presenta un máximo de absorción a 595 nm. Este método es sensible, simple y rápido. (Bradford, 1976).

### **2.10 Caracterización cinética de enzimas**

En bioquímica se utiliza normalmente diversos métodos para estudiar el mecanismo de acción de enzimas purificadas. La estructura tridimensional de la proteína proporciona información importante que se puede completar con la obtenida química de proteínas clásica y por métodos modernos de mutagénesis dirigida (cambio de secuencia de aminoácidos de una proteína mediante ingeniería genética).

No obstante uno de los métodos para estudiar el mecanismo reacción enzimático consiste en la determinación de la velocidad de reacción y del modo en que esta cambia en respuesta a cambios en los parámetros experimentales.

Las reacciones catalizadas por enzimas pueden ser expresadas como:



De acuerdo a la ecuación (2) la velocidad inicial ( $V_0$ ) de una reacción catalizada por enzimas estaría determinada por la desaparición del complejo ES y, por lo tanto, es proporcional a su concentración:

Sin embargo,  $k_2$  y  $[ES]$  son difíciles de determinar directamente por lo que Michaelis y Menten derivaron la ecuación



(3) en términos de otras variables que pueden ser medidas experimentalmente:

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

Uno de los factores clave que afectan la velocidad de una reacción catalizada por una enzima es la concentración de sustrato presente (S), sin embargo, el estudio de los efectos de la concentración de sustrato es complicado debido al hecho de que (S) cambia durante el transcurso de una reacción in vitro a medida que el sustrato se convierte en producto.

El efecto de la velocidad al variar la concentración de sustrato [S], mientras se mantiene constante la concentración de enzima [E], se observa en la Figura 6.

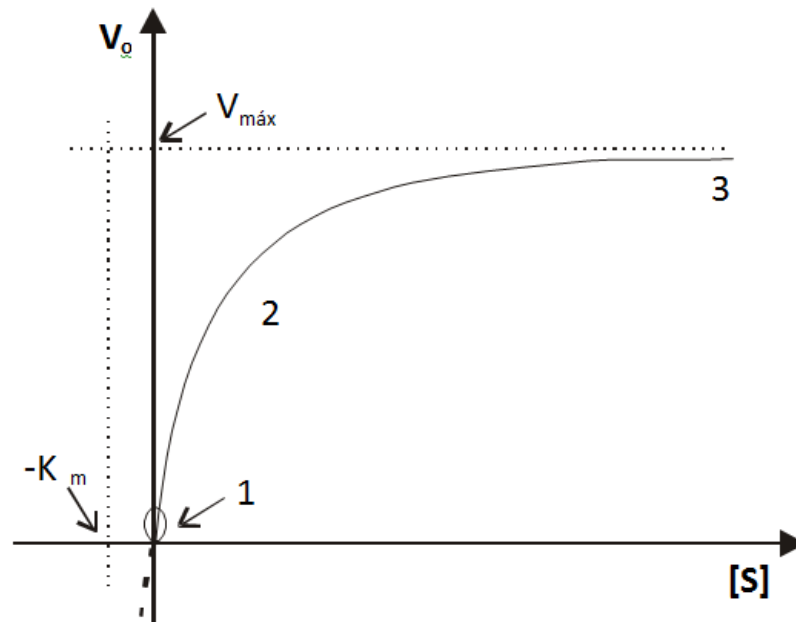


Figura 6: Efecto del sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática.

Fuente: Wiener, 2000

En la Figura 6 observamos que a bajas concentraciones de  $[S]$ , la  $V_0$  incrementa casi linealmente con el incremento de la concentración  $[S]$  (1). A concentraciones mayores de sustrato, los incrementos de velocidad inicial en respuesta a los incrementos de la concentración de sustrato son cada vez menores (2).

Finalmente alcanzamos un punto donde los aumentos de velocidad son despreciables frente a los incrementos de [S]. En este momento decimos que la reacción enzimática tiende a velocidad máxima (3). La curva es una hipérbola rectangular que pasa por el origen y, cuyas asíntotas son:

$$[S] = -K_m \text{ y } V_o = V_{m\acute{a}x}.$$

Las constantes en la ecuación (4) son  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$ . La  $V_{m\acute{a}x}$  depende únicamente de la concentración de enzima y  $K_m$  es independiente de la concentración de enzima y de la concentración de sustrato.

La constante de Michelis-Menten ( $K_m$ ) se define (en la deducción de la ecuación 1 y 2) como el cociente entre la suma de las constantes de disociación del complejo [ES] y las constantes de formación de dicho complejo.

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (5)$$

Si consideramos en la ecuación de Michaelis-Menten que  $V_o$  es igual a  $1/2 V_{m\acute{a}x}$  (ecuación 6), se deduce que  $K_m$  es numéricamente

igual a la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima (ecuación 7) y por eso se expresa en unidades de sustrato.

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \longrightarrow K_m + [S] = 2 [S] \longrightarrow K_m = 2 [S] - [S] \quad (6)$$

$$K_m = [S] \text{ cuando } V_o = \frac{1}{2} V_{\max} \quad (7)$$

El conocimiento de  $K_m$  nos indica la afinidad de la enzima por un determinado sustrato. Cuanto menor es el  $K_m$  mayor es la afinidad de la enzima por el sustrato. El cálculo del  $K_m$  se utiliza para comparar la afinidad de una misma enzima por sustratos diferentes o de enzimas diferentes por un mismo sustrato

(Figura 7).

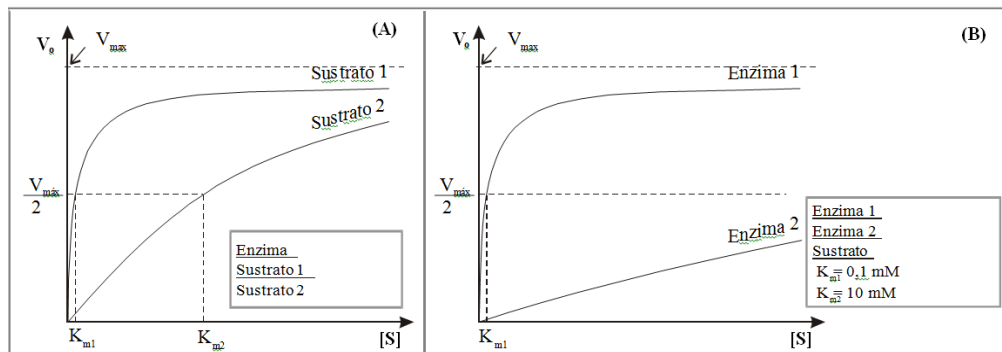


Figura 7: Curvas de sustrato. (A) Una enzima con dos sustratos. (B) Dos enzimas con el mismo sustrato.

Fuente: Wiener, 2000

El conocimiento de  $V_{\text{máx}}$  nos da información sobre la cantidad de enzima presente ya que la  $V_{\text{máx}}$  es directamente proporcional a la concentración de enzima. A medida que aumenta la concentración de enzima aumenta el complejo [ES] y por lo tanto aumenta la velocidad de la reacción. Cuando se trabaja con concentraciones de sustrato saturantes, toda la enzima está formando el complejo [ES] y el aumento de la velocidad es proporcional al aumento de la concentración de enzima, es decir que estamos trabajando en condiciones de  $V_{\text{máx}}$ . Si la concentración de sustrato deja de ser saturante el aumento de la actividad deja de ser proporcional, y la velocidad deja de ser máxima (Figura 8).

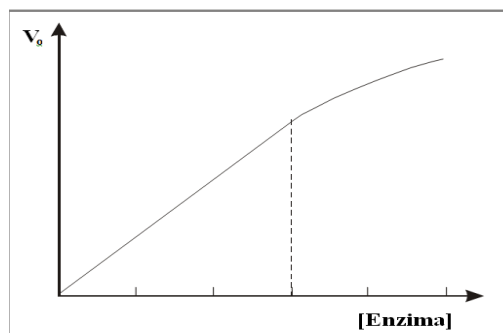


Figura 8: Efecto de la concentración de enzima en una reacción enzimática.

Fuente: Wiener, 2000

Por lo tanto, teniendo en cuenta estas consideraciones, cuando se necesita conocer la cantidad de enzima presente en una muestra se recurre a la velocidad de la reacción enzimática que cataliza, en condiciones saturantes de sustrato es decir se requiere hallar la ( $V_{m\acute{a}x}$ ). Los kits comerciales están diseñados para medir actividad enzimática dentro de un rango de concentración de enzima. Si la concentración de enzima es demasiado alta, puede suceder que la concentración de sustrato deje de ser saturante y en esos casos lo correcto es diluir la muestra problema y luego repetir la medición.

#### **2.10.1 Métodos gráficos para la determinación de las constantes cinéticas de las enzimas.**

Diversos métodos han sido propuestos para determinar  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  en forma gráfica: Hanes- Woolf, Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk y otros. Todos ellos se basan en modificaciones de la ecuación de Michaelis-Menten para que responda a la ecuación de una recta.

### a) Representación de Eadie-Hofste

En la representación de Eadie-Hofste Figura 9 se presentan la gráfica de las velocidades enzimáticas frente a los cocientes de las velocidades entre las respectivas concentraciones de sustrato, obteniéndose una recta cuyo corte con el eje de abscisas corresponde a la  $V_{\text{máx}}/K_m$  y con el eje de ordenadas equivale a la  $V_{\text{máx}}$ , siendo la pendiente  $-K_m$ .

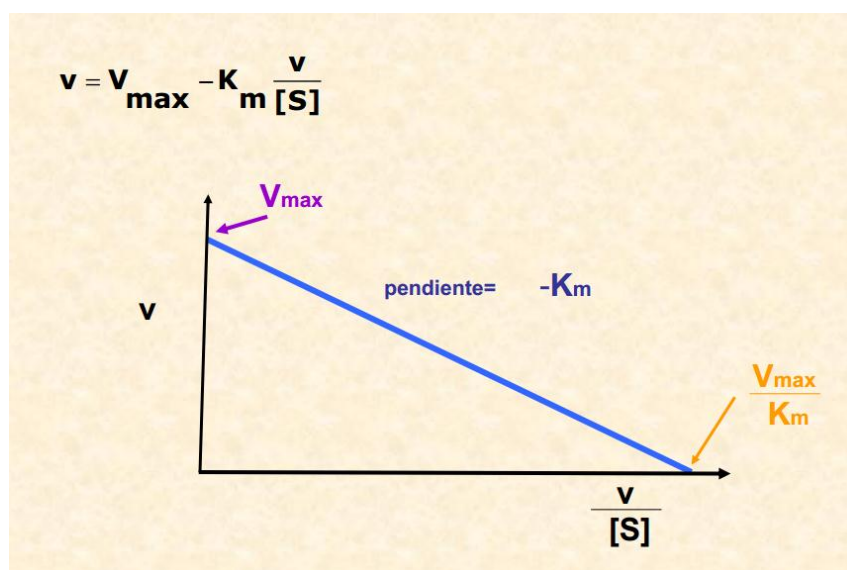


Figura 9: Representación de Eadie-Hofste de la velocidad frente al cociente  $v/[S]$

Fuente: Wiener, 2000

### b) Método de la doble inversa (Lineweaver-Burk)

Invirtiendo y reordenando la ecuación de Michaelis-Menten se obtiene la ecuación de una recta:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]}$$

Al graficar  $1/V_o$  en función de  $1/[S]$  se obtiene la Figura 10. De la intersección de la recta con la ordenada se obtiene  $1/V_{\max}$  y de la intersección de la recta con la abscisa se obtiene  $-1/K_m$ .

En la representación de Lineweaver-Burk (Figura 10) se presentan los inversos de las velocidades enzimáticas frente a los inversos de las respectivas concentraciones de sustrato. Se obtiene así una recta cuyo corte con el eje de abscisa equivale a  $-1/K_m$  y con el eje de ordenadas a  $1/V_m$

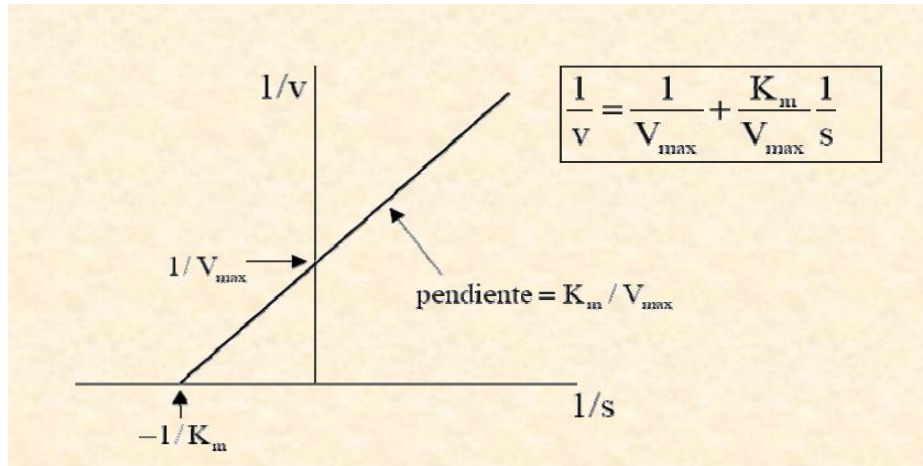


Figura 10: Representación de Lineweaver-Burk de los Inversos de las velocidades enzimáticas frente a los inversos de las concentraciones de sustrato.

Fuente: Wiener, 2000

La ventaja del uso del método de la doble recíproca respecto a los otros métodos radica en la determinación más precisa de la  $V_{\max}$  lo cual es de utilidad si se requiere realizar un análisis de la inhibición enzimática.

En la actualidad se usan métodos de regresión no lineal, los que por aproximaciones matemáticas encuentran los valores de los parámetros cinéticos. Cabe aclarar que todas las técnicas de cálculo por métodos gráficos son menos precisas que los métodos de regresión no lineal.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Cepa bacteriana

Cepa termófila celulolítica identificada como *Bacillus* sp. aislada de las fuentes termales de los géiseres de Calientes, Candarave. El inóculo provino de una muestra almacenada bajo refrigeración a 4°C, en medio CMC.

##### 3.1.2 Reactivos

- Reactivo ácido dinitrisalisílico (DNS).
- Reactivo de Bradford
- Carboximetilcelulosa
- Componentes del medio Carboximetilcelulosa
- Kit de Tinción de Gram
- Buffer Acetato de sodio pH 5
- Buffer Fosfato pH 7
- Buffer Glicina pH 10
- Buffer Tris-HCl 20 mM pH 7
- Sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

- Membrana de millipore 0,2 $\mu$ m
- Bolsas de diálisis

### **3.1.3 Equipos**

- Esterilizador GEMMY, Modelo YCO-010
- Baño termostatzado GEMMY, Modelo YCW-010E
- Incubadora GEMMY, Modelo IN-010
- Espectrofotómetro GREETMED, Modelo NV-203
- Autoclave GEMMY
- Cámara de Neubauer
- Equipo de filtración
- Microcentrífuga EPPENDORF 5418
- Vórtex Mixer LABNET
- Cocina Eléctrica
- Balanza electrónica DAKOTA
- Motores
- Micropipeta 5-50uL DRAGON LAB
- Micropipeta 100-1000 uL BIOHIT, Germany
- Micropipeta 100 uL BOECO - Germany
- Micropipeta 50 uL BOECO –Germany

## 3.2 METODOLOGÍA

### 3.2.1 ESTRATEGIA DE TRABAJO

Se trabajó con una cepa bacteriana, aislada desde las fuentes termales de los géiseres de Calientes-Candarave, Tacna, que crece a 45 °C. La cepa fue seleccionada por expresar una celulasa en el sobrenadante del cultivo, del tipo endoglucanasa, debido a la inducción del CMC.

La estrategia de trabajo fue de purificar y caracterizar parcialmente la enzima producida por *Bacillus* sp. para una producción óptima de esta enzima celulasa nativa.

Dichas características resultan importantes para conocer los valores de cinéticos y de resistencia de la enzima para posteriormente poder recombinarla y se logre una utilización en diferentes áreas.

### **3.2.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

El diseño de la investigación es experimental.

### **3.2.3 UNIVERSO Y LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO**

Esta investigación se ejecutó en las instalaciones del laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, Escuela de Biología-Microbiología de la Universidad de Nacional Jorge Basadre Grohmann.

### **3.2.4 POBLACIÓN Y MUESTRA**

#### **3.2.4.1 Población:**

La población la constituye los ocho géiseres de Calientes Candarave-Tacna muestreados a 4100 msnm.

#### **3.2.4.2 Muestreo:**

Se utilizó el muestreo no probabilístico por conveniencia debido a que era imposible la aleatorización, ya que la población de microorganismos es ilimitada en las fuentes termales de los géiseres, se tomaron las muestras de partes accesibles del géiser y donde se presenciaba sedimentos.

### **3.2.5 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS**

Para el análisis de la información los resultados fueron comparados por análisis de varianza (ANOVA), se realizó una gráfica de caja y bigotes y gráficas de barras de error, los experimentos con alta significancia fueron evaluados mediante la prueba de Tukey todo con un nivel de significancia del 5%.

#### **VARIABLES**

##### **a. Variables Independientes:**

pH, temperatura, sustratos

##### **b. Variable Dependiente:**

Actividad enzimática

### **3.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

#### **3.3.1 Activación y adaptación del microorganismo en medio**

##### **CMC**

Durante esta etapa se llevó a cabo la reactivación y propagación del microorganismo. La reactivación y propagación del microorganismo se llevó a cabo en medio CMC 1% con un pH inicial de 7 e incubando a una temperatura de 45 °C.

El primer cultivo se realizó incubando en un matraz 250 ml con 40 (ml) de medio líquido CMC y 10 (ml) de inóculo con la temperatura y pH descritos anteriormente. Este cultivo se mantuvo por 6 días hasta observar una concentración constante de biomasa celular, proteínas totales y azúcares reductores.

**Preparación de la muestra:** Para la preparación de la muestra se tomaron del cultivo que se estaba adaptando muestras de aproximadamente 1ml en tubos eppendorf cada vez que se requirió realizar la evaluación, cada

muestra se centrifugó a 10 000 rpm por 7 minutos y se trabajó con el sobrenadante donde se encontraban las enzimas extracelulares celulolíticas.

#### **3.3.1.1 Curva de crecimiento**

En el caso del crecimiento celular se realizó mediante el recuento directo al microscopio de la muestra del sobrenadante (extracto enzimático), para ello se tomó con una micropipeta una suspensión de 10  $\mu$ L y se colocó e hizo el recuento en la cámara de Neubauer.

Primero se realizaron muestreos con intervalo de 1 hora desde la hora cero hasta la hora 6 y luego cada 12 horas. Se verificó la viabilidad sembrando en la hora 0 y en la hora final en agar CMC 1 % (Aguirre,2003).

Esta cámara tiene una profundidad de 0,1 mm y un área de cada cuadrado es de 0,0025 mm<sup>2</sup>. Para el conteo se seleccionan un determinado número de cuadrados pequeños. La concentración celular N se expresa en (cel/ml) a partir de la ecuación:

$$N = \sum X \times 25 \times 10^4$$

Donde  $\sum X$  es el promedio de células.

### **3.3.1.2 Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford**

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford, el cual se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 a las proteínas. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método tiene un rango de sensibilidad de 1-15  $\mu\text{g}$ .

La determinación de proteínas totales en la fase de adaptación se realizó por el método de Bradford, primero se estableció una curva patrón para la cual se preparó diferentes concentraciones de proteína de BSA y se hizo la lectura a 595 nm (Anexo 2).

**Medición de Proteínas:** En este caso se procedió a mezclar 100 uL de sobrenadante con 500 uL de Bradford en una cubeta de 1 ml y se procedió a esperar por unos minutos para la reacción.

Empleando un espectrofotómetro se leyó la absorbancia a 595 nm, usando como blanco una solución que contiene el reactivo de Bradford excepto la muestra que es reemplazada por agua destilada.

### **3.3.1.3 Determinación de glucosa por el método DNS**

La determinación de glucosa y azúcares reductores se realizó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa al ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico de color rojo previo calentamiento durante 10 minutos a 100 °C, cuya presencia se detectó por la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro determinada a través de una solución patrón de glucosa a diferentes longitudes de onda y empleando agua como blanco.

Luego se prepararon soluciones patrón de glucosa de diferentes concentraciones en un rango de 100 hasta 900  $\mu\text{g/ml}$  con el objeto de obtener la curva de calibración y así determinar con esta curva la concentración de glucosa formados por la degradación. (Anexo 3).

Pasos para determinación de glucosa (azúcares reductores)

Se tomó 250  $\mu\text{L}$  de muestra y se mezcló con 250  $\mu\text{L}$  de DNS.

Luego se homogenizó y se procedió a hervir en ebullición por 7 minutos.

Una vez pasado el tiempo se extrajo y se introdujo en agua fría, posteriormente se agregó 2500  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se homogenizó nuevamente.

Finalmente se leyó al espectrofotómetro a una absorbancia de 540nm.

#### **3.3.1.4 Actividad cualitativa de celulasas:**

Posteriormente se corroboró su reactivación en medios de agar CMC al 1% determinando su actividad cualitativa mediante los halos de hidrólisis, para ello se hicieron diluciones decimales del cultivo anterior de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$  para obtener colonias separadas, luego fueron sembradas en agar CMC que contenía 0,1 g de  $K_2HPO_4$ , 0,1 g de  $KH_2PO_4$ , 0,5 g de  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,5 g de  $CaCl_2$ , 2,5 g de extracto de levadura, 2,5 g de peptona universal, 10 g de carboximetilcelulosa (CMC), y 15 g de agar, todo esto a un pH 7. Después se incubó a 45 °C por 48 h.

Pasado este tiempo se sumergieron en lugol al 50 % por unos minutos para ver la formación de halos de hidrólisis, luego se extrajo el lugol y se vio al trasluz y se examinaron las colonias que presentaban una zona clara alrededor de la colonia bacteriana debido a su actividad celulolítica.

### **3.3.2 Cultivo y masificación a 45°C de la bacteria termófila**

Durante esta etapa se realizó una fermentación discontinua en dos matraces diferentes cada uno contenía un volumen de 1000 ml, se masificó guardándose la relación 1/5, para ello se transfirió 5 ml del primer cultivo a cada matraz con 25 ml medio CMC al 0,5 % y se incubaron a la temperatura de 45°C y pH inicial de 7 el tiempo para la incubación fue de 24 horas con su blanco correspondiente, pasado este tiempo se realizó un recuento mediante cámara de Neubauer, al alcanzar una población mayor de  $10^8$  células/ml se transfirió 20 ml de cultivo a otros 100 ml de medio y se volvieron a incubar a las temperaturas indicadas, posteriormente se realizó el mismo protocolo y se traspasó a un volumen de 500 ml, finalmente se llevó a un volumen de 1000ml, todo esto con aireación constante.

Al final se obtuvo un volumen total aproximado de 1 litro en cada matraz.

### **3.3.3. Evaluación de la degradación de celulosa en diferentes sustratos**

Para corroborar el efecto de la degradación del extracto enzimático producida por *Bacillus* sp. se trabajó con sustratos reales como hoja de geranio, tallos, papel y CMC para ver su efecto de degradación sobre esos sustratos.

Para ello se realizó un previo lavado, molido y respectivo autoclavado de las hojas, papel y tallo para evitar crecimiento bacteriano que afecte los resultados.

Se codificaron las repeticiones del geranio como A1, A2, A3 del tallo como B1, B2, B3 el papel como C1, C2, C3 y del CMC como D1, D2, D3 (Anexo 6). La evaluación consistió en poner en cada frasco pequeño codificado un volumen de 1 ml del buffer fosfato pH 7 y 0,5 ml del extracto enzimático y como fuente de carbono se colocaron los diferentes sustratos celulósicos, todo se incubó a una temperatura de 45°C por 24 horas. Se preparó una batería de blancos con las mismas codificaciones que contenían

sólo extracto enzimático. Así mismo se preparó los blancos respectivos de cada sustrato conteniendo solamente buffer fosfato y el sustrato.

#### **3.3.4 Purificación parcial de la enzima celulasa secretada por la bacteria termófila.**

Para realizar la purificación de nuestra enzima primero se tuvo que concentrarla, para ello tomamos el cultivo masificado restante el cual se separó en dos matraces de 1000 ml, luego se procedió a incubar a 45 °C por 48 horas con aireación constante con el objetivo de que se evapore medio líquido y a medida que transcurran los días se concentre más enzima, pasando este tiempo se procedió a centrifugar en tubos estériles por 10 minutos para eliminar bacterias y solamente quedarnos con el extracto enzimático.

Luego de esta evaporación el volumen restante fue menor, es por ello que se traspasó a matraces más pequeños de 500 ml y se procedió a realizar la evaporación de la misma forma incubando esta vez por 24 horas a 50°C con aireación constante.

Finalmente pasando este tiempo se procedió a seguir evaporando dependiendo del volumen restante entre 10 a 24 horas más, hasta finalmente obtener un volumen aproximado de 10 ml (Anexo 10).

Pasado esta concentración por evaporación se procedió a purificar la enzima con sulfato de amonio.

**Purificación: Método (De-Moraes *et al.*, 1998)**

Para la purificación parcial de la enzima se tomó el volumen final de la evaporación de 10 ml previamente filtrado y centrifugado.

En base a este volumen se calculó la cantidad de sulfato de amonio que se agregó al sobrenadante para alcanzar el 60 % de saturación de acuerdo a la tabla de saturación del sulfato de amonio (Anexo 4).

Luego se colocó el filtrado en un vaso de precipitado y se agregó lentamente el sulfato de amonio dejándose reposar por 30 minutos, luego se procedió a centrifugar por 20 minutos a 10 000 rpm.

Se guardó el pellet obtenido en refrigeración luego y se hizo la lectura del sobrenadante del centrifugado a fin de observar si existe una gran cantidad de proteínas (enzimas), se comprobó que aún existía una gran cantidad, por lo tanto se siguió concentrando más hasta un 90 % para lo cual se volvió a calcular la cantidad de sulfato de amonio necesaria para alcanzar una saturación del 90% de acuerdo al volumen restante del sobrenadante.

Se pesó la cantidad de sulfato de amonio necesaria y se agregó lentamente al sobrenadante, siguiendo el mismo procedimiento.

Se centrifugó por 10 minutos a 10 000 rpm. Luego se conservó el pellet y el sobrenadante en hielo.

Finalmente se resuspendió con la micro pipeta los pellets de los puntos en 1 /100 de volumen de cultivo de solución tampón tris-HCL 50 mM pH 7.

Posterior a estos pasos de purificación con sulfato de amonio se procedió a dializar la enzima mediante bolsas de diálisis para que por ósmosis se extraiga el sulfato de amonio y solo quede la enzima concentrada y purificada.

### **Preparación de las bolsas de diálisis:**

Se cortaron las bolsas de diálisis de un tamaño conveniente.

Luego se hirvieron las bolsas por 10 min en 500 ml de solución de bicarbonato de sodio al 2 % y EDTA 1  $\mu$ M.

Posteriormente se enjuagaron las bolsas con agua bidestilada.

Nuevamente se hirvieron las bolsas en un litro de agua con bicarbonato de sodio al 2 % y EDTA 1Mm (0,38g) durante 15 min, este procedimiento se realizó dos veces.

Se lavaron y enjuagaron las bolsas tres veces con agua bidestilada.

Nuevamente se hirvieron las bolsas por 10 min en agua bidestilada y finalmente se almacenaron las bolsas en agua bidestilada.

#### **Nota**

- Antes de usar las bolsas para realizar la diálisis, se realizó un lavado por dentro y por fuera con agua bidestilada.
- Se tuvo cuidado del manejo de las bolsas de diálisis con guantes.

(Fuente: Laboratorio de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México).

### **3.3.5 Determinación de Actividad celulasa.**

La actividad enzimática se determinó por espectrofotometría por el método Ghose (1987). La mezcla de reacción contenía 0,25 ml de carboximetilcelulosa como sustrato en buffer tampón fosfato a pH 7 y finalmente 0,25 ml de enzima, ambos se incubaron a 45 °C durante 30 min. Un control apropiado que contenía 0,25 ml de agua en lugar de extracto de enzima también se llevó a cabo junto con la prueba. Al final del período de incubación la reacción se detuvo por adición de 0,25 ml del reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico en cada tubo. Luego los tubos se incubaron durante 7 min en un baño de agua hirviendo, a medida que transcurría el tiempo se observó la aparición del color, pasando este tiempo se enfriaron rápidamente en agua fría. La actividad de la mezcla de reacción se midió contra un blanco de reactivo a 540 nm. La concentración de glucosa liberada por la enzima se determinó por frente a una curva patrón construida de manera similar con concentraciones conocidas de glucosa que comparó.

Los pasos del ensayo de actividad enzimática en medio líquido se detallan a continuación.

1. A 250  $\mu\text{L}$  de enzima se mezcló con 250  $\mu\text{L}$  de buffer pH 7al 1 % de CMC.
2. A tiempo 0 min se toma una alícuota de 125  $\mu\text{L}$  de la reacción. Se adicionó 125  $\mu\text{L}$  de DNS y se procedió a incubar a 100°C por 7 min.
3. Se incubó un par de minutos en hielo, y se agregó 1250  $\mu\text{L}$  de agua destilada.
4. Se leyó la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro
5. Se incubó la muestra restante a 45°C por 30 min.
6. Al tiempo de 30 min a 125  $\mu\text{L}$  de la reacción se adicionó 125  $\mu\text{L}$  de DNS y se procedió a incubar a 100°C por 7 min.
7. Se incubó un par de minutos en hielo, para luego agregar 1250  $\mu\text{L}$  de agua destilada
8. Se leyó la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro.  
Se calculó la actividad celulasa con la siguiente ecuación y la curva de calibración de DNS.

$$\text{Actividad} = \frac{(\text{Abs}_{30 \text{ min}} - \text{Abs}_{0 \text{ min}}) - n \times 1000/m}{t_{rx}} \quad (1)$$

En la formula n y m corresponden al intercepto y la pendiente de la curva de calibración respectivamente (Anexo 3) en equivalentes a mM de glucosa,  $t_{rx}$  al tiempo de duración de la reacción, y se multiplica por 1000 para obtener la actividad en  $\mu\text{moles}/(\text{min}\cdot\text{L})$  las actividades registradas se expresaron en U / ml.

Considerando la concentración de proteínas de cada muestra se calculó la actividad específica. La unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{Mol}$  de glucosa, desde el sustrato utilizado, por minuto, a  $45^{\circ}\text{C}$ , de la siguiente forma:

De esta forma la formula entrega el valor de Actividad Específica en [U/mg].

$$\text{Actividad Específica} = \frac{\text{Actividad}}{\text{Proteína Total}}$$

### 3.3.6 Determinación de parámetros cinéticos enzimáticos

Para la determinación de los parámetros cinéticos enzimáticos se realizó diferentes ensayos con la enzima parcialmente purificada.

#### a. Efecto del tiempo de reacción en la aparición de producto

Se preparó una batería de 5 tubos de ensayo con las siguientes características:

Se les añadió los reactivos según los volúmenes de la tabla 1, luego se agitaron suavemente e incubaron a 45°C en los tiempos indicados (Anexo 5).

Tabla 1. Resumen de los volúmenes aplicados para evaluar el efecto del tiempo de reacción en la aparición de producto.

Tubo N°	1	2	3	4	5	6
Tampón (uL)	500 (uL)	250 (uL)	250 (uL)	250 (uL)	250 (uL)	250 (uL)
Sustrato (uL)	250 (uL)	250 (uL)	250 (uL)	250 (uL)	250 (uL)	250 (uL)
Enzima (uL)	-----	250 (uL)	250 (uL)	250 (uL)	250 (uL)	250 (uL)
Agitar e incubar a 45° C						
Tiempo(min)	5	5	10	15	20	25

Fuente: Elaboración propia

A medida que se cumplieron los tiempos se retiró el tubo correspondiente y se añadió 250 uL de DNS a 250 uL de cada tubo mezclando las soluciones para detener la reacción. Luego se leyó la absorbancia a 540 nm.

**b. Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción.**

Se preparó una serie de 7 tubos de ensayo a los cuales se les añadió los distintos reactivos, obteniéndose así concentraciones crecientes de enzima en los mismos. Tras agitar suavemente se incubaron en el tiempo indicado.

Tabla 2: Resumen de los volúmenes aplicados para evaluar el efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción.

Tubo N°	1	2	3	4	5	6	7
Tampón(uL)	625(uL)	575(uL)	525(uL)	425(uL)	375(uL)	275(uL)	225(uL)
Sustrato(uL)	250(uL)	250(uL)	250(uL)	250(uL)	250(uL)	250(uL)	250(uL)
Enzima(uL)	-----	50(uL)	100(uL)	200(uL)	250(uL)	350(uL)	400(uL)
Agitar e incubar a 45° C							
Tiempo(min)	30 min						

Fuente: Elaboración propia

Cuando se cumplieron los 30 minutos de reacción, se retiraron los tubos del baño y se le añadió inmediatamente 125 uL de DNS a cada uno de ellos mezclando las soluciones para detener la reacción, posteriormente se midió la absorbancia a los distintos tubos a 540 nm usando el N° 1 como blanco.

#### **b.1 Representación de la velocidad de la reacción frente a la cantidad de enzima añadida.**

Para ello en primer lugar se hace un cálculo de la concentración de producto aparecido aplicando la misma expresión que en el apartado anterior:  $(A = \epsilon \cdot C \cdot l)$

A continuación se calcula la velocidad de la reacción en cada uno de los tubos (mM/min) por el aumento de producto en función del tiempo de incubación:  $V = [P]/t$

#### **c. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción.**

A una serie de tubos de ensayo se les añadió los reactivos correspondientes y se agitaron suavemente, obteniéndose de esta manera concentraciones crecientes de

sustrato en los mismos. Se introdujeron los tubos en la incubadora a 45 °C el tiempo indicado para que se desarrolle la reacción.

Al finalizar los 30 minutos de reacción, se retiraron los tubos del baño y se le añadió inmediatamente 125 uL de DNS a cada uno de ellos mezclando las soluciones para detener la reacción.

Se midió la absorbancia a los distintos tubos a 540 nm usando el tubo N° 1 como blanco.

Concentración del sustrato CMC: 0,5%

Tabla 3. Resumen de los volúmenes aplicados para evaluar el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción.

Tubo N°	1	2	3	4	5	6
Tampón(uL)	600 (uL)	540 (uL)	480 (uL)	400 (uL)	200 (uL)	-----
Sustrato(uL)	0 (uL)	60 (uL)	120 (uL)	200 (uL)	400 (uL)	600 (uL)
Enzima(uL)	-----	100 (uL)	100 (uL)	100 (uL)	100 (uL)	100 (uL)
Agitar e incubar a 45°C						
Tiempo(min)	30 min					

Fuente: Elaboración propia

**c.1 Representación de la velocidad frente al cociente  $v/[S]$ .  
(Representación de Eadie-Hofstee)**

Se trasladaron los datos experimentales obtenidos y se efectuaron los cálculos correspondientes, obteniendo la Velocidad y el cociente  $v/[S]$  la cual se representó gráficamente.

**c.2 Representación de  $1/V$  frente a  $1/[S]$  (Representación de Lineweaver-Burk).**

Representación de Lineweaver-Burk representa los inversos de velocidad  $1/v$  frente a los inversos de los sustratos  $1/s$  y permitiendodeterminar a partir de medidas experimentales parámetros básicos de la cinética enzimática como el  $K_m$  y la velocidad máxima de reacción, por tanto, trasladaron los valores experimentales obtenidos y se efectuaron los cálculos correspondientes representándose gráficamente.

### **3.3.7 Caracterización enzimática de la enzima celulasa producida por *Bacillus sp.* a diferentes valores de pH y Temperatura.**

Se determinó el efecto de la temperatura y del pH sobre la actividad enzimática. El ensayo de actividad se realizó a diferentes temperaturas y distintos valores de pH para ello se tomaron tres temperaturas de 25°C ,45°C y 80°C y se interactuaron con valores de pH de 5, 7 y 10 respectivamente todos los experimentos con tres repeticiones.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Activación y adaptación del microorganismo en medio CMC

La activación y adaptación de la cepa se realizó en medio CMC al 1 %, a la temperatura de 45 °C y pH inicial 7. El inóculo empleado (10ml) provino de una muestra almacenada por dos meses en medio CMC (Anexo 1) a 4°C, el cual se aisló e identificó como *Bacillus* sp. en una investigación realizada anteriormente. Al observar al microscopio la cepa del medio de cultivo, se observaron microorganismos móviles, con forma de bacilos. Esta observación se complementó con una tinción Gram la cual nos mostró que la bacteria era Gram positiva como podemos ver en la Figura 11

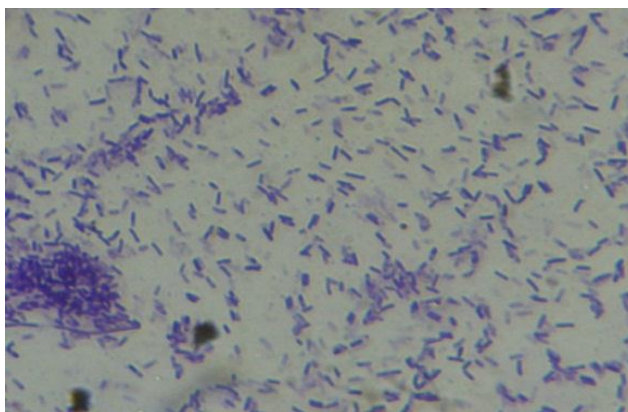


Figura 11:Fotografía que muestra una imagen al microscopio de *Bacillus* sp.coloreada mediante tinción Gram, observada por el aumento del objetivo de inmersión de 100 x.

#### 4.1.1. Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de la adaptación de *Bacillus* sp.se realizó por triplicado, dándonos una desviación estándar de 1,61 y un coeficiente de variación del 8,2% lo cual nos indica que existe ligera variación en la tasa de crecimiento a través de los días. Los resultados se observan en la Figura 12.

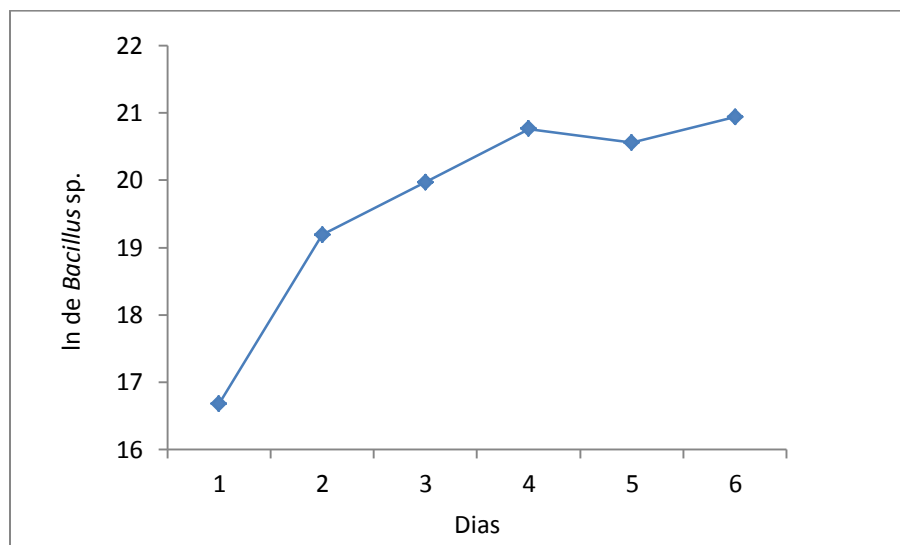


Figura 12: Cinética de crecimiento celular en medio CMC a 45 °C y pH 7.

Fuente: Elaboración propia

Se observa en la Figura 12 que el cultivo incubado a 45°C y pH 7 a partir de aproximadamente las 24 horas parte hacia su fase exponencial dando una concentración elevada de biomasa celular al cuarto día. Se observa un ligero decaimiento de la población al quinto día pero al sexto día la población se mantiene constante, esto nos indica que nuestra cepa ya se encuentra adaptada y lista para masificarla.

#### 4.1.2. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas totales se representa en la tabla 4, podemos ver las lecturas de las tres repeticiones y su promedio respectivo, dándonos una mayor producción de proteínas a las 48 horas.

Tabla 4. Producción de proteínas Totales.

T°	45 °C				
Fecha	Absorbancia 1 Repetición	Absorbancia 2 Repetición	Absorbancia 3 Repetición	Promedio Absorbancias	Proteínas Totales ug/ml
11/03/2014	0,08	0,08	0,09	0,08	4,77
12/03/2014	0,34	0,327	0,330	0,3335	102,27
13/03/2014	0,444	0,694	0,454	0,569	192,85
14/03/2014	0,407	0,384	0,405	0,3955	126,12
15/03/2014	0,372	0,357	0,360	0,3645	114,19
16/03/2014	0,291	0,319	0,310	0,305	91,31

Fuente: Elaboración propia

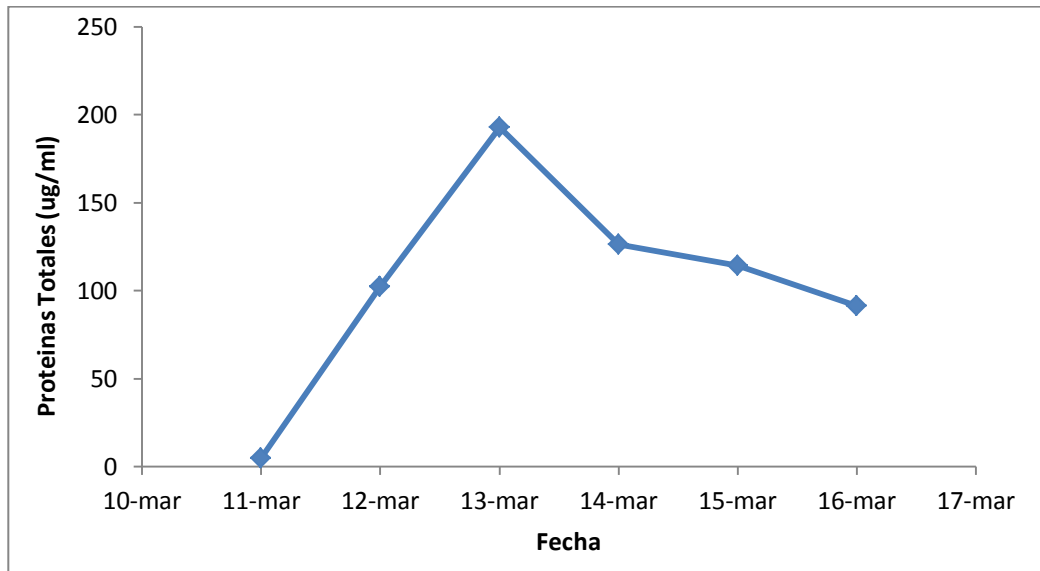


Figura 13: Producción de proteínas totales vs días de incubación la desviación estándar de las réplicas fue de 0,11 y el coeficiente de variación de 28,8%.

Fuente: Elaboración propia

En la figura 13 podemos ver con mayor claridad que a partir de las 48 horas existe una mayor producción de proteínas y a partir de las 72 horas va disminuyendo.

#### 4.1.3. Determinación de azúcares reductores por el método DNS

##### *Curva patrón de Azúcares reductores*

Se preparó una batería de 9 tubos de ensayo conteniendo diferentes concentraciones de Glucosa, a las cuales se le midió los azúcares reductores con DNS a una absorbancia de 540 nm.

Para determinar la producción de azúcares reductores en la activación y adaptación de la cepa celulolítica *Bacillus* sp.se realizó conjuntamente con la lectura de proteínas y biomasa celular para ver cuánto es lo máximo de azúcares reductores que producía, dándonos los siguientes resultados en la tabla 5.

Tabla 5: Producción de azúcares reductores a 45 °C.

T°	45 °C				
Fecha	Absorbancia 1 Repetición	Absorbancia 2 Repetición	Absorbancia 3 Repetición	Promedio Absorbancias	Producto (ug/ml)
11/03/2014	0,08	0,08	0,09	0,08	0,229
12/03/2014	0,16	0,14	0,15	0,15	0,463
13/03/2014	0,262	0,265	0,265	0,264	0,843
14/03/2014	0,205	0,214	0,211	0,21	0,663
15/03/2014	0,22	0,242	0,232	0,231	0,733
16/03/2014	0,134	0,247	0,192	0,191	0,599

Fuente: Elaboración propia

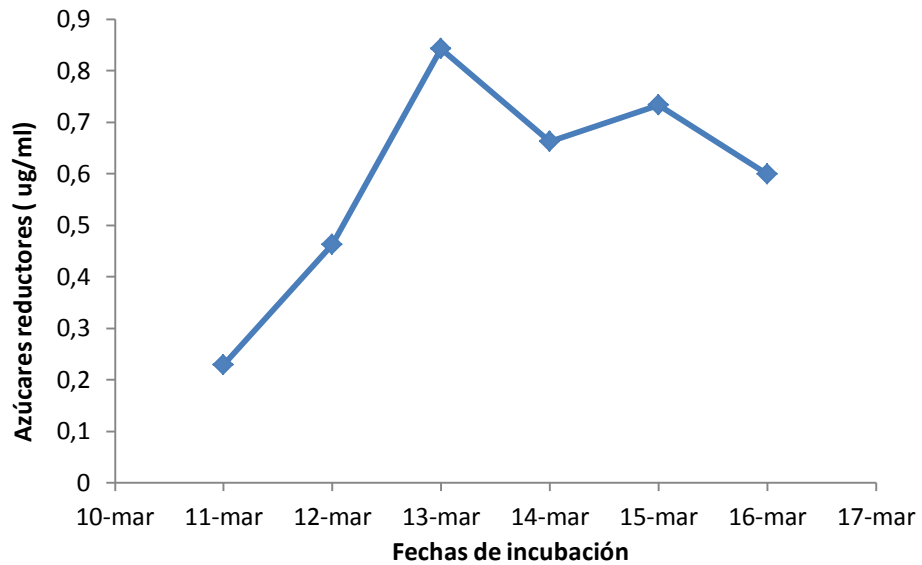


Figura 14: Gráfica de producción de azúcares reductores vs días de incubación con una desviación estándar de 0,15 y un coeficiente de variación de 1,8%.

Fuente: Elaboración propia

En la figura 14 observamos que de la misma forma que las proteínas totales que a las 48 horas existe una producción elevada de azúcares reductores y a partir de las 72 horas empieza a declinar.

#### **4.1.4. Actividad cualitativa de celulasa**

La Actividad cualitativa de celulasa se determinó mediante los halos de hidrólisis en agar CMC al 1 % de Carboximetilcelulosa.

Con esta técnica comprobamos que nuestra cepa esta activada y adaptada nuevamente al medio con celulosa CMC (Anexo 1).

La técnica de zona clara en medio de Carboximetilcelulosa exhibe cualitativamente la habilidad de las cepas para producir celulasas dado a que el Lugol presenta fuertes interacciones con polisacáridos unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 así como significantes interacciones con  $\beta$ -1,3-D-glucanos, al producirse la hidrólisis de estos compuestos las interacciones entre el colorante y los polisacáridos se pierden, perdiéndose a su vez la coloración en el halo correspondiente al área en el que la bacteria secretó las celulasas, el diámetro del halo es equivalente al potencial celulolítico del microorganismo (Fooladi, 2009), en función a lo anterior luego de 48 horas de desarrollo de las cepas. Como se puede observar en la (Figura 15) se encontró que la mejor en

producción de celulasas en sustrato sólido es nuestra cepa aislada.

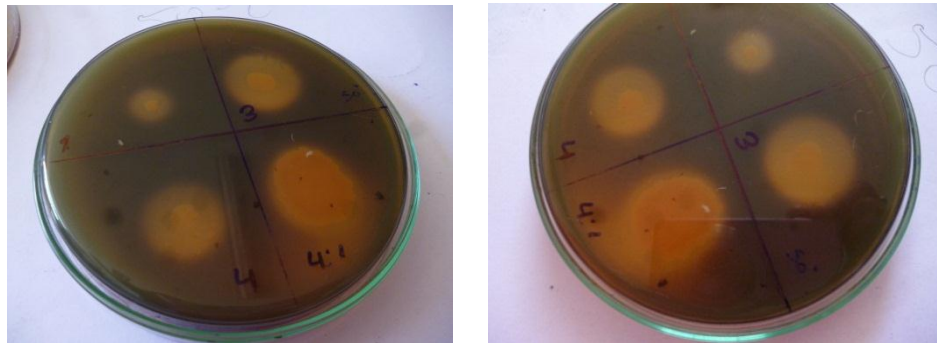


Figura 15:Fotografía que muestra las placas de Agar CMC en donde se puede apreciar los halos de hidrólisis. Este experimento se realizó sumergiendo las colonias de *Bacillus* sp.en lugol al 50% por unos minutos, luego se extrajo el lugol y se pudieron observar los halos de hidrólisis.

Fuente: Elaboración propia

#### 4.2. Cultivo y masificación a 45°C de la bacteria termófila

El cultivo y masificación de *Bacillus* sp. a un volumen final de 2000 ml se realizó en un total 7 días a un pH de 7 y 45°C de incubación en dos diferentes matraces, para ello primeramente, en cada matraz se tomaron inóculos de 5 ml del primer cultivo activado y adaptado y se

mezclaron con 25 ml de medio CMC al 0,5% ,en dos matraces de 250 ml estos cultivos fueron monitoreados diariamente analizando el crecimiento celular mediante recuento por cámara de Neubauer, una vez obtenida una concentración celular de  $10^8$  cel/ml se procedió a masificar guardando la proporción 1/5, para alcanzar esta población celular tomó 3 días de incubación, posteriormente se procedió a masificar estos 500 ml de medio hasta un volumen final de 1000 ml, se realizó el mismo protocolo una vez más hasta que finalmente obtuvimos un volumen total de 2 litros.

#### **4.3. Evaluación de la degradación de celulosa a diferentes sustratos**

En este ensayo se evaluó principalmente la capacidad del extracto enzimático sin purificar para actuar en diferentes sustratos celulósicos como hojas de geranio, tallos de geranio, papel y Carboximetilcelulosa para corroborar su actividad celulolítica (Anexo 6).

Para realizar este ensayo primero se centrifugo a 10 000 rpm el cultivo masificado para separar las bacterias del extracto enzimático extracelular, las bacterias quedaron precipitadas en el fondo del tubo y las enzimas extracelulares quedaron en el sobrenadante.

De los cuatro sustratos que se probaron para llevar a cabo la evaluación de la enzima, en tres se observaron que presentaban elevados azúcares reductores en el punto inicial, estos sustratos fueron los de las hojas de geranio, el papel y en gran medida el del tallo, los datos experimentales los tenemos en la Tabla 6 y lo podemos ver más claramente en la Figura 16.

Tabla 6:Tabla de evaluación a diferentes sustratos celulolíticos

Sustratos	Absorbancias		Diferencia	Producto (mg/ml)
	T:0 min	T:24 horas		
Hoja de geranio (A1)	0,157	0,228	0,071	0,199
Hoja de geranio (A2)	0,263	0,305	0,042	0,103
Hoja de geranio (A3)	0,255	0,28	0,025	0,046
Promedio	0,225	0,271	0,046	0,116
Papel (c1)	0,144	0,151	0,007	-0,013
Papel (c2)	0,217	0,251	0,034	0,076
Papel (c3)	0,17	0,237	0,067	0,186
Promedio	0,177	0,213	0,036	0,083
Tallo de geranio (B1)	0,379	1,443	1,064	3,509
Tallo de geranio (B2)	0,363	1,384	1,021	3,366
Tallo de geranio (B3)	0,29	1,389	1,099	3,623
Promedio	0,344	1,405	1,061	3,499
CMC (D1)	0,028	0,205	0,177	0,553
CMC (D2)	0,039	0,222	0,183	0,573
CMC (D3)	0,038	0,244	0,206	0,649
Promedio	0,035	0,224	0,189	0,593

Fuente: Elaboración propia

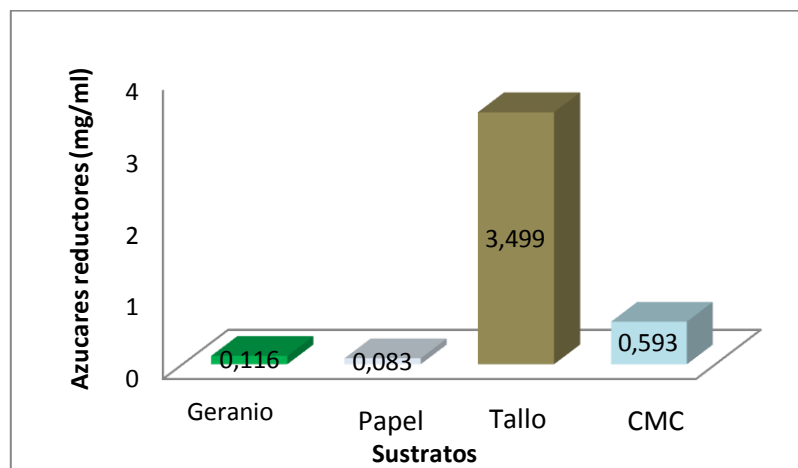


Figura 16 Diagrama de barras del experimento de producción de azúcares reductores a diferentes sustratos celulósicos.

Fuente: Elaboración propia

#### 4.3.1 Análisis de los resultados a partir de la evaluación de sustratos

En la evaluación de sustratos se aplicó un Análisis de varianza (Anova) de un factor con tres repeticiones, en donde el sustrato fue nuestro factor y la producción de azúcares reductores nuestra variable dependiente.

El análisis estadístico de los datos obtenidos durante la prueba experimental se realizó, utilizando el programa estadístico SPSS versión 21.

Tabla 7: Análisis de producción de azúcares reductores

R \ S	s1	s2	s3	s4
1	0,199	0	3,509	0,553
2	0,103	0,076	3,366	0,573
3	0,046	0,186	3,623	0,649

Fuente: Elaboración propia

R: Repeticiones

S: Sustratos

s1: Hojas de Geranio

s2: Papel

s3: Tallos de Geranio

s4: CMC

Antes de aplicar la prueba del Análisis de varianza, por ser nuestro diseño experimental una prueba paramétrica se aplicó la prueba de normalidad y homocedasticidad de las varianzas.

Tabla 8: Prueba de normalidad de evaluación de sustratos celulolíticos.

Prueba de normalidad	
Z de Kolmogorov-Smirnov	1,257
Sig. asintótica (bilateral)	0,08476

Fuente: Programa SPSS

En la tabla 8 podemos ver que la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov nos da una significancia de 0,08476 lo cual es mayor a 0,05; por lo tanto podemos decir que nuestros datos experimentales presentan una distribución normal.

Tabla 9: Prueba de homocedasticidad de sustratos celulolíticos.

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Estadístico de Levene	gl <sub>1</sub>	gl <sub>2</sub>	Sig.
0,616	3	8	0,624

Fuente: Programa SPSS

En la tabla 9 se aplicó la prueba de homocedasticidad para determinar la igualdad de las varianzas entre los diferentes

valores dados de los sustratos aplicados, vemos que el nivel crítico de significancia es de 0,624 por lo tanto es mayor a 0,05 que es nuestro nivel de significancia con la que estamos trabajando; por lo tanto afirmamos que nuestros datos presentan igualdad entre sus varianzas.

Tabla 10: Análisis de varianza de diferentes sustratos celulósicos con tres repeticiones

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F <sub>c</sub>	F tabla		Sig.
Tratamientos	3	24,0184849	8,00616163	945,46075	4,0661805	7,59099195	0,000
Error experimental	8	0,067744	0,008468		(0,05)	(0,01)	
TOTAL	11	24,0862289					

Fuente: Programa SPSS

En el Tabla 10 se observa el análisis de varianza de los diferentes sustratos como Papel, hojas, tallos y CMC, vemos que nuestro  $F_c$  es 945,460751 por lo tanto es superior a los valores de F tabla para significancias del (0,05) y (0,01) los cuales son 4,06618055 y 7,59099195 respectivamente, además se observa que el valor p de la significancia es menor a 0,05 por lo tanto la diferencia de medias entre al menos dos sustratos es altamente significativo por lo cual tenemos que estudiar entre qué niveles se dan esas diferencias por ello posteriormente se realizó las diferencias mínimas significativas.

Tabla 11: Prueba de Tukey con programa SPSS 21

	(I) Sustratos	(J) Sustratos	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
HSD de Tukey	Hojas de Geranio	Papel	0,028667	0,075135	0,980
		Tallos	-3,383333*	0,075135	0,000
		CMC	-0,475667*	0,075135	0,001
	Papel	Hojas	-0,028667	0,075135	0,980
		Tallos	-3,412000*	0,075135	0,000
		CMC	-0,504333*	0,075135	0,001
	Tallos de Geranio	Hojas	3,383333*	0,075135	0,000
		Papel	3,412000*	0,075135	0,000
		CMC	2,907667*	0,075135	0,000
	CMC	Hojas	0,475667*	0,075135	0,001
		Papel	0,504333*	0,075135	0,001
			Tallos	-2,907667*	0,075135

Vemos que la significancia en estos dos grupos son iguales por eso le atribuimos un mismo valor "c"

Le atribuimos valor "a"

Le atribuimos valor "b"

(\*La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05)

Fuente: Programa SPSS

Interpretación: En la siguiente tabla 11 nos muestra la prueba de Tukey en donde se compara cada uno de los grupos con el resto de grupos.

Podemos observar que las hojas de Geranio con el Papel su significación 0,980 es mayor que 0,05 con una diferencia de media de 0,028; por lo tanto significa que entre estos dos grupos no hay diferencias.

En la comparación del tallo con todos los demás sustratos todas sus significancia son de 0,000, menor a 0,05 entonces se concluye que existe diferencia entre estos grupos con diferencia de medias de 3,383333; 3,412000 y 2,907667.

En la comparación del CMC con los sustratos vemos que también existen diferencias de medias de 0,475667; 0,504333, y sus significancias son menores a 0,05 por lo tanto también difieren. Podemos resumir las comparaciones de las medias en la tabla 12 según el orden de mérito.

Tabla 12: Prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) para los diferentes sustratos según su orden de mérito de las medias.

O.M	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICACION
1°	S3	3,49933333	a
2°	S4	0,59166666	b
3°	S1	0,116	c
4°	S2	0,08733333	c

(a), (b), (c) las letras diferentes muestran diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ )

Fuente: Elaboración propia

La prueba de comparación de Tukey confirmó la existencia de diferencias estadísticas significativas ( $\alpha= 0,05$ ) en el sustrato 3 (Tallo) y en el sustrato 4 (CMC). Sin embargo, el tallo presenta una gran significancia ya que como se pudo observar sus azúcares reductores eran demasiado elevados en un inicio, se deduce que esto es debido a una interferencia y sobreacumulación de azúcares en la estructura del tallo de geranio debido a su función de reserva.

Por otro lado, no se presentaron diferencias significativas en los sustratos 1 y 2 que corresponden al papel y tallo respectivamente por ser sus medias aproximadamente similares.

Ya que los datos presentan una distribución normal es que en la Figura 17 se representó mediante el gráfico de barras de error las diferencias entre los promedios de producción de azúcares reductores entre los distintos sustratos. Vemos claramente que hay una distribución que está muy arriba que no traslapa con ninguno de los otros sustratos esto pertenece a la distribución del tallo, seguida de la del CMC y los restantes sustratos son casi similares.

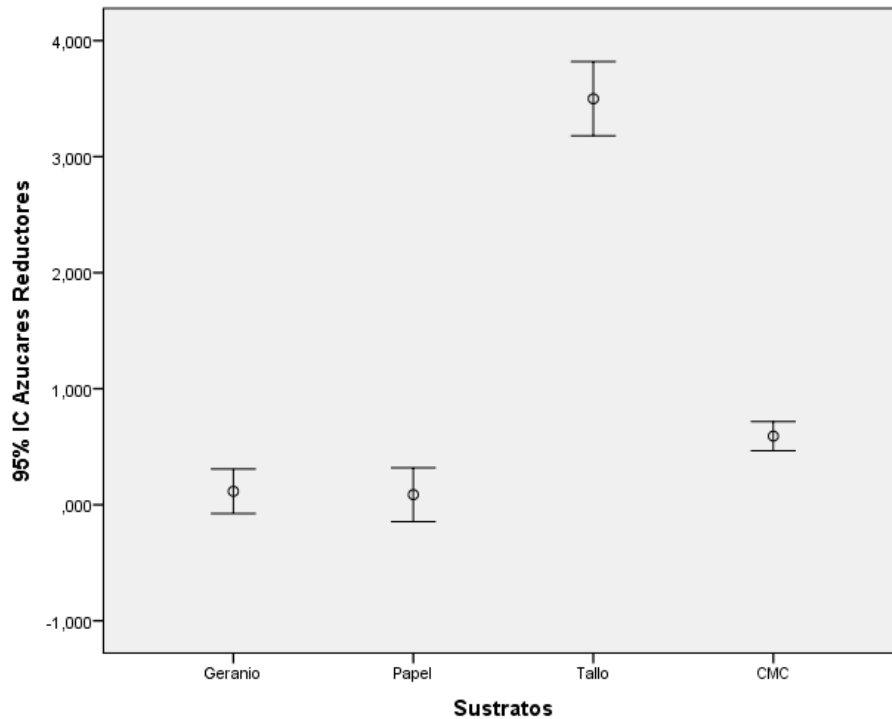


Figura 17: Diagrama de barras de error de los diferentes sustratos

Fuente: Programa SPSS

#### 4.4. Purificación parcial de la enzima celulasa secretada por la *Bacillus* sp.

El perfil de la purificación de la celulasa extracelular producida por *Bacillus* sp. se dio en diferentes pasos los cuales están detallados en las Tablas 13, 14, 15, 16, todo esto lo resumimos en la tabla 17.

Primeramente en la tabla 13 podemos ver la lectura de actividad enzimática específica y proteínas totales del extracto crudo el cual se había masificado, vemos que existe una actividad enzimática baja de 0,027 U/ml y una concentración de proteínas totales de 0,04592 mg/ml, finalmente la relación entre estos dos valores nos lleva a obtener nuestra actividad específica que es de 0,58 U/mg.

Tabla 13: Lectura de Actividades específicas extracto crudo.

Lectura de DNS (3 repeticiones)	Lectura de Bradford (3 repeticiones)
0,051 nm	0,185 nm
0,059 nm	0,189 nm
0,058 nm	0,180 nm
Actividad enzimática	Proteínas totales
<b>0,027 U/ml</b>	<b>0,04592 mg/ml</b>
Actividad específica = <b>0,58 U/mg</b>	

Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente se realizó la concentración mediante la precipitación con sulfato de amonio al 60 % de acuerdo a la tabla de saturación para 10 ml se le agregó 3,61 g de sulfato amonio, dándonos precipitados de color marrón oscuro en los tubos eppendorf de 1 ml (Anexo 7), cualitativamente vemos que existe poca precipitación de enzima por lo tanto lo llevamos a una concentración final del 90 % agregando 2,1 g de sulfato de amonio (Anexo 8)

De los precipitados concentrados de los tubos eppendorf se midieron su actividades enzimáticas pero nos dio muy elevada por encima de la curva de calibración por lo tanto se hizo diluciones de hasta  $10^{-2}$  con la cual trabajamos, dándonos una actividad enzimática de 13,6 U/ml y una concentración de proteínas totales 2,5 mg/ml, la relación de ambas nos dio la actividad específica que fue de 5,44 U/mg como podemos apreciar en la tabla 14.

Tabla 14: Lectura de Actividades específicas del concentrado con Sultafo de amonio al 90%.

Lectura de DNS (3 repeticiones)	Lectura de Bradford (3 repeticiones)
Concentrado puro:1,836/1,834/1,835 Dilución $10^{-1}$ : 0,626 / 0,633/0,630 Dilución $10^{-2}$ :0,225 / 0,227/0,226	Concentrado puro:1,840/1,839/1,838 Dilución $10^{-1}$ :0,471/ 0,480/0,478 Dilución $10^{-2}$ :0,135/0,132/0,134
Actividad enzimática	Proteínas totales
<b>13,6 U/ml</b>	2534,61 ug/ml = <b>2,5 mg/ml</b>
Actividad específica = <b>5,44 U/mg</b>	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 15: Lectura de Actividades específicas del Dializado.

Lectura de DNS (3 repeticiones)	Lectura de Bradford (3 repeticiones)
Concentrado puro:1,333/ 1,327 Dilución $10^{-1}$ : 0,413/ 0,398/ Dilución $10^{-2}$ : 0,102/ 0,107/0,105	Puro dializado: 1,588 nm Dilución $10^{-1}$ : 0,401/ 0,418/0,410
Actividad enzimática	Proteínas totales
<b>5,9 U/ml</b>	<b>1,3 mg/ml</b>
Actividad específica = <b>4,54 U/mg</b>	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 16: Lectura de Actividades específicas de la lectura del sobrenadante.

Lectura de Bradford (3 repeticiones)
Lectura : 1,158; 1,162 nm
Dilución 10 <sup>-1</sup> : 0,314 nm / 0,309 nm / 0,310 nm
Dilución 10 <sup>-2</sup> : 0,092 nm /0,098 nm /0,097nm

Podemos ver en la tabla 16 que en esta etapa aún existe una concentración elevada de proteínas (enzimas) en el sobrenadante, lo cual nos indica que se puede concentrar aún más con otros métodos de concentración más sofisticados como una ultrafiltración (Anexo 9).

Tabla 17: Tabla resumen de la purificación parcial de la enzima.

Etapa de Purificación	Volumen (ml)	Actividad Enzimática (U/ml)	Proteínas Totales (mg)	Actividad Especifica (U/mg)
Extracto Crudo	2000	0,027	0,04592	0,58
Sulfato de Amonio	20	13,6	2,5	5,44
Díálisis	5	5,9	1,3	4,54

Fuente: Elaboración propia.

Podemos ver en la tabla resumen 17 las actividades de nuestra enzima, vemos que al momento de la concentración con sulfato de amonio se incrementa la actividad llegando a 13,6 unidades

internacionales (UI) por mililitro, luego de la diálisis esta actividad se reduce hasta 5,9 U/ml

Pero en términos de actividad específica vemos que hay una variación ya que su actividad disminuye de 5,44 a 4,54 unidades internacionales de enzima por miligramo de proteína (UI/mg de proteína) lo cual nos indica que no hubo mucha pérdida de enzima si no simplemente había una sobreacumulación de otras sustancias proteicas mediante la adición del sulfato de amonio.

#### **4.5. Determinación de parámetros cinéticos enzimáticos**

Para la determinación de los parámetros cinéticos se utilizó la enzima dializada con una actividad de 5,9 U/ml.

### a. Efecto del tiempo de reacción en la aparición de producto

Tabla 18: Efecto del tiempo de reacción en la aparición de producto

Tubo N°	Tiempo (min)	Absorbancias (540 nm)			
		1 repetición	2 repetición	3 repetición	Promedio Abs
1	0	0	0	0	0
2	5	0,048	0,046	0,047	0,047
3	10	0,05	0,061	0,055	0,0555
4	15	0,062	0,06	0,061	0,061
5	20	0,055	0,067	0,062	0,061
6	25	0,062	0,062	0,063	0,0625
7	30	0,05	0,073	0,061	0,0615

Fuente: Elaboración propia.

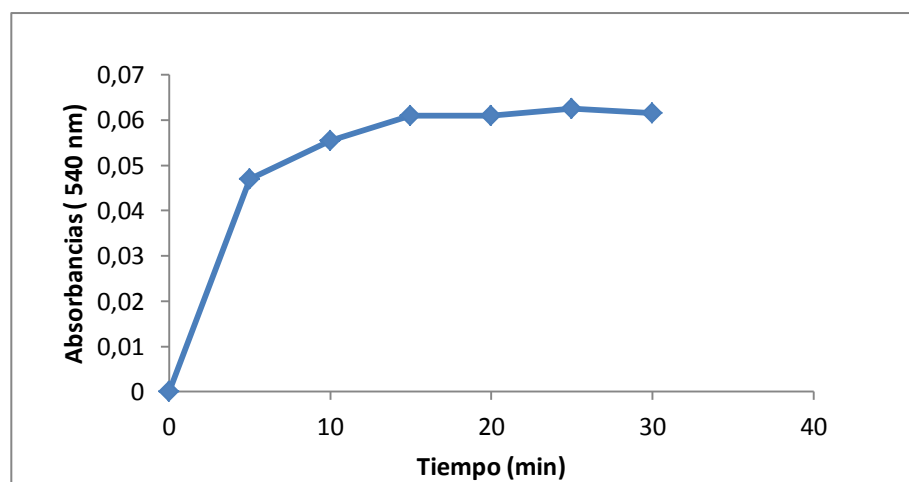


Figura 18: Efecto del tiempo de reacción

Fuente: Elaboración propia.

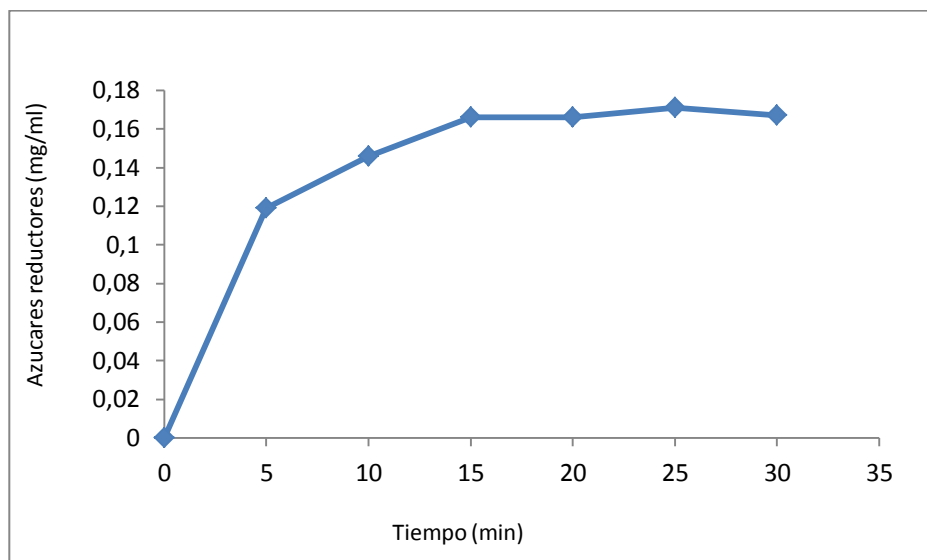


Figura 19: Representación del progreso de reacción: aparición de producto frente al tiempo de reacción.

Fuente: Elaboración propia.

**Calculo de la velocidad inicial:**

$$V_i = \text{tg } \alpha = b/a$$

$$X_2 = 0,0555 \text{ nm}$$

Equivale a 0,832 mM de Glucosa

$$X_1 = 0,047 \text{ nm}$$

Equivale a 0,68 mM de Glucosa

$$T_2 = 10 \text{ min}$$

$$T_1 = 5 \text{ min}$$

Calculamos la  $V_i$ :

$$V_i = 0,832 \text{ mM} - 0,68 \text{ mM} / 10-5$$

$$V_i = 0,03 \text{ mM/min} = 0,0054 \text{ mg/ml.min}$$

**b. Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción.**

Tabla 19: Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción.

Tubo N °	Enzima(uL)	CMC (uL)	Absorbancias (540 nm)			Promedio Abs	Producto(mg/ml)
			1 Repetición	2 Repetición	3 Repetición		
1	0	250	0	0	0	0	0
2	50	250	0,01	0,011	0,0104	0,0105*	-0,002*
3	100	250	0,015	0,015	0,017	0,016*	0,016*
4	200	250	0,026	0,0254	0,025	0,0255*	0,048*
5	250	250	0,056	0,057	0,055	0,056	0,149
6	350	250	0,071	0,072	0,072	0,0715	0,201
7	400	250	0,098	0,097	0,098	0,0975	0,288

Fuente: Elaboración propia.

(\*) Absorbancias por debajo de la curva patrón

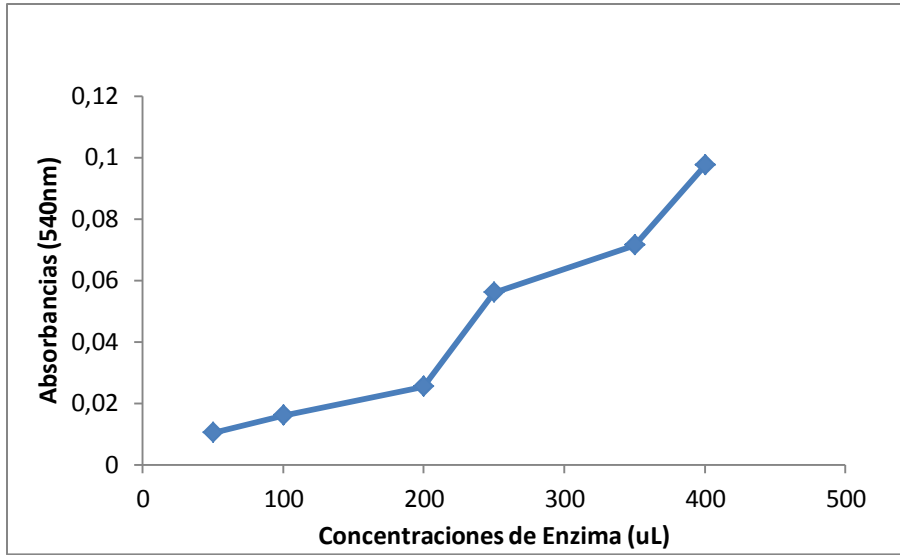


Figura 20: Representación de absorbancias vs concentraciones de enzima.

Fuente: Elaboración propia.

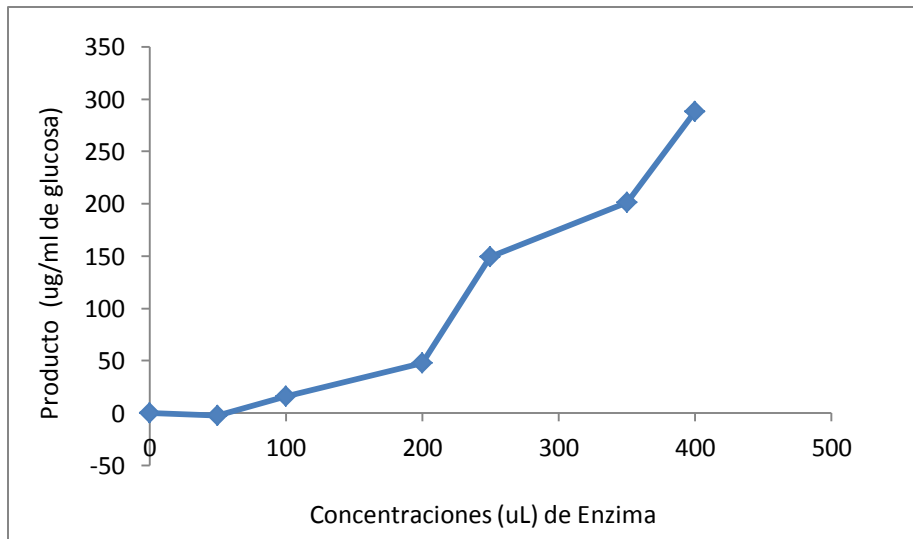


Figura 21: Representación de producto vs concentraciones de enzima.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 20: Representación de la velocidad de la reacción frente a la cantidad de enzima añadida.

Tubo	Enzima(uL)	Absorbancias	Producto(mg/ml)	velocidad (mg/ml.min)
1	50	0,0105	-0,002	$-6,66667 \times 10^{-5}$
2	100	0,016	0,016	0,000533333
3	200	0,0255	0,048	0,0016
4	250	0,056	0,149	0,004966667
5	350	0,0715	0,201	0,0067
6	400	0,0975	0,288	0,0096

t : 30 min

Fuente: Elaboración propia.

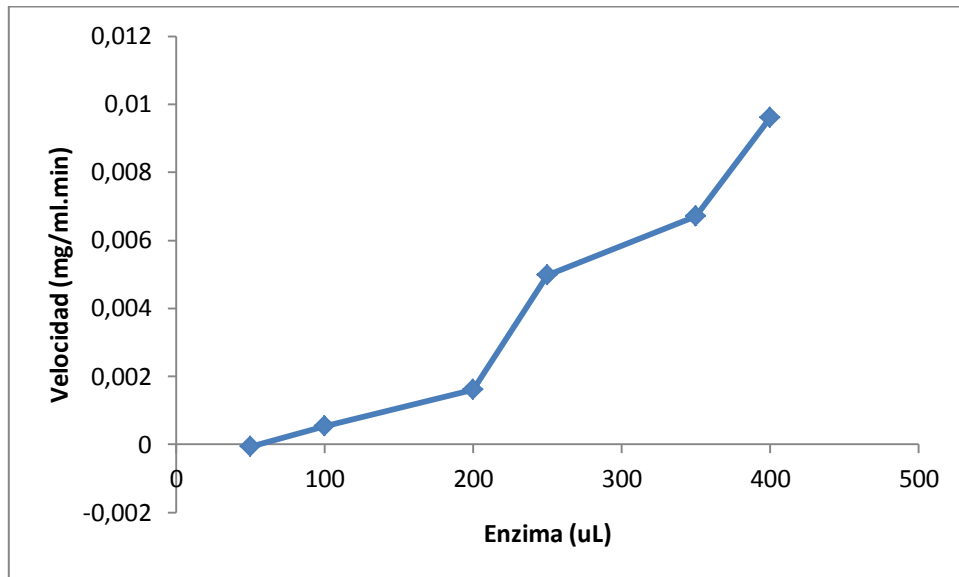


Figura 22: Representación de la velocidad frente a la concentración de enzima.

Fuente: Elaboración propia.

**c. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción.**

Tabla 21: Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción

Tubo N°	Sustrato(uL)	Sustrato (mg/ml)	Absorbancias (540 nm)			Promedio Abs	Producto(mg/ml)
			1 Repetición	2 Repetición	3 Repetición		
Tubo 1	0	0	0	0	0	0	0
Tubo 2	60	1,1mg/ml	0,053	0,052	0,054	0,053	0,139
Tubo 3	120	2,5 mg/ml	0,06	0,043	0,053	0,052	0,136
Tubo 4	200	3 mg/ml	0,088	0,043	0,067	0,066	0,183
Tubo 5	400	6 mg/ml	0,073	0,076	0,076	0,075	0,213
Tubo 6	600	10 mg/ml	0,103	0,101	0,102	0,102	0,303

Fuente: Elaboración propia.

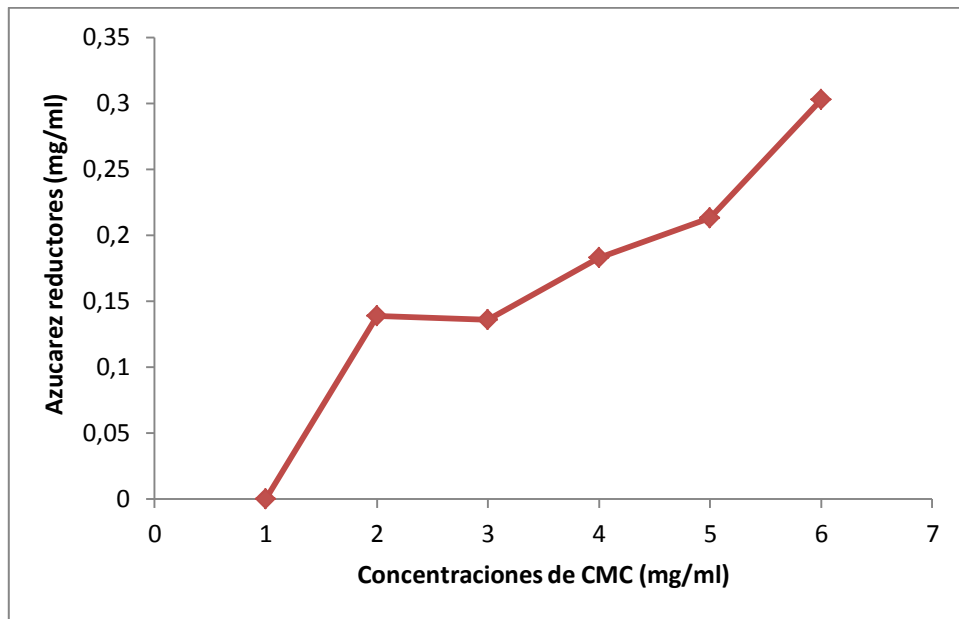


Figura 23: Representación de azúcares reductores vs la concentración de sustrato.

Fuente: Elaboración propia.

**c.1 Representación de la velocidad frente al cociente  $v/[S]$ . (Representación de Eadie-Hofstee)**

Tabla 22: Representación de la velocidad frente al cociente  $v/[S]$

Tubo N°	Sustrato (uL)	Sustrato (mg/ml)	Absorbancias (540 nm)			Promedio Abs	Producto (µg/ml)	t:25 min	
			1 Rep.	2 Rep.	3 Rep.			Velocidad (mg/min.ml)	velocidad/S
Tubo 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubo 2	60	1,1mg/ml	0,053	0,052	0,053	0,0525	137,66	0,00556	0,005054
Tubo 3	120	2,5 mg/ml	0,06	0,043	0,052	0,0515	134,33	0,00544	0,002176
Tubo 4	200	3 mg/ml	0,088	0,043	0,066	0,0655	181	0,00732	0,00244
Tubo 5	400	6 mg/ml	0,073	0,076	0,075	0,0745	211	0,00853	0,00142
Tubo 6	600	10 mg/ml	0,103	0,101	0,102	0,102	302,66	0,01212	0,001212

Fuente: Elaboración propia.

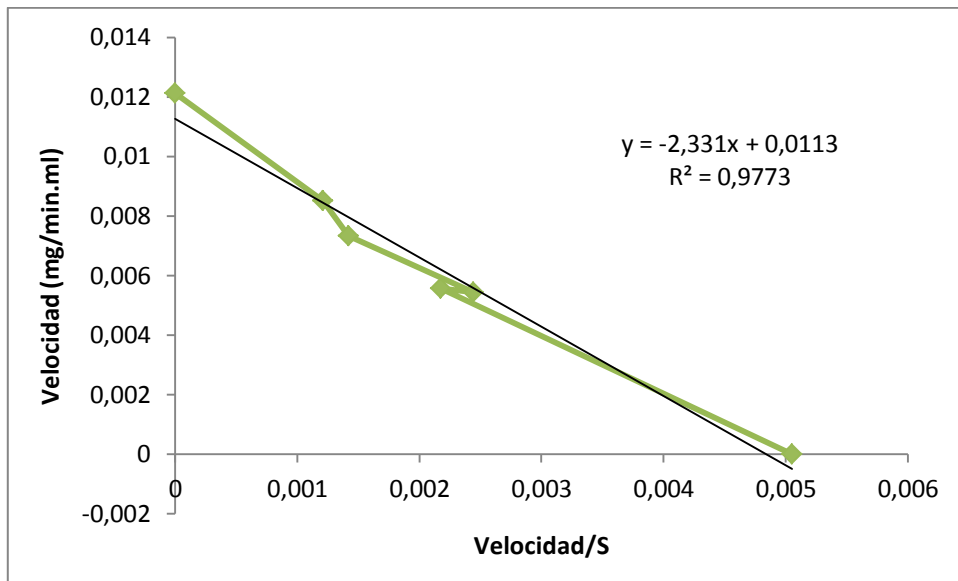


Figura 24: Representación de Eadie-Hofstee: Velocidad frente al cociente  $V/[S]$

Fuente: Elaboración propia.

**c.2 Representación de 1/V frente a 1/[S] (Representación de Lineweaver-Burk).**

Tabla 23: Representación de Lineweaver-Burk

Tubo	Sustrato (mg/ml)	Producto (mg/ml)	Velocidad (mg/ml.min)	1/V	1/S
Tubo 1	0	0	0	0	0
Tubo 2	1,1mg/ml	0,139	0,00556	179,8561151	0,909
Tubo 3	2,5 mg/ml	0,136	0,00544	183,8235294	0,4
Tubo 4	3 mg/ml	0,183	0,00732	136,6120219	0,33
Tubo 5	5 mg/ml	0,299	0,01196	83,61204013	0,2
Tubo 6	7 mg/ml	0,333	0,01332	75,07507508	0,1429
Tubo 7	10 mg/ml	0,409	0,01636	61,12469438	0,1

Fuente: Elaboración propia.

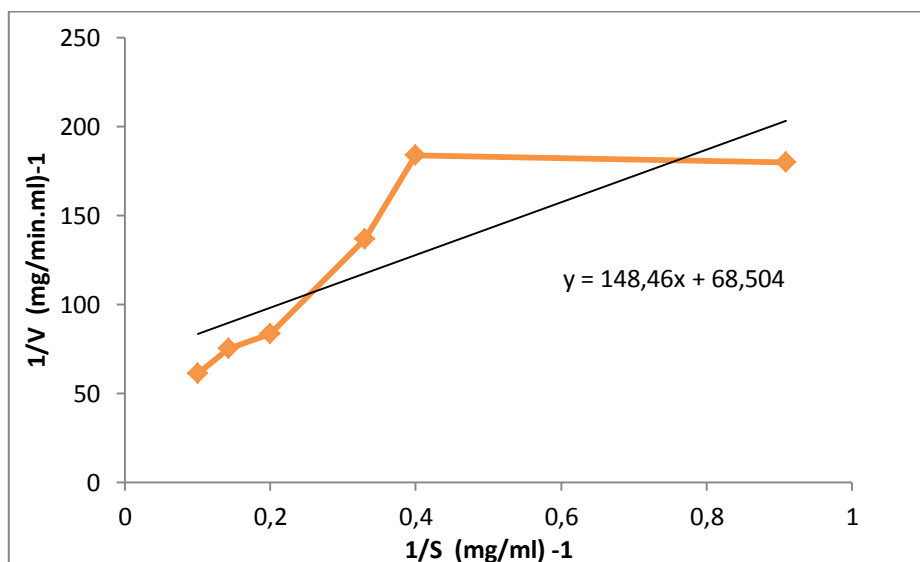


Figura 25. : Inversos de las velocidades enzimáticas frente a los inversos de las concentraciones de sustrato

Fuente: Elaboración propia.

**Cálculo de  $V_m$  y  $K_m$  mediante las representaciones de Eadie-Hofstee y de Lineweaver-Burk.**

El  $K_m$  y  $V_m$  se determinan en ambas presentaciones por los puntos de corte de la recta:

- en Abscisas corresponde a la relación  $V_m/K_m$ .
- en Ordenadas directamente indica la  $V_m$  de la reacción.

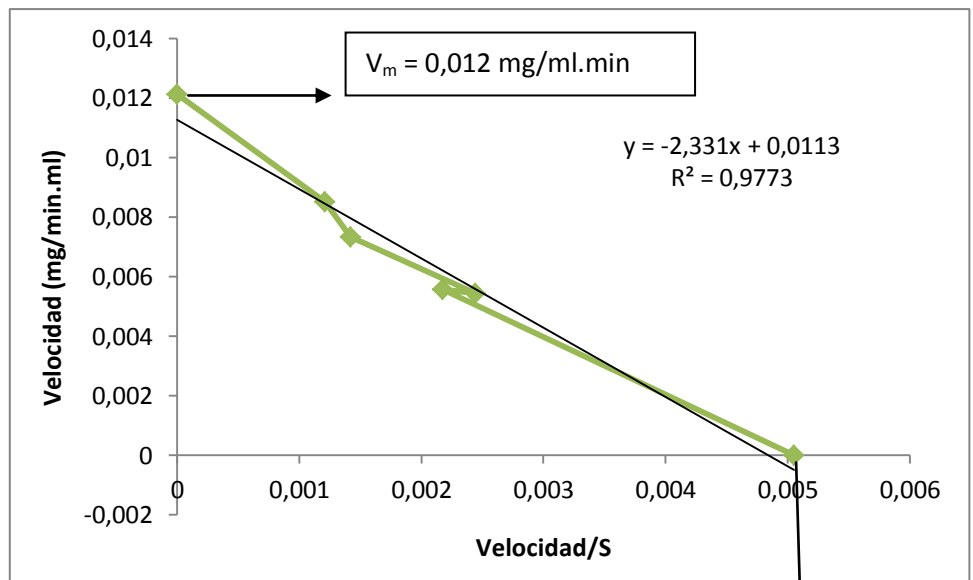


Figura 26: Representación de Eadie- Hofstee

Si  $V_m = 0,012 \text{ mg/ml.min}$

Entonces reemplazamos en:  $V_m/K_m = 0,005 \text{ min}^{-1}$

$$0,012/0,005 = 2,4 = K_m$$

**$K_m = 2,4 \text{ mg/ml}$**

- en abscisas corresponde a  $-1/K_m$
- en ordenadas corresponde a  $1/V$

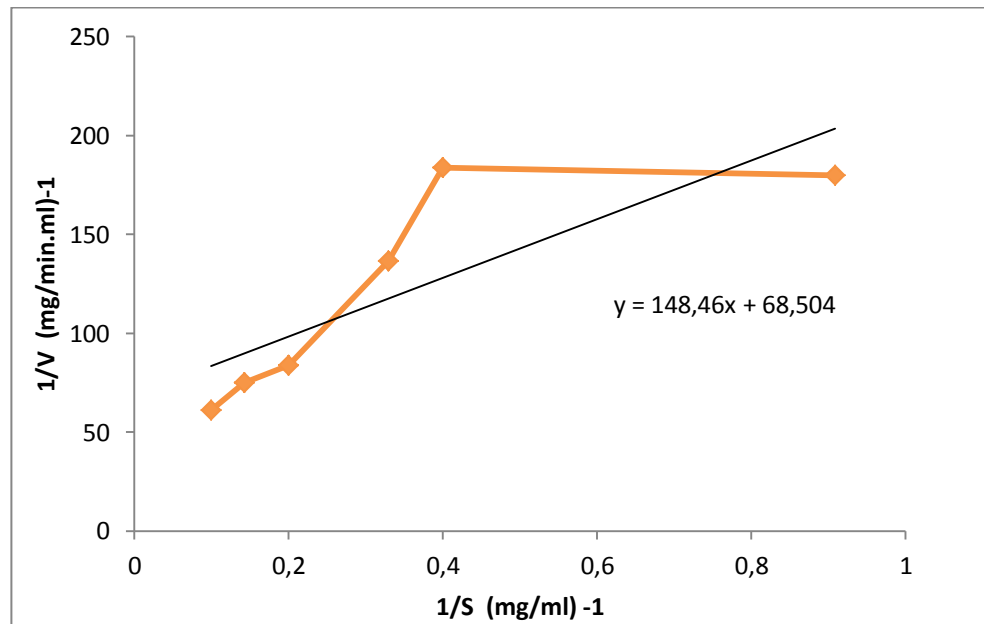


Figura 27: Representación de Lineweaver-Burk

Fuente: Elaboración propia.

Con la ecuación sabremos en qué punto la recta intersectará en el eje Y y en el eje X.

$$Y = 148,46X + 68,504$$

Si:  $x = 0$  entonces:  $y = 68,540$  esto es el punto que intersectará en el eje y por lo tanto este punto es igual a  $1/V_m$

$$1/V_m = 68,540 \longrightarrow V_m = 0,01459$$

Para  $y = 0$

$$0 = 148,46x + 68,504$$

$-68,504 = 148,46x \longrightarrow x = -0,4614$  (Esto quiere decir que la recta intersectará en el punto  $-0,4614$  del eje x)

Entonces  $-1/K_m = -0,4614$

$$K_m = 2,2 \text{ mg/ml}$$

#### 4.6 Caracterización cinética de la enzima celulasa producida por la bacteria termófila a diferentes pH y temperatura.

Los resultados obtenidos al estudiar la cinética de la enzima celulasa bajo distintas condiciones de temperatura y pH, establecidas a partir de un diseño experimental se presentan a continuación. Los siguientes gráficos muestran (Tabla 24).

Tabla 24: Actividad enzimática a diferente pH y temperatura.

T°	pH = 5		pH = 7		pH = 10	
	Promedio Abs	U/ml	Promedio Abs	U/ml	Promedio Abs	U/ml
25 °C	0,032	1,3	0,0553	2,8	0,049	2,4
45 °C	0,0518	2,5	0,066	3,4	0,046	2,22
80 °C	0,0373	1,6	0,0503	2,47	0,05	2,45

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.6.1 Análisis de la caracterización cinética de la enzima celulasa producida por *Bacillus* sp.a diferentes pHs y temperaturas.

Para realizar este experimento se utilizó un diseño factorial con tres repeticiones, los factores fueron los diferentes valores de pHs y temperaturas como podemos ver en la tabla 25.

Tabla 25: Interacciones entre las temperaturas y pHs

	T1.P1	T1.P2	T1.P3	T2.P1	T2.P2	T2.P3	T3.P1	T3.P2	T3.P3
1	1,75	5,18	3,31	3,22	4,23	3,4	1,95	4,52	3,6
2	1,31	1,12	2,3	4,87	4,87	1,6	0,99	1,03	2,46
3	0,806	1,69	1,72	1,44	1,44	1,63	1,66	1,6	1,34

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 26 se realizó la prueba de normalidad para las actividades enzimáticas de las diferentes temperaturas, podemos ver que las temperaturas de 45 y 80 °C presentan distribución normal por ser su significancia mayor a 0,05, sin embargo la temperatura de 25 °C no presenta dicha distribución, esto debido a que presentan valores que varían.

Tabla 26: Prueba de normalidad para temperaturas mediante Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>

Temperatura		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
		Estadístico	gl	Sig.
Actividad enzimática	25	0,278	9	0,044
	45	0,262	9	0,075
	80	0,225	9	0,200

Fuente: Programa SPSS

**En la tabla 27** se realizó la prueba de homocedasticidad o también llamada de homogeneidad de varianzas para las temperaturas, dándonos una significancia mayor a 0,05 por lo tanto si presenta homogeneidad en sus varianzas de las actividades enzimáticas.

Tabla 27: Prueba de homogeneidad de varianzas para temperaturas

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,611	2	24	0,551

Fuente: Programa SPSS

Debido a que una temperatura la de 25 °C no presentaba una distribución normal es que se representó mediante el diagrama de caja y bigotes como podemos observar en la Figura 28.

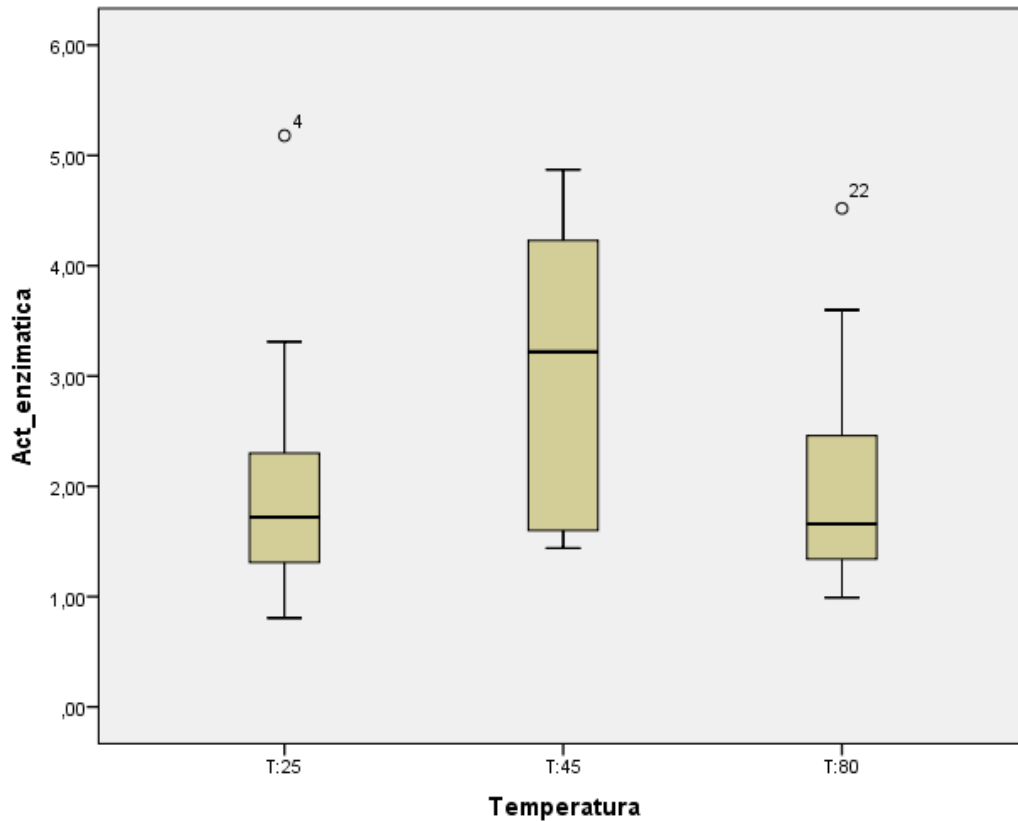


Figura 28: Diagrama de caja y bigotes de actividad enzimática a diferentes temperaturas.

Fuente: Programa SPSS

Interpretación: Observamos que la caja que contiene los valores de las temperaturas de 45°C tienen actividades más amplias que los restantes, para esta temperatura el primer cuartil informa que el 25 % de las temperaturas de 45 °C han superado una actividad enzimática

de 1 U/ml, el segundo cuartil o mediana (50%) informa que el 50 % de las temperaturas de 45 °C tienen una actividad enzimática superior a 3 U/ml señalando que esta actividad es típica de este conjunto de pHs y el tercer cuartil el cual representa el 75 % señala que los restantes han alcanzado una actividad superior a 4 U/ml.

Podemos ver también que hay dos valores Atípicos en la temperaturas de 25 y 80 °C esto quiere decir que estos dos valores obtuvieron una actividad enzimática muy superior a la mayoría de los valores dentro del rango.

En la Tabla 28 se realizó la prueba de normalidad para los diferentes pHs, dándonos significancias menores a 0,05 en los pHs de 5 y 7 y únicamente el pH 10 presentó normalidad, por lo tanto podemos decir que sus datos presentan distribución normal.

Tabla 28: Prueba de normalidad para pHs mediante Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>

pH		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
		Estadístico	gl	Sig.
Actividad enzimática	5	0,293	9	0,025
	7	0,299	9	0,020
	10	0,217	9	0,200

Fuente: Programa SPSS.

En la Tabla 29 se realizó la prueba de homocedasticidad o también llamada de homogeneidad de varianzas para los pHs, dándonos una significancia menor a 0,05 por lo tanto los datos de pH no presentan homogeneidad en sus varianzas los cuales difieren los unos de los otros.

Tabla 29: Prueba de homogeneidad de varianzas para pHs

<b>Prueba de homogeneidad de varianzas</b>			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
18,475	2	24	0,000

Fuente: Programa SPSS

De igual forma debido a que la mayoría de los pHs no presentaron una distribución normal es que se representó mediante el diagrama de caja y bigotes como podemos observar en la Figura 29.

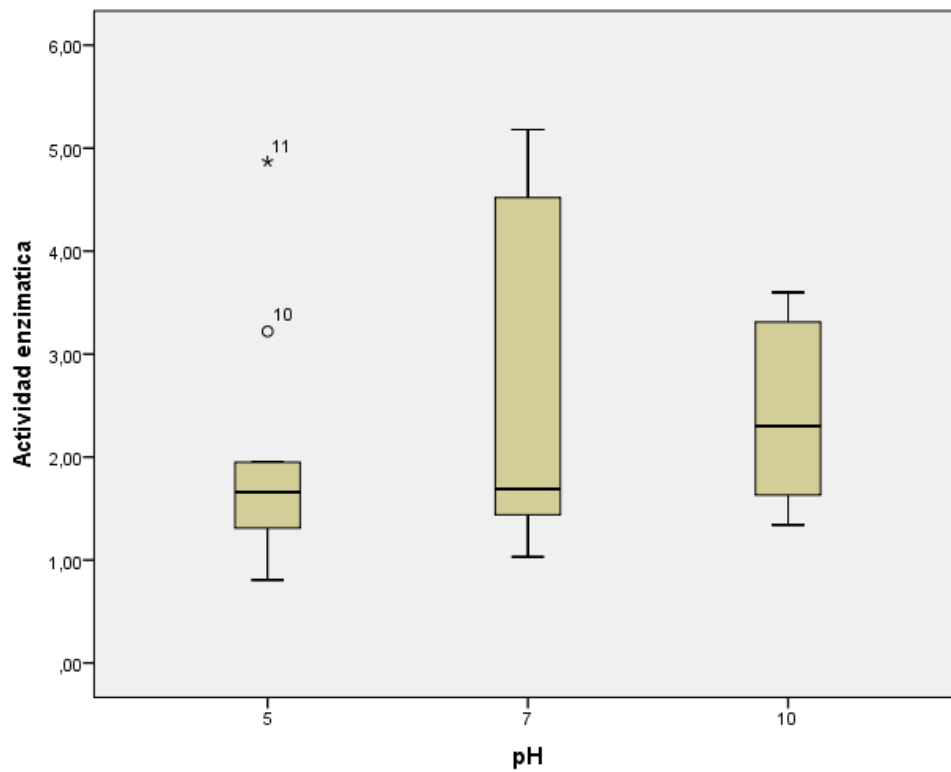


Figura 29: Diagrama de caja y bigotes de actividad enzimática a diferentes pHs

Fuente: Programa SPSS

Interpretación: Observamos que la caja que contiene los valores de los pH 10 y pH 7 son más amplios que las del pH 5 , en el caso de este último el primer cuartil informa que el 25 % de los pHs 5 han superado una actividad enzimática de 1 U/ml, el segundo cuartil o mediana

(50%) informa que el 50 % de los pHs 5 tienen una actividad enzimática cercana a 2 U/ml señalando que esta actividad es típica de este conjunto de pHs y el tercer cuartil el cual representa el 75 % señala que los pHs 5 restantes han alcanzado una actividad cercana a 2 U/ml.

Así mismo se nota que la mitad de los pHs 5 correspondientes a la parte central de su distribución (mediana) se encuentran entre las actividades enzimáticas cercanas a 2 U/ml, también se puede apreciar que el rango de las actividades enzimáticas para este pH 5 varían entre un valor de 0,81 y 1,95. Señalando que hay dos valores Atípicos, esto quiere decir que estos dos valores de pHs5 obtuvieron una actividad enzimática muy superior a la mayoría de los valores de 3,22 U/ml y 4,87 U/ml.

También observamos que nuestras cajas poseen distribuciones asimétricas esto debido a que en la primera caja de pHs 5 tienen una tendencia a valores de actividad bajos, mientras que en los pHs 7 la mayor parte tienen una tendencia a actividades altas, y los pHs 10 poseen actividades regulares.

En el tabla 30 se observa el análisis de varianza para las interacciones entre los pHs y temperaturas, vemos que nuestro  $F_c$  de la interacción es de 0,53480762 por lo tanto es inferior a los valores de  $F$  tabla para (0,05) y (0,01) los cuales son 2,92774417y 4,57903597respectivamente, además se observa que el valor  $p$  de la significancia es menor a 0,05 por lo tanto la diferencia de medias entre al menos dos sustratos es altamente significativo

Tabla 30: Análisis de Varianza de interacciones pHs y temperaturas.

Fuente de V	GL	SC	CM	Fc		Sig.	
Temperatura	2	4,22464563	2,112322815	1,0524063	3,5545571	6,0129048	0,456 0,371 0,709
pH	2	3,300090074	1,650045037	0,8220892			
T*pH	4	4,293726815	1,073431704	0,5348076	2,9277441	4,5790359	
Error experimental	18	36,12845067	2,007136148				
TOTAL	26	47,94691319					

Fuente: Programa SPSS

Interpretación: En la interacción podemos ver que el p valor es 0,709. Por lo tanto como  $0,709 > 0,05$  afirmamos que no existe diferencia entre las medias de los grupos, si se evalúa por separado vemos que las significancias de los pHs y temperaturas por separado de igual forma son mayores a 0,05 y por lo tanto de la misma forma no presentan diferencias significativas.

## V. DISCUSIÓN

El tiempo de activación del microorganismo fue de 4 días con una fase de latencia de dos días, menor a lo que reportan otras investigaciones realizadas como la de Marín (2007). La explicación a esto se puede encontrar en el tiempo de almacenamiento de la cepa el que fue de aproximadamente 2 meses ya que si el tiempo de almacenamiento hubiera sido mayor el tiempo de activación también lo sería.

El tiempo de incubación del cultivo fue de 6 días, se determinó la cinética de crecimiento mediante el recuento en la cámara de Neubauer y se notó que en el transcurso de las 2 y 4 horas no había un incremento de la población bacteriana por lo que se decidió evaluarla cada 24 horas, se observó que a los 3 días la cepa alcanzaba su fase exponencial, lo cual nos indicó que presentaba una fase de latencia de aproximadamente 2 días debido a que se estaba adaptando al medio, la evaluación de crecimiento se dio en 6 días.

En la cuantificación de proteínas totales podemos observar que las proteínas totales guardan relación con el crecimiento celular observando que al tercer día hubo un aumento de proteínas máxima de 192,85  $\mu\text{g/ml}$  y una disminución al sexto día con 91,31 $\mu\text{g/ml}$  con lo cual podemos decir que la producción de enzima celulolítica disminuyó a partir de dicho día.

Se obtuvieron los mejores resultados a partir del tercer día, lo cual muestra la relación con el recuento y la cantidad de proteínas totales, ya que el hecho de que se produzca más enzima extracelular en el medio hace suponer que habrá mayor degradación del sustrato CMC y una mayor liberación de azúcares reductores.

Por lo tanto podemos decir que al sexto día nuestra enzima ya se encuentra activada y adaptada.

Al momento de analizar diariamente la producción enzimática de azúcares reductores, de proteínas y de biomasa celular, mostraron relación a hasta el tercer día donde se puede observar que existe relación, a partir de ahí la curva de crecimiento celular

empieza a crecer pero la producción de enzima y la actividad bajan lo que nos indica que la máxima producción de enzima se da al tercer día.

Para corroborar la activación completa de nuestra cepa celulolítica se realizó cultivos en medio solido CMC al 1 %, con lo cual pudimos observar los halos de hidrólisis mediante la reacción con lugol al 50%, observando la actividad extracelular celulolítica en forma visual por la formación de un halo alrededor de la colonia, lo que significa una degradación del sustrato presente en la placa por la enzima liberada al medio. Este ensayo revela actividad extracelular, ya que el sustrato se encuentra en el medio, por lo que de haber halo alrededor de ésta, significa que la enzima se secretó al medio extracelular exitosamente y de manera activa.

De la observación de la muestra proveniente de los medios de cultivos, se vio que el microorganismo presenta características microscópicas de bacillos Gram positivos, delgados y alargados.

El tiempo de obtención de un volumen considerado de celulasa aproximadamente de 2000 ml fue de 7 días.

La producción de celulasa por el medio CMC fue buena, ya que si se tiene en cuenta el medio contiene solo dos fuentes de nitrógeno (sulfato de amonio y peptona) además de micro elementos.

Bastawde (1992) reportó que el sulfato de amonio favorece la producción de celulasas que otras fuentes probadas.

La fermentación se realizó a una concentración de 0,5 % de CMC ya que luego de la masificación se tenía que evaporar y concentrar, si se trabajaba con una concentración del 1 % esto resultaría dificultoso por la viscosidad de la Carboximetilcelulosa.

El tiempo de concentración por evaporación tomó alrededor de 6 días primeramente se incubó el cultivo restante a 45°C por 48 h con aireación constante, pasado este tiempo el volumen disminuyó aproximadamente a la mitad después de este tiempo se centrifugó y filtró en una membrana de millipore de 0,2  $\mu$ . Luego se incubó por otras 48 h a 50°C con aireación y de igual forma se centrifugo y filtro, finalmente se incubó de 10 a 24 h a 50°C con aireación constante y se obtuvo un volumen aproximado de 10 ml.

Es interesante destacar, las pruebas de evaluación a diferentes sustratos ya que este ensayo tiene por objetivo corroborar su actividad de nuestra enzima a sustratos reales como hojas de geranio, papel, tallos y CMC como sustrato conocido por los ensayos, un dato importante de este ensayo es que los sustratos como hojas geranios, papel no presentaron una elevada cantidad de azúcares reductores, valores de 0,116 mg /ml de las hojas de Geranio;0,083 mg/ml del papel, esto debido a la complejidad de la estructura de la planta y de las moléculas que la componen, es necesario que las enzimas involucradas en la escisión de los polisacáridos actúen de manera sinérgica o cooperativa para lograr una eficiente degradación parte de estas enzimas que se requieren son las exoglucanasas (Exo- $\beta$ -glucanasas ó 1.4- $\beta$ -D-glucancelobiohidrolasas), en muchas investigaciones se les da un pre tratamiento alcalino, ya que la aplicación de álcalis como el NaOH, produce la ruptura de la lignina. De esta forma se incrementa el área superficial de la celulosa, además de producirse una disminución en su cristalinidad (Chaparro *et al.*, 2009).

En nuestro caso no lo utilizamos porque simplemente queríamos ver si nuestra enzima tenía o no la capacidad de actuar sobre estos sustratos.

Indirectamente con nuestro resultado podemos ver que la enzima pudo degradar sustrato y convertirlo en azúcares al cabo de 24 horas en poca cantidad pero esto nos da una idea de que probablemente contenga en su complejo enzimático exoglucanasas, esta determinación y su evaluación correspondiente con pre tratamiento químico y biológico es toda una investigación aparte la cual se recomendaría realizar en un futuro.

El sustrato que presentó un resultado fuera de lo normal fue el del tallo ya que se observó una cantidad elevada de azúcares reductores en un inicio de la evaluación, la conclusión lógica por la que presentó esta cantidad inicial elevada fue debido la función que tiene el tallo, la cual es de conducir la savia y almacenar reservas alimenticias, estas reservas alimenticias son en su mayoría carbohidratos provenientes de la conversión de dióxido de carbono y agua por lo tanto era lógico que presente una elevada concentración de azúcares reductores en la parte inicial en parte también porque para realizar la evaluación se trituró el

tallo y se sometió a esterilización con lo cual de algún modo se influyó en la liberación de los mismos, por tanto en el trabajo se evaluó la diferencia de que tanto se había producido con nuestra enzima en 24 horas en este caso tampoco no dimos ningún pre tratamiento alcalino ni ácido a nuestros sustratos.

El ensayo permitió corroborar que si existe actividad en este sustrato lignocelulósico y se logró observar definitivamente que al cabo de 24 horas nos dió una liberación de azúcares reductores de 3,499 mg/ml.

Con respecto a los resultados que se obtuvieron del CMC es importante también comparar esta prueba con el ensayo de obtención de la enzima ya que comprobamos que efectivamente que en un aproximado de 24 horas se pudo liberar 0,593mg/ml de azúcares reductores, la cantidad que está en el rango de producción de la enzima entre 24 a 48 horas según nuestro ensayo ya descrito.

Estos resultados promueven continuar con estudios de bioprospección en este ecosistema de géiseres, además de futuros ensayos para utilizar dichos microorganismos en la realización de

productos de valor a la sociedad, tal como biocombustibles a partir de biomasa vegetal de desechos agroforestales o, productos químicos orgánicos de interés (Kumar, 2012).

El extracto enzimático de cultivo que tenía por volumen 2000 ml tuvo una actividad de 0,027 U/ml. Con la evaporación del extracto obtuvimos un volumen final aproximado de 20 ml posteriormente al agregar concentrar con sulfato de amonio al 60 % (Anexo 7) y luego al 90 % (Anexo 8) observamos cualitativamente un precipitado color marrón oscuro en el fondo del eppendorf lo cual indica una buena concentración de enzima, la cantidad de proteínas del mismo fue de 2,5 mg/ml y su actividad de 13,6 U/ml lo cual nos indica que hubo una buena concentración de proteínas por lo tanto una mejor actividad , sin embargo, a pesar de la buena concentración de proteínas de la enzima notamos que en el sobrenadante aun había una concentración de proteínas de 1,01mg/ml, esto nos indica que nuestra enzima requiere otros métodos de purificación.

Los valores obtenidos luego de la diálisis son los resultados verdaderos de nuestra enzima ya que la actividad en el concentrado con sulfato de amonio aún contiene sulfato lo cual interfiere con un resultado verídico de la actividad, fue así que se obtuvo una cantidad de proteínas totales de 1,3 mg/ml y una actividad enzimática de 5,9 U/ml lo cual nos indica una disminución de la actividad debido a factores como el tiempo de 3 días y a las bajas temperaturas que se estuvo realizando la diálisis.

Se puede observar la aparición del producto (azúcares reductores) a partir de los 5 minutos de reacción, teniendo una velocidad inicial de 0,0054mg de CMC/ml.min, lo cual nos indica que existe una rápida acción enzimática dándonos mejores resultados a partir de los 25 minutos, este experimento nos muestra la velocidad de reacción de la enzima obtenida a partir de *Bacillus* sp.

A medida que se fue aumentando la concentración de enzima con un volumen constante de sustrato CMC, se ve que va aumentando el producto y por lo tanto su actividad, las concentraciones de enzima menores de 200 uL presentaron una cantidad mínima de producto la cual se encontraba por debajo de nuestra curva estándar, lo que nos

indica que para poder realizar este tipo de prueba se debe iniciar con un volumen igual de enzima y sustrato, esta dependencia directamente proporcional de la cantidad de enzima con el sustrato nos muestra que nuestra enzima sigue el comportamiento normal.

A medida que se incremento la concentracion de enzima se incremento la velocidad de reacción debido a que ambos son directamente proporcionales hasta un punto donde se hace constante.

Se llegó a obtener una velocidad de 0,0096 mg/ml.min para un volumen de 400  $\mu$ L, para un posterior experimento se recomienda realizar ensayos con mayores volúmenes de enzima para ver en que punto llega a saturarse y se hace constante el producto.

De igual forma a medida que incrementamos la concentración de sustrato se incrementa los azúcares reductores por ser de igual forma proporcionales, lo cual nos indica que nuestra enzima sigue el comportamiento de la ecuación de Michaelis-Menten.

Obteniendo un producto de 0,303 mg/ml de azúcares reductores por 10 mg/ml de sustrato CMC.

La representación de Eadie-Hofstee se halló a partir de las velocidades a medida que se va aumentando la concentración de sustrato y el cociente de la velocidad/S, dándonos una ecuación inversa de:

$$y = -2,331 + 0,0113$$

La representación de Lineweaver-Burk se obtuvo a partir de las inversas:

$1/V$  y  $1/S$ , observando que a medida que se aumenta la concentración de sustrato la inversa de velocidad va disminuyendo y de igual forma disminuye la inversa de sustrato.

$$Y = 105,84 + 99,709$$

La caracterización enzimática mostró actividad endoglucanasa en carboximetilcelulosa una inicial de  $V_i$  de 0,0054 mg/ml.min una  $V_{max}$  de 0,012 mg/ml.min y un  $K_m$  de 2,3 mg CMC/ml. Estos valores servirán como puntos de comparación para los parámetros que se obtengan en una futura caracterización de la enzima recombinante.

La  $V_{m\acute{a}x}$  nos muestra la frecuencia de enlace entre nuestra enzima y carboximetilcelulosa. Se representa como una función de la

concentración inicial de sustrato. Es directamente proporcional a la concentración inicial de enzima.

El  $K_m$  de 2,3 mg CMC/ml representa la afinidad entre nuestra enzima y la carboximetilcelulosa. Esta en función de la concentración inicial de sustrato lo cual no indica que a 2,3 mg de CMC la velocidad máxima de nuestra enzima se encuentra a la mitad. Este dato es de mucha importancia si se quiere más adelante realizar estudios de inhibiciones de la enzima obtenida.

En la evaluación a diferentes pHs y temperaturas se observó las mejores actividades dentro de grupo de los pHs 7 una actividad mayor de 3,4 U/ml a una temperatura de 45°C, lo cual nos indica que coincide con la temperatura óptima de la fermentación le siguen la actividades de 2,8 U/ml a una temperatura de 25 °C y de 2,47 U/ml a una temperatura de 80°C.

Dentro del grupo de los pHs 5 se mostró que hubo una pérdida de actividad a temperaturas de 25 y 80 °C dándonos valores de 1,3 y 1,6 U/ml respectivamente, pero se mantuvo su actividad a la temperatura de 45 °C con un valor de 2,5 U/ml lo cual nos hace pensar que esta

temperatura ayudóa mantener la actividad. También se observó que la enzima no se ve afectada del todo a un pH de 10, si bien es cierto hay una pérdida de actividad pero la enzima aún conservó parte de ella obteniéndose valores de 2,4 U/ml a una temperatura de 25 °C; 2,22 U/ml a una temperatura de 45 °C y de 2,45 U/ml a una temperatura de 80 °C.

Con lo anterior se puede decir que esta celulasa posee un comportamiento enzimático neutro pero que se adapta a un pH alcalino ya que otras enzimas endoglucanasas generalmente pierden bastante actividad a estos pHs alcalinos, por lo tanto la enzima es apta para actuar en diferentes usos como por ejemplo aditivo a detergentes, ya que para ello se requiere que posean actividad en amplios rangos de pHs alcalinos, rango alcanzado por esta celulasa.

Esta condición favorece su uso en la industria debido a su resistencia; sin embargo, es preciso concentrarla mucho más por métodos como ultrafiltración para obtener un mejor rendimiento.

## VI. CONCLUSIONES

1. La evaluación de la cinética de crecimiento guarda relación con la producción de azúcares reductores y proteínas totales del medio líquido teniendo valores elevados a partir de las 72 horas.
2. En la evaluación a diferentes sustratos, la producción de azúcares reductores y actividad del tallo es demasiado alta por lo cual no es un análisis que nos muestre un resultado del todo verídico ya que la presencia de azúcares reductores en un inicio fue elevada e influyó sobre su resultado, es recomendable realizar más ensayos con este sustrato, pero con un pre tratamiento químico para evitar que los azúcares presentes influyan nuevamente, en el caso de las hojas de geranio y papel molido también presentaron actividades pero en este caso fueron bajas, este resultado se ajusta más a la realidad ya que concuerda con otros estudios realizados en otras investigaciones por lo cual se recomienda realizar estudios posteriores con pre tratamientos fisicoquímicos y biológicos con la finalidad de remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables, y reducir la

cristalinidad de la celulosa para liberar la glucosa, finalmente podemos ver que la Carboximetilcelulosa es un buen sustrato para nuestra enzima ya que presenta buenos valores de actividad y azúcares reductores, por tanto, se logró obtener una celulasa, del tipo endoglucanasadebido a este sustrato inductor.

3. El protocolo de evaporación con aireación y la posterior purificación parcial mediante precipitación con sulfato de amonio al 60 y 90 %,y dializado logró concentrar y purificar la enzima, pero no lo logra concentrar del todo, por lo cual debe mejorarse con otros métodos de purificación y concentración como la ultrafiltración.

4. La celulasa obtenida posee parámetros cinéticos  $K_M$ ,  $V_i$ ,  $V_{m\acute{a}x}$  los cuales son respectivamente 2,3 mg/ml; 0,0054mg/ml.min y 0,012 mg/ml. Se concluye por tanto que nuestra enzima tiene una alta afinidad por el CMC ya que nuestro rango de análisis fue de sustrato fue de 1,1 mg/ml a 10 mg/ml y mientras menor sea su  $K_m$  mayor es su afinidad, este valor de  $K_m$  se obtuvo al promediar los resultados de las ecuaciones de Eadie-Hofstee y Lineweaver-Burk.
  
5. En la evaluación en las interacciones de temperaturas y pHs mediante el diseño experimental de Análisis de varianza factorial no existió diferencia significativa entre las interacciones, por tanto, nuestra enzima extracelular nativa purificada es estable a rangos de pH de 5 a 10. La actividad relativamente máxima se alcanza a un pH 7. La celulasa obtenida se puede clasificar entre las enzimas moderadamente adaptadas a temperaturas termófilas, ya que su temperatura óptima de reacción es de 45°C aproximadamente. La enzima es estable frente a un amplio rango de temperaturas (25 a 80°C), dentro de este experimento no se pudo obtener los valores óptimos de pH y temperatura ya que

nuestra significancia fue inferior a 0,05. Esta enzima es adecuada para ser utilizada en procesos a una temperatura elevada, ya que a 80°C mantiene actividad, temperatura a la cual las enzimas de organismos mesofílicos prácticamente no poseen actividad. Con estos resultados es posible concluir que la celulasa obtenida posee características que son atractivas para utilizarla en un futuro.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Evaluar las cepas seleccionadas en cultivos con otras fuentes de carbono variando sus concentraciones, hasta hallar otros nuevos sustratos adecuados para la enzima como la concentración requerida para lograr una buena producción enzimática en la misma.

Realizar estudios basados en técnicas independientes de medios de cultivo o técnicas para aislar microorganismos anaeróbicos como complemento del estudio actual. Sin embargo, tales microorganismos no cultivables o de hábito anaeróbico, representan mayor dificultad para futuras aplicaciones de actividad enzimática, y en la producción de biocombustibles.

Evaluar y optimizar las condiciones de cultivo de la cepa para producción exoglucanasa con pre tratamiento químico, evaluando su influencia y haciendo variaciones de temperatura y pH.

Evaluar cuantitativamente la producción de endoglucanasas en medios con más fuentes de nitrógeno, vitaminas, surfactantes; así como otros inductores.

Realizar una concentración con otros métodos como ultra centrifugación y liofilizado.

Recombinar las bacterias productoras de esta enzima junto con otras bacterias que produzcan otras enzimas de importancia, para una producción a gran escala y su utilización en beneficio de la sociedad.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aguirre J.**, Rios-Momberg M., Hewitt D., Hansberg W. (2003). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.*13:111–118.
2. **Alani, F.**, Anderson, W. & Moo-Young, M. (2008). New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. *Biotechnol Lett.* 30, 123-126.
3. **Alexander, M.** (1980). *Introducción a la microbiología del suelo.* AGT Editor, S.A. pp. 162-177. México.
4. **Anderson, W.**, Dien, B., Brandon, S. & Peterson, J. (2008). Assessment of bermudagrass and bunch grasses as feedstock for conversion to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol*, 145, 13-21.
5. **Atsumi, S.**, Cann, A. F., Connor, M. R., Shen, C. R., Smith, K. M., Brynildsen, M. P., Chou, K. J., Hanai, T. & Liao, J. C. (2007). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng.* Epub ahead of print, doi:10.1016/j.ymben.2007.08.003.

6. **Baldrian**, P. & Valaskova, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS Microbiol Rev. Epub ahead of print, doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00106.
7. **Barr**, B. K., Hsieh, Y. L., Ganem, B. & Wilson, D. B. (1996). Identification of two functionally different classes of exocellulases. Biochem. 35, 586-92.
8. **BayerEA**, Belaich JP, Shoham Y, Lamed R (2004). The cellulosomes:
  - a. Multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. Annu. Rev. Microbiol. 58 : 521 – 554 .
9. **Béguin**, P. & Aubert, J.-P. (1994). The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol Rev. 13, 25-58.
10. **Bidlack**, J., Malone, M. & Benson, R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. Proc Okla Acad Sci. 71, 51-56.
11. **Boer**, H., Teeri, T. T. & Koivula, A. (2000). Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. Biotechnol Bioeng. 69, 486-94.
12. **Cazemier**, A. E., Verdoes, J. C., Reubsæet, F. A., Hackstein, J. H., van der Drift, C. & Op den Camp, H. J. (2003). Promicromonospora

pachnodae sp. nov., a member of the hemicellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle. *Pachnoda marginata*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 83, 135-48.

13. **Castellanos**, P.; Lancho, A.; Vilches, L. y Huerta, L. (2000). Aislamiento, identificación y selección de cepas productoras de celulasas de dos regiones del Perú. IX. Reunion Cientifica del ICBAR, Lima, pág. 118.
14. **Cieslinski** H., Kur J., Bialkowska A., Baran I., Makowski K., Turkiewicz M.(2005) Cloning, expression, and purification of a recombinant cold-adapted  $\beta$ -galactosidase from antartic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b. *Protein Expression and Purification*, 39, 27-34.
15. **Chander** R. K., Gupta R., Singh A. (2011). "Microbial cellulases and their Industrial Applications" *Enzyme Research*.1:1-10.
16. **Chesson** A. (1987). Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In: Haresign W, Cole DJA, editors. *Recent advances in animal nutrition*. London: Butterworths, pp. 71–89.
17. **Cosgrove**, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*. 407, 321-326.

18. **Cowling**, E. B. (1975). Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials. *Biotechnol Bioeng Symp.* 163-81
19. **Doi**, R. H. (2007). Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome & non-cellulosome producers. Doi 0:14190021.
20. **Druzhinina**, I. S., Schmoll, M., Seiboth, B. & Kubicek, C. P. (2006). Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant, and transformant strains of *Hypocrea jecorina*. *Appl Environ Microbiol.* 72, 2126-2133.
21. **Elberson**, M., Malekzadeh, F., Yazdi, M., Kameranpour, N., Noori-Dalooi, M., Matte, M., Shahamat, M., Colwell, R. & Sowers, K. (2000). *Cellulomonas persica* sp. nov. and *Cellulomonas iranensis* sp. nov., mesophilic cellulose-degrading bacteria isolated from forest soils. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50, 993-996.
22. **Erikson** K., Wood T. (1985). "Biodegradation of wood cellulose: Biosynthesis and biodegradation of wood components". Academic Press, New York. 469-503 pp
23. **Eriksson**, K. E. L., R. A. Blanchette, and P. Ander. (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, Springer-Verlag, New York, N.Y.

24. **Fooladi** J, Sajjadian A. (2009). Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable  $\alpha$ - amylase producing strain. Department of Biology, Faculty of Sciences, Alzahra University, Vanak, Tehran, Iran.
25. **Galante** Y. M., Formantici C. (2003) Enzyme Application in Detergency and in Manufacturing Industries. *Current Organic Chemistry*, 7, 1399-1422.
26. **Galbe**, M. & Zacchi, G. (2007). Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 108, 41-65.
27. **Godfrey** T. Textiles. In: Godfrey T, West S, editors. *Industrial enzymology*, 2nd ed. London: Macmillan Press, (1996). pp. 360–71.
28. **Godfrey** T, West S. Introduction to industrial enzymology. (1996) In: Godfrey T, West S, editors. *Industrial enzymology*, 2nd ed. London: Macmillan Press, pp. 1–8.
29. **Ghose**, T.K. (1987). Measurement of Cellulase Activities. *Pure&Appl. Chem.* 59: 257-268.

30. **Gupta, R., Gupta, N. y Rathi, P. (2004)** Bacterial enzymes: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 64, 763-781.
31. **Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C. & Schulein, M. (1985).** Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Nat Biotech.* 3, 722-726.
32. **Hilden, L. & Johansson, G. (2004).** Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnol Lett.* 26, 1683-93.
33. **Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. & Tiffany, D. (2006).** Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc Nat Acad Sci USA.* 103, 11206-11210.
34. **Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. & Foust, T. D. (2007).** Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science.* 315, 804-7.
35. **Henriksson, G., Nutt, A., Henriksson, H., Pettersson, B., Stahlberg, J., Johansson, G. & Pettersson, G. (1999).** Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. *Eur J Biochem.* 259, 88-95.

36. **Josefsson**, P., Henriksson, L. (2008). The physical action of cellulases revealed by a quartz crystal microbalance study using ultrathin cellulose films and pure cellulases. *Biomacromol.* 9, 249-254.
37. **Kadla** JF and Gilbert RD (2000) Cellulose structure: a review. *Cellulose Chemistry and Technology* 34: 197–216.
38. **Karmakar** M., Ray R. (2011). Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology.* 6 (1) 41-53.
39. **Kipper**, K., Valjamae, P. & Johansson, G. (2005). Processive action of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is revealed as ‘burst’ kinetics on fluorescent polymeric model substrates. *Biochem J.* 385, 527-35.
40. **Klinke**, H. B., Thomsen, A. B. & Ahring, B. K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66, 10-26.
41. **Kumar** Singh Ajay, AbhasKumarMaharana, HarisonMasih, YashabKumar, Santos KumarMishra (2012). *Production, optimization and purification of bacterial cellulase by solid state bioprocessing of agro biomass.* Department of Microbiology & Fermentation Technology, Sam Higginbottom Institute of Agriculture, Technology & Sciences (Deemed to

be university),Allahabad U.P. INDIA 2 Department of Biotechnology, IMS Engineering College, Ghaziabad U.P. INDIA.

42. **Kuzma**, J., Nemecek-Marshall, M., Pollock, W. H. & Fall, R. (1995). Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene. *Curr Microbiol.* 30, 97-103.
43. **Ladisch**, M.R.; Lin, K.W.; Voloch, M. & Tsao, G.T. (1983). Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 5, 82-102.
44. **Lee**, Y-H. & Fan, L.T. (1980). Properties and mode of action of cellulose. Reprint from *Advances in Biochemical Engineering* 18, 101-129.
45. **Lin**, Y. & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.*69, 627-642.
46. **Linder**, M. & Teeri, T. T. (1996). The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proc Nat Acad Sci USA.* 93, 12251-12255.

47. **Lynd**, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66, 506-577.
48. **Lynd**, L. R., C. E. Wyman, and T. U. Gerngross. (1999). Biocommodity engineering. *Biotechnol. Prog.* 15:777–793.
49. **Lee**, J.-W., Gwak, K.-S., Park, J.-Y., Park, M.-J., Choi, D.-H., Kwon, M. & Choi, I.-G. (2007). Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *J Microbiol.*45, 485-491.
50. **Maki** M., Tin K., Qin W. (2009). The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci.* 5 (5): 500-516.
51. **Marín** Alvarado, Romela. (2007). Caracterización y Expresión Recombinante de una Celulasa de Origen Antártico. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Físicas y Matemática Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago de Chile, Agosto.
52. **Martinez**, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F. et al. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol.* 22, 695-700.

53. **Martínez**, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética: Revista Latinoamericana de Microbiología; 50 (3-4): 119-131.
54. **Miller**, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. 31:426-428.
55. **Mosier**, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol. 96, 673-86.
56. **Murashima**, K., Kosugi, A., and Roy, H.D., (2003). Synergistic Effects of Cellulosomal Xylanase and Cellulases from Clostridium cellulovorans on Plant Cell Wall Degradation. J. Bacteriol., 185:1518-1524.
57. **Murnen**, H. K., Balan, V., Chundawat, S. P. S., Bals, B., daCostaSousa, L. & Dale, B. E. (2007). Optimization of Ammonia Fiber Expansion (AFEX) Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Miscanthus x giganteus to Fermentable Sugars. Biotechnol Prog. 23, 846-850.
58. **Nidetzky**, B., Steiner, W., Hayn, M. & Claeysens, M. (1994). Cellulose hydrolysis by the cellulases from Trichoderma reesei: a new model for synergistic interaction. Biochem J. 298 Pt 3, 705-10.

59. **Ovando** C., Waliszewski N. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. 21: 11-120.
60. **Perez** J., Muñoz A., Martinez E. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An Overview *Int. Microbiol.* 5: 53-63.
61. **Peters**, D. (2006). Carbohydrates for fermentation. *Biotechnol J.*1, 806-814.
62. **Pettersen**, R. C. (1984). The chemical composition of wood. In *The chemistry of solid wood Advances in chemistry series*, (ed. R. M. Rowell). Washington, D.C.: American Chemical Society.
63. **Puls**, J., Schröder, N., Stein, A., Janzon, R. & Saake, B. (2005). Xylans from Oat Spelts and Birch Kraft Pulp. *Macromol Symp.*232, 85-92.
64. **Reese**, E. T., R. G. H. Sui, and H. S. Levinson. (1950). The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 59:485–497.
65. **Rubin** E. (2008). Genomics of cellulose biofuels. *Nature*. 4: 841-845.
66. **Singh**, A. & Hayasi, K. (1995). Microbial cellulases: Protein architecture, molecular properties and biosynthesis. *Adv. In Appl. Microbiol.* 40,1-44.

67. **Saha**, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol. Biotechnol.* 30, 279-91.
68. **Sarath**, G., Akin, D., Mitchell, R. & Vogel, K. (2008). Cell-wall composition and accessibility to hydrolytic enzymes is differentially altered in divergently bred switchgrass (*Panicum virgatum* L.) genotypes. *Appl Biochem Biotechnol.*
69. **Sierra** R., Smith A., Granda C., Holtzapple M. (2008). "Producing fuels and chemicals from lignocellulosic biomass" *Chem. Eng. Prog.* 104: S10-S17
70. **Simpson**, T. W., Sharpley, A. N., Howarth, R. W., Paerl, H. W. & Mankin, K. R. (2008). The new gold rush: fueling ethanol production while protecting water quality. *J Environ Qual.* 37, 318-324.
71. **Sun**, Y. & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.* 83, 1-11.
72. **Schmer**, M. R., Vogel, K. P., Mitchell, R. B. & Perrin, R. K. (2008). Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 464-469.
73. **Schallmeyer** M., Singh A., Ward O. (2004). "Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production" *Can. J. Microbiol.* 50: 1-17

74. **Schmid**, G. & Wandrey, C. (1987). Purification and partial characterization of a cellodextrin glucohydrolase (-glucosidase) from *Trichoderma reesei* strain QM 9414. *Biotechnol Bioeng.* 30, 571-585.
75. **Valjamae**, P., Sild, V., Pettersson, G. & Johansson, G. (1998). The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolase is consistent with a cellulose surface-erosion model. *J. Biochem.* 253, 469-75.
76. **Withers**, S. G. (2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr Polym.* 44, 325-337.
77. **Warnecke**, F., Luginbuhl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T. H., Stege, J. T., Cayouette, M., McHardy, A. C., Djordjevic, G., Aboushadi, N. et al. (2007). Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a woodfeeding higher termite. *Nature.* 450, 560-5.
78. **Teeri**, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15, 160-167.
79. **Teunissen**, M. J. & Op den Camp, H. J. (1993). Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 63-76.
80. **Thomke** S, Rundgreen M, Hesselman K. (1980). The effect of feeding high-viscosity barley to pigs. In: Proceedings of the 31st meeting of the

European Association of Animal Production, Commission on Animal Production, Munich, Germany, p. 5.

81. **Tollefson**, J. (2008). Energy: not your father's biofuels. *Nature*. 451, 880-3.
82. **Tomme** P., Warren R.A.J. and Gilkes N.R. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 37:1 –81.
83. **Voragen** AGJ, Heutink R, Pilnik W. (1980). Solubilization of apple cell walls with polysaccharide degrading enzymes. *Appl Biochem*; 2:452–68.
84. **Voragen** AGJ, Wolters H, Verdonschot-Kroef T, Rombouts FM, Pilnik W. (1986). Effect of juice-releasing enzymes on juice quality. In: *International Fruit Juice Symposium*, The Hague (NL), May. Zurich: Juris Druck Verlag, 1986. pp. 453–62.
85. **Wackett**, L. P. (2008). Biomass to fuels via microbial transformations. *Curr Opin Chem Biol*. Epub ahead of print, doi:10.1016/j.cbpa.2008.01.025.
86. **Wilder**, B. M. & Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls: IV. A structural comparison of the wall hemicellulose of cell suspension cultures of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) and of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Physiol.* 51, 889-893.

87. **Wong**, K. K., Tan, L. U. & Saddler, J. N. (1988). Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 52, 305-317.
88. **Xiao**, Z., Gao, P., Qu, Y. & Wang, T. (2001). Cellulose-binding domain of endoglucanase III from *Trichoderma reesei* disrupting the structure of cellulose. *Biotechnol Lett.* 23, 711-715.
89. **Yao**, Q., Sun, T., Chen, G. & Liu, W. (2007). Heterologous expression and site-directed mutagenesis of endoglucanase CelA from *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol Lett.* 29, 1243-1247.
90. **Zhang** Y-HP, Himmel ME, Mielenz JR. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv* 24: 452–481.
91. **Zhang** Y. H. (2008). Reviving the carbohydrate economy via multiproduct lignocellulose Biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 35 (5): 367-375.

## IX. ANEXOS

### Anexo1: Tabla de composición de medio solido CMC

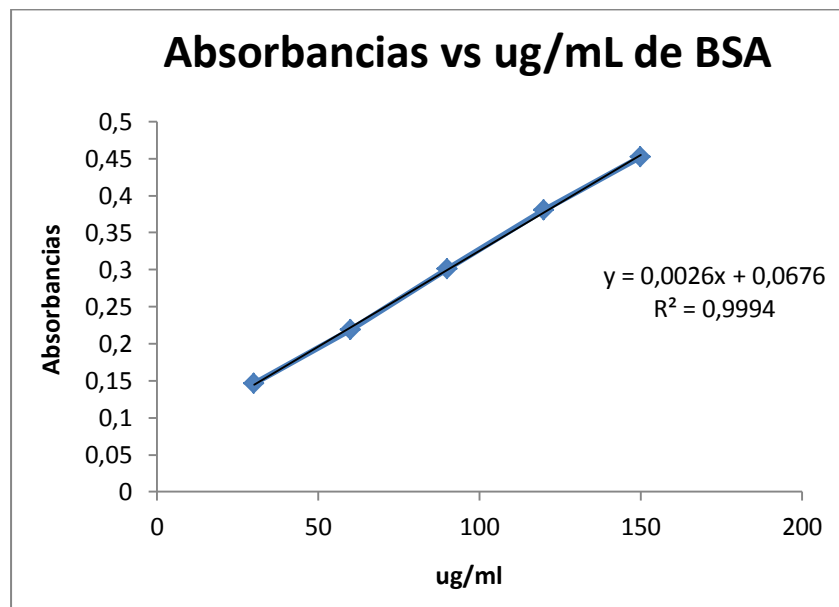
<b>Agar CMC (Carboximetilcelulosa)</b>	
Composición	g/L
Carboximetilcelulosa	10
Extracto de levadura	2,5
Peptona universal	2,5
Sulfato de amonio	0,5
Cloruro de calcio	0,5
Fosfato monobásico de potasio	0,1
Fosfato dibásico de potasio	0,1
Agar-agar	15
pH	7

Fuente: Elaboración propia

## Anexo 2: Curva de calibrado para la medición de proteínas

- Rango de sensibilidad: 0,01 a 0,1 (g/l)
- Elaborada con BSA.

Concentraciones de BSA (ul/ml)	Absorbancias
30	0,146
60	0,219
90	0,301
120	0,381
150	0,452

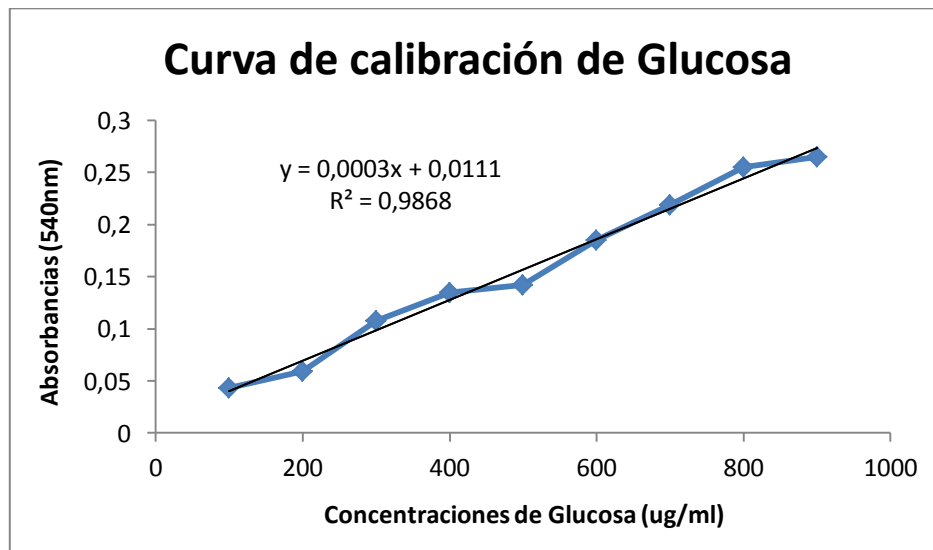


Fuente: Elaboración propia

### Anexo 3: Curva de calibrado para la medición de azúcares reductores.

- Elaborada con Glucosa ( $\mu\text{g/ml}$ )

Glucosa( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia (540 nm)
100	0,043
200	0,059
300	0,108
400	0,135
500	0,142
600	0,185
700	0,219
800	0,255
900	0,265

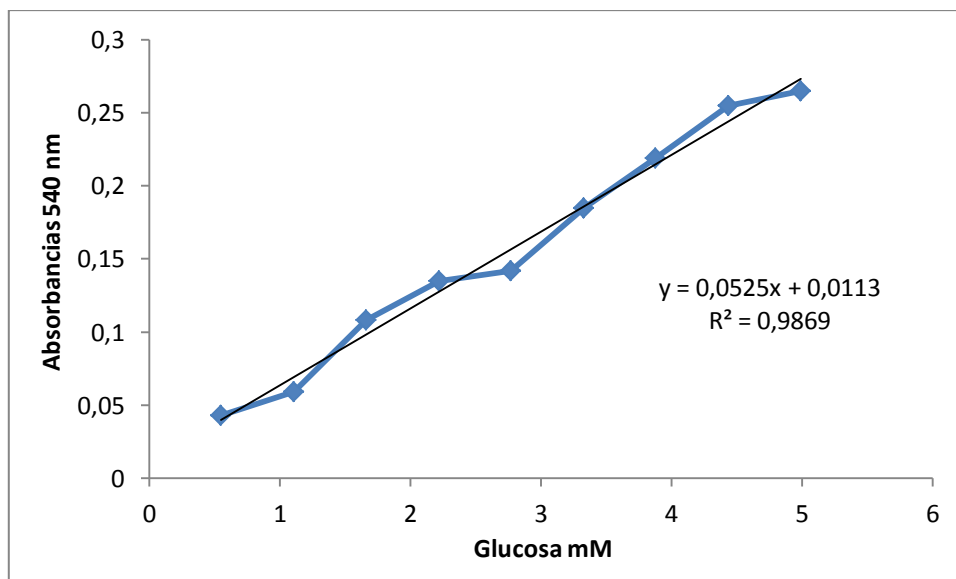


Fuente: Elaboración propia.

Equivalente en mili Molar de Glucosa

Glucosa(mM)	Absorbancia (540 nm)
0,55	0,043
1,11	0,059
1,66	0,108
2,22	0,135
2,77	0,142
3,33	0,185
3,88	0,219
4,44	0,255
4,99	0,265

**Curva de calibración de Glucosa en mM**



Fuente: Elaboración propia.

#### Anexo 4: Tabla de saturación con sulfato de amonio

CONCENTRACION FINAL DE SULFATO DE AMONIO- % DE SATURACION A 0 °C  
 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100  
 Gramos de sulfato de amonio sólido para agregar a 100 ml de solución

<b>0</b>	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
<b>5</b>	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
<b>10</b>	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
<b>15</b>	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.4	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
<b>20</b>	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
<b>25</b>		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.2	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
<b>30</b>			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
<b>35</b>				0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
<b>40</b>					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8
<b>45</b>						0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
<b>50</b>							0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8
<b>55</b>								0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3
<b>60</b>									0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.9	27.9
<b>65</b>										0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4
<b>70</b>											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
<b>75</b>												0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4
<b>80</b>													0	3.3	6.7	10.3	13.9
<b>85</b>														0	3.4	6.8	10.5
<b>90</b>															0	3.4	7.0
<b>95</b>																0	3.5
<b>100</b>																	0



**Concentración inicial de sulfato de amonio- % de saturación**

Fuente: De morales, 1993

**Anexo 5: Fotografía que muestra una imagen a diferentes concentraciones de enzima**



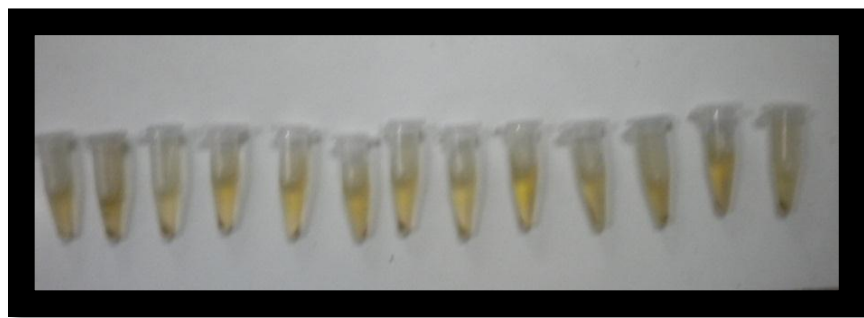
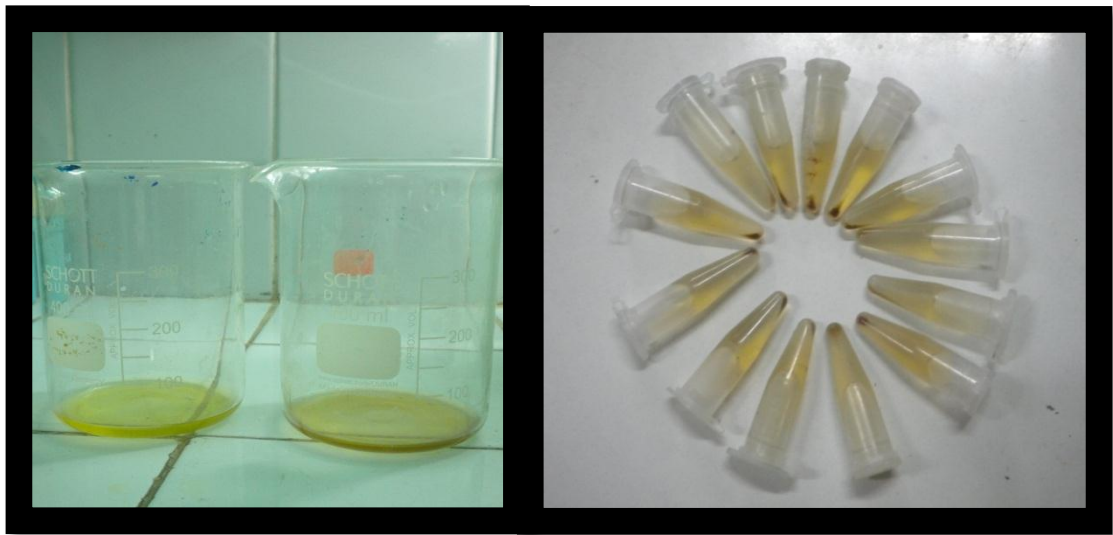
Fuente: Elaboración propia.

**Anexo 6: Fotografías que muestran la imagen de los blancos de evaluación y algunos de los diferentes sustratos evaluados.**



Fuente: Elaboración propia.

**Anexo 7: Fotografías que muestran imágenes de la concentración por precipitación con sulfato de Amonio al 60 %**



Fuente: Elaboración propia.

**Anexo 8: Fotografías que muestran la imagen de concentración por precipitación con sulfato de Amonio al 90 %**



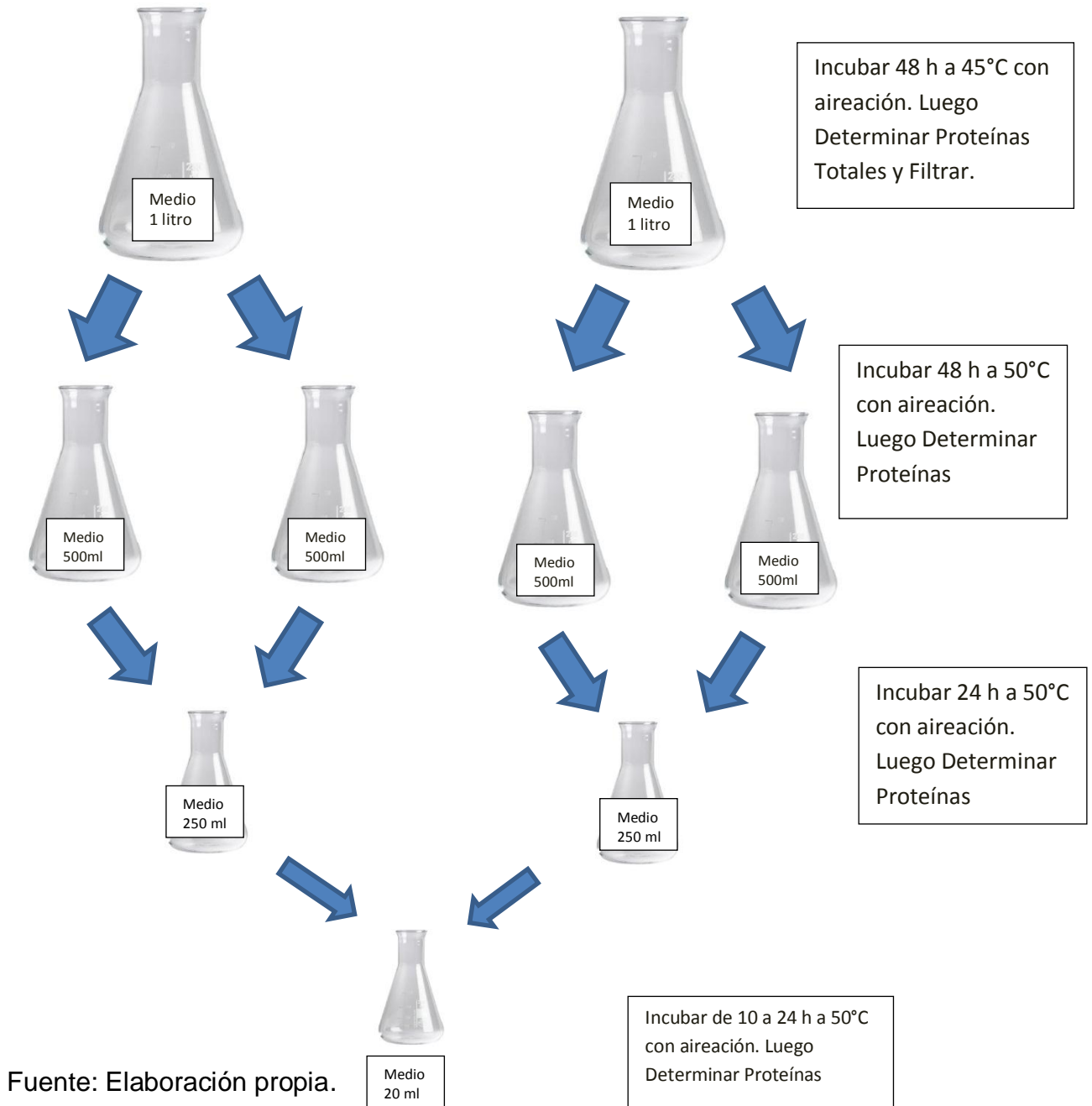
Fuente: Elaboración propia.

**Anexo 9: Fotografías que muestran la imagen de la determinación de proteínas totales de concentrado y sobrenadante.**



Fuente: Elaboración propia.

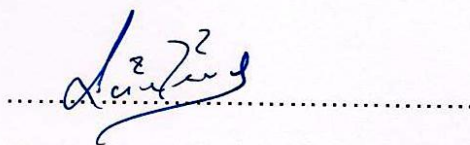
## Anexo10:Método de concentración por evaporación



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Roberto Castellanos Cabrera', written over a horizontal dotted line.

Dr. Roberto Castellanos Cabrera

ASESOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Israel José Salazar Quispe', written over a horizontal dotted line.

Bach. Israel José Salazar Quispe

TESISTA