

**“UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO
NARRO”**



**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“Aislamiento y purificación de bacterias de aguamiel con
capacidad de producción de la enzima celulasa”**

TESIS

Presentada por:

MARÍA ISABEL APOLINAR EVARISTO

Para obtener el grado de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila; México

Abril 2014

“UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“Aislamiento y purificación de bacterias de aguamiel con
capacidad de producción de la enzima celulasa”**

TESIS:

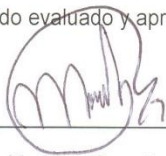
Que se somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presentada por:

MARÍA ISABEL APOLINAR EVARISTO

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité:



Dr. Mario A. Cruz Hernández

PRESIDENTE



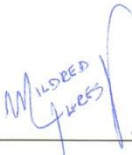
M.C. Armando Robledo Olivo

SINODAL I



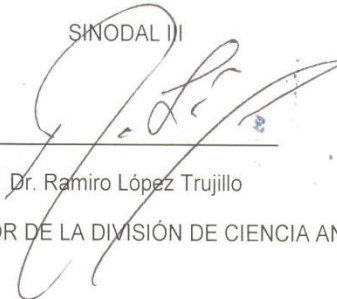
Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

SINODAL II



M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui

SINODAL III



Dr. Ramiro López Trujillo

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México Abril de 2014

AGRADECIMIENTOS

Después de tanto tiempo y esfuerzo la recompensa es grande.

A mis padres José Luis y Magdalena quienes desde que este proyecto inició han sido un gran pilar para llevar a cabo cada una de mis metas, siempre me han brindado su cariño y apoyo en todo momento por que cada uno de mis triunfo y fracaso lo han hecho suyo.

A mis hermanos Betty, Lore y Nando quienes han estado conmigo en las buenas y en las malas y me apoyan incondicionalmente y ser mi más grande apoyo en todo momento, los quiero mucho.

Al Dr. Mario A. Cruz Hernández, Dr. Armando Robledo Olivo, M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui y a la Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez por su apoyo incondicional en este momento importante.

A mis amigas Claudia, Lucky, Idalia, Dulce las cuales siempre me apoyaron en todo momento y por brindarme siempre su amistad.

A cada una de las personas las cuales fueron mi apoyo durante mi estancia aquí y por formar siempre parte de mi vida, los quiero.



En todo momento debes de estar presente en el presente por que cuando una puerta de felicidad se cierra, otra se abre pero con frecuencia miramos tanto a la puerta cerrada que no somos capaces de ver la puerta que se ha abierto frente a nosotros y dejamos ir tantas oportunidades.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1. RESUMEN.....	1
CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN.....	2
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	4
3.1 JUSTIFICACIÓN.....	4
3.2 HIPÓTESIS.....	4
3.3 OBJETIVOS.....	5
3.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	5
3.3.2 OBJETIVO ESPECIFICO.....	5
CAPÍTULO 4. MARCO TEÓRICO.....	6
4.1 AGUAMIEL.....	7
4.1.1 MICROORGANISMOS DE AGUAMIEL.....	7
4.2 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	9
4.2.1 MÉTODOS DE AISLAMIENTO.....	9
4.2.2 CRECIMIENTO MICROBIANO.....	10
4.2.3 CULTIVO PURO.....	11
4.3 CLASIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	12
4.3.1 BACTERIAS.....	12
4.3.2 LEVADURAS.....	16
4.4 IDENTIFICACIÓN POR CROMOFOROS.....	17
4.5 FERMENTACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	18
4.5.1 FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO.....	18
4.6 DEFINICIÓN DE ENZIMA.....	20
4.6.1 CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS.....	21
4.7 CELULOSA.....	22
4.7.1 CELULASAS.....	23
4.7.2 TIPO DE CELULASA.....	24
4.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	26
4.8.1 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASA.....	27
4.9 FACTORES QUE DETERMINA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CELULASAS.....	28
4.9.1 SINERGISMO.....	28
4.9.2 ABSORCIÓN.....	28
4.10 FACTORES QUE AFECTAN LA DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA.....	29
4.10.1 RELACIÓN ENZIMA SUSTRATO.....	29
4.10.2 TEMPERATURA.....	30
4.10.3 POTENCIAL DE HIDROGENO.....	32
CAPÍTULO 5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	34
5.1 CONTROL INICIAL Y PROPAGACIÓN DEL MICROORGANISMO.....	34
5.1.1 MICROORGANISMO EMPLEADO.....	34
5.1.2 CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.....	34
5.1.3 TINCIÓN DE GRAM.....	35
5.1.4 PRESERVACIÓN DEL MICROORGANISMO EN GLICEROL-LECHE DESCREMADA.....	36
5.2 DETERMINACIÓN DE PRUEBAS CUALITATIVAS.....	37
5.2.1 ACTIVIDAD CELULOLÍTICA.....	37
5.3 DETERMINACIÓN DE PRUEBAS CUANTITATIVA Y CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN.....	38

5.3.1 FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO.....	38
5.3.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	38
5.3.3 CONDICIONES DE LA FERMENTACIÓN.....	40
5.3.4 EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO.....	41
5.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	41
5.4.1 DETERMINACIÓN DE ENDOGLUCANASA.....	41
5.4.2 CUANTIFICACIÓN DE U/ ML.....	44
5.4.3 EVALUACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES.....	44
5.4.4 CUANTIFICACIÓN DE FPU/ML.....	46
5.4.5 EVALUACIÓN DE AZUCARES TOTALES.....	46
5.4.6 DETERMINACIÓN DE BIOMASA.....	47
CAPÍTULO 6 RESULTADOS.....	48
6 .1 MICROORGANISMOS INICIALES.....	48
6.2 DETERMINACIÓN DE PRUEBAS CUALITATIVAS.....	48
6.2.1 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS.....	48
6.3 DETERMINACIÓN DE PRUEBAS CUANTITATIVAS.....	49
6.3.1 EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE LAS CEPAS AISLADAS.....	49
6.4 CONDICIONES ÓPTIMAS DE LAS ENZIMAS.....	55
6.4.1 POTENCIAL DE HIDROGENO Y TEMPERATURA ÓPTIMA DE LAS CELULASA.....	55
6.4.2 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA DE CELULASA.....	56
CAPÍTULO 7 CONCLUSIÓN.....	57
CAPÍTULO 8 ANEXOS.....	59
CAPÍTULO 9 BIBLIOGRAFÍA.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG. 1. SIEMBRA SOBRE AGAR.....	9
FIG. 2. CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.....	11
FIG. 3. MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS.....	12
FIG.4. MORFOLOGÍA DE LAS BACTERIAS.....	14
FIG. 5. BACILOS GRAM POSITIVO.....	15
FIG. 6. COCOS GRAM POSITIVO.....	15
FIG.7. LEVADURAS GRAM POSOTIVO.....	16
FIG. 8. AGAR CONGO SIN INOCULO.....	17
FIG.9. AGAR ROJO CONGO INOCULADO CON BACILOS.....	17
FIG. 10. FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO.....	19
FIG.11 MODELO DE LA MOLÉCULA DE CELULOSA UNIDA POR PUENTES DE HIDROGENO.....	23
FIG. 12. GLUCOSA DESPUÉS DE LA HIDRÓLISIS DE CELULOSA.....	23
FIG.13. CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO SOBRE EL ÍNDICE DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	29
FIG.14. CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA EN LA VELOCIDAD ENZIMÁTICA.....	30
FIG. 15. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCIÓN...	31
FIG.16. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DE UNA ENZIMA.....	32
FIG. 17. EFECTO DEL PH EN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN DE UNA ENZIMA.....	33
FIG. 18. EFECTO DEL PH EN LA ESTABILIDAD DE UNA ENZIMA.....	33

FIG. 19. MICROORGANISMOS PRESERVADOS EN GLICEROL Y LECHE DESCREMADA.....	37
FIG.20. TESTIGO DEL AGAR ROJO CONGO.....	38
FIG. 21 INOCULACIÓN A 32°C.....	38
FIG. 22. CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO.....	38
FIG. 23. APLICACIÓN DE LA MUESTRA SOBRE LA CÁMARA DE NEUBAUER.	39
FIG.24. DIAGRAMA PARA CONTEO DE ESPORAS.	39
FIG. 25. FILTRADO DE LAS MUESTRAS	41
FIG. 26. MUESTRAS EN TUBOS CORNING.	41
FIG.27. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA MUESTRA BA1 (BACILOS DE AGUAMIEL 1).....	50
FIG. 28. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA MUESTRA BA3 (BACILOS DE AGUAMIEL 3).....	51
FIG. 29. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA MUESTRA CA1 (COCOS DE AGUAMIEL 1).....	51
FIG. 30. COMPARACIÓN DE LAS TRES CEPAS EN ESTUDIO.....	52
FIG. 31 ANÁLISIS DE LA CEPA BA1 Y BA3 EN LA PRUEBA DE ENDOGLUCANASA POR EL METODO DE MILLER (1989).....	52
FIG. 32 ANÁLISIS DE CEPA BA1 Y BA3 POR DUPLICADO EN LA PRUEBA DE EXOGLUCANASA.....	53
FIG. 33 CEPA FINAL BA 1 ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA.....	54
FIG. 34 CEPA FINAL BA 1 ACTIVIDAD EXOGLUCANASA.....	54
FIG. 35 CEPA BA1 BIOMASA.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. MICROORGANISMO DE AGUAMIEL.....	8
TABLA 2. BACTERIAS CON ALTA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE CELULASAS.....	27

1.- RESUMEN

Las épocas han cambiado, la sociedad demanda productos de mejor calidad y en mayor cantidad para lograr satisfacer las necesidades de la misma.

Algunos microorganismos, como las bacterias (ya sean anaerobias o aerobias) tienen la capacidad para producir enzimas, la producción de enzimas gracias a estos microorganismos depende de diferentes factores como lo son la temperatura, disponibilidad de nutrientes, entre otras, las cuales pueden llegar a afectar la producción de las mismas.

Dentro de la industria existen diferentes enzimas de gran importancia, una de ellas es la celulasa en la industria alimentaria las cuales favorecen la extracción y filtrado de jugos de frutas y verduras, filtrado de mostos, extracción de aceites comestibles ya que es una enzima que hidroliza el puente glicosídico entre dos o más carbohidratos, estos metabolitos son usados en diferentes sectores de la industria.

Las enzimas producidas por microorganismos son más estables que las obtenidas de vegetales y animales, éstas nos proporcionan un buen rendimiento en los procesos y mejores resultados durante una fermentación para obtener una buena producción de enzimas.

Las bacterias de aguamiel fueron evaluadas en sus características cualitativas en donde se conoce la capacidad degradadora celulolítica o no del microorganismo y sus características cuantitativas para conocer la capacidad endo y exo de los microorganismos para la producción de la enzima en estudio.

Los estudios cinéticos en fermentaciones en medio líquido por bacterias se ha tornado un tema de importancia debido a la capacidad y rentabilidad de estos metabolitos en diferentes sectores de la industria.

PALABRAS CLAVE: Bacterias, celulasa, fermentación en medio líquido.

2.- INTRODUCCIÓN

Los conocimientos microbiológicos son muy amplios, queda por conocer más sobre estos organismos, constantemente se efectúan nuevos conocimientos referentes a ésta área. La microbiología es la ciencia encargada del estudio de los microorganismos, seres vivos pequeños que solo son visibles a través del microscopio, existen diferentes tipos de organismos entre los cuales podemos encontrar a las procariotas (células sin núcleo definido) y las eucariotas (células con núcleo).

La biotecnología estudia la explotación de los microorganismos para el uso de procesos industriales como lo son las fermentaciones industriales.

Estos organismos se han aprovechado en diferentes áreas como lo son obtención de alimentos, medicamentos e incluso en la industria textil.

Algunos microorganismos, como las bacterias (ya sean anaerobias o aerobias) tienen la capacidad para producir enzimas; ésto se ha tornado de gran importancia debido a la capacidad y rentabilidad de estos metabolitos en diferentes sectores siendo uno de ellos la industria alimentaria, enfocándose en una bebida tradicional como lo es el aguamiel del cual se han realizado pocos estudios referentes a los microorganismos presentes en éste.

La producción de enzimas gracias a estos microorganismos depende de diferentes factores como lo son la temperatura, disponibilidad de nutrientes, entre otras, las cuales pueden llegar a afectar la producción de las mismas.

Dentro de la industria existen diferentes enzimas de gran importancia, una de ellas es la celulasa ya que cuenta con una gran rama de aplicaciones en la industria alimentaria; favorece la extracción y filtrado de jugos de frutas y verduras, filtrado de mostos, extracción de aceites comestibles ya que son enzimas que hidrolizan el puente glicosídico entre dos o más carbohidratos.

Uno de los procesos por los cuales se puede llegar a producir enzimas es la fermentación en medio líquido la cual es adecuada para bacterias. Este tipo de fermentación trae muchos beneficios ya que es un proceso muy sencillo y de bajo costo, además de que se obtienen volúmenes considerables de producción de enzimas.

3.- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la industria alimentaria y otras han tenido que cambiar y optimizar sus procesos ya que la sociedad demanda mayor cantidad de productos y de mejor calidad, por eso se han buscado nuevas alternativas para satisfacer las necesidades de la misma.

La producción de enzimas a gran escala utilizando fermentaciones en medio líquido para bacterias trae ventajas ya que es un método sencillo y de bajo costo y con gran rentabilidad en el mercado.

En el presente proyecto se realizó una evaluación de producción de la celulasa por bacterias aisladas del aguamiel. Se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro bajo el proyecto de investigación “Aislamiento y evaluación cinética de la producción de prebióticos en medio de cultivo alternativo para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales”.

HIPÓTESIS

Las bacterias aisladas de aguamiel producirán enzimas celulolíticas en fermentación en estado líquido empleando celulosa como sustrato.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ④ Producir la enzima celulasa a través de bacterias aisladas de aguamiel en un medio de cultivo líquido utilizando como fuente de carbono carboximetil celulosa de sodio (CMC de Na)

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ④ Realizar la purificación e identificación macroscópica de las bacterias del aguamiel.
- ④ Realizar cinética de las fermentaciones en medio líquido para la síntesis de celulasa.

4.- MARCO TEÓRICO

Las enzimas son utilizadas en diversos procesos industriales ya sea convencional, como el tratamiento de basura, conversión de desechos vegetales en fertilizantes o alimentos para animales en nuevos procesos como en la industria textil o la fabricación de detergentes. Dentro de la industria alimentaria las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles y en hidrólisis parcial de materiales lignocelulósicos mejorando la digestión de los rumiantes (Immanuel *et al.*, 2007).

Las celulasas incrementan la producción de extracto de productos vegetales, debido a que produce la liberación de componentes del tejido además de liberar el compuesto extra que se encuentra encerrado dentro de las células. Por otra parte, los dominios de unión a celulosa se han usado con gran éxito sobre una matriz de celulosa para facilitar la purificación de proteínas recombinantes (Immanuel *et al.*, 2007).

Actualmente las celulasas comerciales provienen de especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* (Zhang *et al.*, 2006) y se están estudiando nuevas especies como las bacterias aisladas en este proyecto.

Sin embargo la cantidad de enzima producida por estos microorganismos es todavía motivo de múltiples investigaciones, puesto que existen diversos factores involucrados, entre ellos el medio de cultivo para la fermentación y sus concentraciones, pH y temperatura que juega un rol determinante ya que de estas condiciones depende el éxito de la producción de la enzima.

AGUAMIEL

El aguamiel es un líquido de color ambarino que se obtiene del agave y es considerada una bebida no alcohólica. Es conocido desde la antigüedad, esta bebida es característica por su sabor dulce por la fructosa que contiene, debido al alto contenido de proteínas, vitaminas, calcio, fibra y minerales es considerado como un alimento (Peña *et al.*, 2004)

Ésta se ha consumido en los pueblos indígenas y en gran parte del país como una bebida tradicional a lo largo de los años esta costumbre se ha ido perdiendo.

Para lograr la conservación del aguamiel se somete a un tratamiento térmico la savia del maguey, logrando así extender su vida útil a un promedio de 15 días en refrigeración, esto se puede lograr destruyendo los microorganismos, que se encuentran presentes en el aguamiel de forma natural e inactivar las enzimas que puedan ayudar a la degradación de la bebida (Escalante *et al.*, 2004)

MICROORGANISMOS DE AGUAMIEL

El aguamiel si caracteriza por ser un líquido fresco no fermentado rico en azúcares, de fácil asimilación y proteínas que mantiene una población microbiana en espera de condiciones ambientales y nutricionales apropiadas para su propagación dentro de este medio.

El aguamiel contiene diferentes tipos de microorganismos entre los cuales podemos encontrar levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacáridos (Escalante *et al.*, 2004).

Estos microorganismos transforman de manera natural gran parte de los azúcares disponibles en el aguamiel.

La literatura reporta que apartir del aguamiel se pueden recuperar diversos grupos de microorganismos clasificados como:

Microorganismos del aguamiel		
Bacillus	Proteobacterias	Hongos
<i>Lactobacillus– Streptococcus</i> (<i>Lactobacillus cepa ASF360 AFI</i> 57050,	<i>Acetobacter</i> <i>pomorium</i> AJ001632,	<i>Sacharomyces</i> <i>cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus acidophilus M99740,</i> <i>L. hilgardii M58521</i>	<i>Zymomonas mobilis</i> AF281034)	<i>Sacharomyces sp</i>
<i>L. plantarum D79210</i>		
<i>Leuconostoc mesenteroides spp</i> <i>mesenteroides),</i>		

Tabla 1. Microorganismo de Aguamiel (Escalante *et al.*, 2004)

En la actualidad se conoce el efecto benéfico de ciertos grupos microbianos del aguamiel sobre el sistema digestivo de humanos y animales, la gran cantidad de estos microorganismos ingeridos por vía oral pueden actuar en diferente niveles como lo es en la reducción de enzimas tales como nitroreductasas, azoreductasas y glucoronidasas que se han asociado con ciertos tipos de cáncer gástrico; efecto antimicrobiano por la producción de ácidos orgánicos, enzimas , bacteriocinas y competencia por nutrientes con los patógenos intestinales (Maldonado *et al.*, 2001).

El aguamiel es un sustrato nutricionalmente enriquecido que favorece el crecimiento de poblaciones microbianas; las cuales utilizan compuestos del aguamiel como fuente de carbono y energía para producción de nuevas células, acompañado de la formación de productos de fermentación.

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.

El aislamiento de microorganismos en partículas de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos.

El crecimiento explosivo de las bacterias permite producir un gran número de ellas a partir de una única célula inicial de forma que tras un período de incubación en las condiciones adecuadas, se produce una colonia observable a simple vista y formada por individuos iguales. Existen procedimientos para facilitar el aislamiento de bacterias de ambientes naturales, uno de ellos es la Columna de Winogradsky.

METODOS DE AISLAMIENTO

Siembra por dilución: Éste requiere exclusivamente de un cultivo en medio líquido con la finalidad de poner las bacterias en suspensión.

Siembra por estrías en superficie: Se siembra el material en la superficie del agar inclinado en un tubo de ensayo.

Siembra por estría por agotamiento: Se realiza sobre una placa de agar solidificada en una caja Petri (Figura 1), con este procedimiento se puede conseguir una buena separación de las colonias y aislarlas fácilmente (Dulbecco *et al.*, 1990)



Figura 1. Siembra sobre Agar

Por picadura o punción: Este método se utiliza para estudiar la movilidad de las bacterias.

CRECIMIENTO MICROBIANO

La vida de un microorganismo se divide en 4 fases en las cuales se adapta al medio en el cual está creciendo hasta llegar a su muerte.

- 1. Fase lag o de adaptación:** En esta fase los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones del cultivo nuevo) para después iniciar la fase de crecimiento exponencial.
- 2. Fase exponencial o logarítmica:** En ella, la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo, durante esta fase los microorganismos consumen a velocidad máxima todos los nutrientes.
- 3. Fase estacionaria:** En ella no se incrementa el número de microorganismos (ni la masa u otros parámetros de cultivo). Los microorganismos en esta fase desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial. Los microorganismos entran en esta fase por que se agota algún nutriente esencial del medio o por que los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano.
Esta fase tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor claridad el estado metabólico de los microorganismos en los ambientes naturales.
- 4. Fase de muerte:** Se produce una reducción del número de microorganismos viables del cultivo (Prescott *et al.*, 1999)

Las cuatro fases del crecimiento bacteriano pueden ser observadas en la Figura 2.

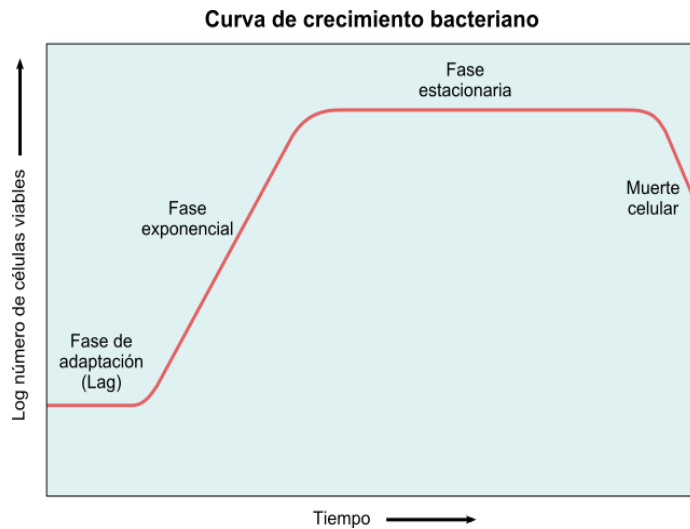


Figura 2. Curva de crecimiento bacteriano (Prescott et al., 1999)

CULTIVO PURO

Se le denomina cultivo puro al que contiene un solo tipo de microorganismo. Éstos se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos cuenten con la misma composición genética.

Los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de los microorganismos y para poder ser identificarlos con seguridad.

Los cultivos puros pueden ser de diferentes microorganismos como lo son hongos, bacterias o levaduras cada uno de éstos cuentan con las mismas características ya que son un copia de la carga microbiana sembrada.

Se puede observar macroscópicamente la morfología de las colonias y así observar a simple vista si los cultivos están o no puros y podemos utilizar estas características para saberlo (Figura 3) (Benson, 1979)

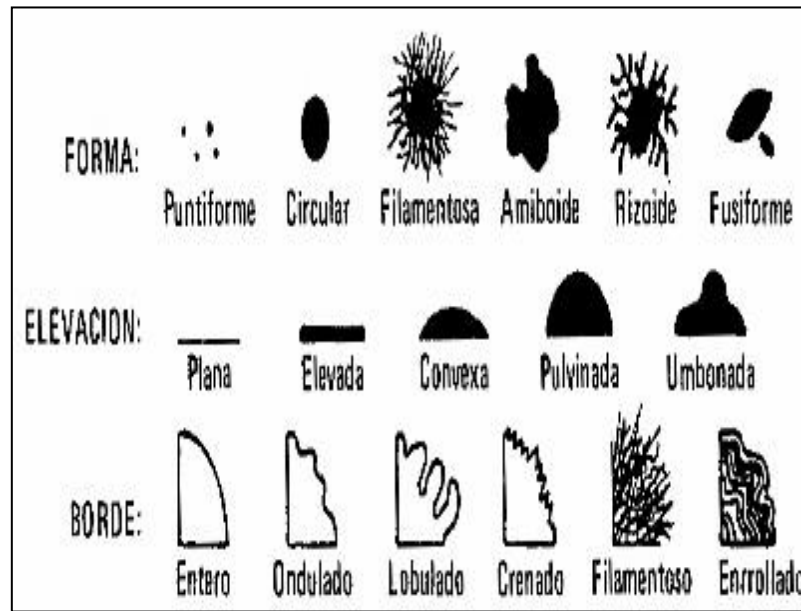


Figura 3. Morfología de las colonias (Seeley et al., 1972)

CLASIFICACION DE MICROORGANISMOS

BACTERIAS

Microorganismos procariotas, algunas presentan cápsula y otras son capaces de evolucionar a esporas, formas viables capaces de resistir condiciones extremas. Sus dimensiones son muy reducidas, unas 2 micras de ancho por 7 u 8 de longitud en la de forma cilíndrica de tamaño medio; aunque son muy frecuentes las especies de 0,5-1,5 micras. (Anónimo, 2006). Pueden presentar flagelos generalmente rígidos, implantados en la membrana mediante un corpúsculo basal (Prescott et al.,1999)

Pueden poseer también, fimbrias o pili muy numerosos y cortos, que pueden servir como pelos sexuales para el paso de ADN de una célula a otra. Poseen ARN y ribosomas característicos, para la síntesis de proteínas. La pared celular es rígida

y con moléculas exclusivas de bacterias. El citoplasma presenta un aspecto viscoso, y en su zona central aparece un nucleoide que contiene la mayor parte del ADN bacteriano, y en algunas bacterias aparecen fragmentos circulares de ADN con información genética, dispersos por el citoplasma: son los plásmidos.

La forma de las bacterias es muy variada y, a menudo, una misma especie adopta distintos tipos morfológicos, lo que se conoce como polimorfismo. Se pueden distinguir tres tipos fundamentales de bacterias:

Coco: De forma esférica.

- *Diplococo*: cocos en grupos de dos.
- *Tetracoco*: cocos en grupos de cuatro.
- *Streptococo*: cocos en cadenas.
- *Estafilococo*: cocos en agrupaciones irregulares o en racimo.

Bacilo: Forma de bastoncillo.

Formas helicoidales

- *Vibrio*: ligeramente curvados y en forma de coma, judía o cacahuete.
- *Espirilo*: en forma helicoidal rígida o en forma de tirabuzón.
- *Espiroqueta*: en forma de tirabuzón (helicoidal flexible).

Algunas especies presentan incluso formas tetraédricas o cúbicas. Esta amplia variedad de formas es determinada en última instancia por la composición de la pared celular y el citoesqueleto, siendo de vital importancia, ya que puede influir en la capacidad de la bacteria para adquirir nutrientes, unirse a superficies o moverse en presencia de estímulos (Joklik *et al.*, 1994)

Existe diferente morfología de bacterias en las cuales se pueden clasificar por su forma en diversos grupos (Figura 4).

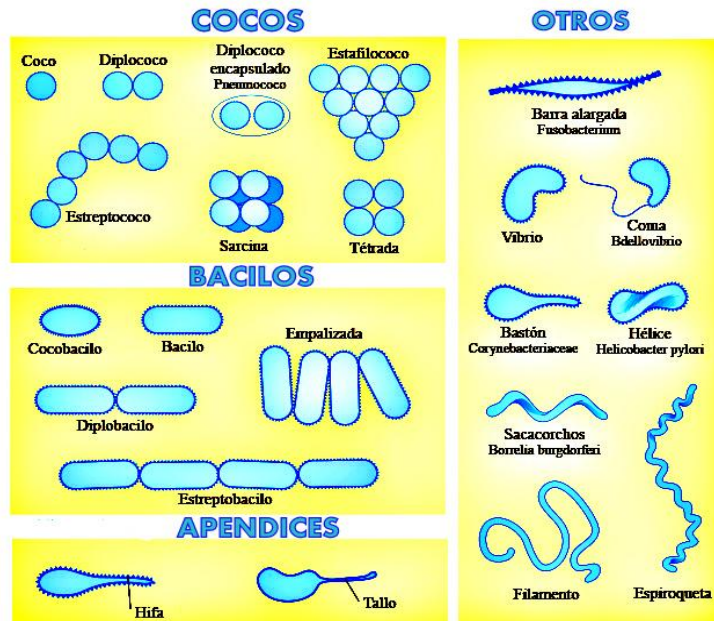


Figura 4. Morfología de las bacterias (Prescott et al.,1999)

Bacilos

Bacilo se usa para describir cualquier bacteria con forma de barra o vara (Figura 5), pueden encontrarse en muchos grupos taxonómicos diferentes tipos de bacterias. Sin embargo el nombre *Bacillus*, se refiere a un género específico de bacteria. El otro nombre *Bacilli*; hace referencia a una clase de bacterias que incluyen dos órdenes, uno de los cuales contiene al género *Bacillus*.

Los bacilos son bacterias que se encuentran en diferentes ambientes y solo se pueden observar con un microscopio.

Aunque muchos bacilos son patógenos para el ser humano, algunos no hacen daño, pues son los encargados de producir algunos productos lácteos como el yogur (lactobacilos) (Ballows et al., 1991)



Figura 5. Bacilos Gram positivo

Cocos

Los cocos son bacterias que tienen forma esférica (Figura 6). Es una de sus tres formas celulares. Proviene del neolatín *coccus*, que a su vez proviene del griego *kokkos* (κόκκος) que significa "baya".

Clasificación de los cocos según su forma.

Diplococos: Son los que se agrupan en pares; abarcan varios géneros diferentes. *Streptococcus* es un género que se agrupa en cadenas llamadas estreptococos. *Sarcina* es un género que se agrupa en forma cuboide en grupos de 8 células. *Staphylococcus* es un género agrupado en clústeres de 4 células o en forma de racimo de uvas de forma irregular, y se les llama estafilococos (García *et al.*,1996).

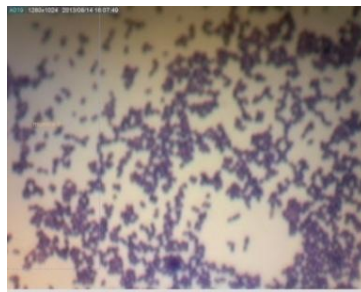


Figura 6. Cocos Gram positivo.

LEVADURAS

Es cualquiera de los diversos hongos microscópicos unicelulares (Figura 7), son importantes por su capacidad para realizar la descomposición mediante fermentaciones de diversos cuerpos orgánicos, principalmente los azúcares o hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias para la producción de enzimas.

Las levaduras se reproducen asexualmente por gemación o brotación y sexualmente mediante ascosporas o basidiosporas. Durante la reproducción asexual, una nueva yema surge de la levadura madre cuando se dan las condiciones adecuadas, tras lo cual la yema se separa de la madre al alcanzar un tamaño adulto. En condiciones de escasez de nutrientes, las levaduras que son capaces de reproducirse sexualmente formarán ascosporas. Las levaduras que no son capaces de recorrer el ciclo sexual completo se clasifican dentro del género *Candida* (Davidson P. M. 1997)

La levadura es la primera célula eucariota en la que se ha intentado expresar proteínas recombinantes debido a que es de fácil uso industrial: es barata, cultivarla es sencillo y se duplica cada 90 minutos en condiciones nutritivas favorables. Además, es un organismo fácil de modificar genéticamente, lo que permite realizar experimentos en varios días o semanas. Sin embargo, las levaduras poseen un mecanismo de glicosilación diferente al que se encuentra en células humanas, por lo que los productos son inmunogénicos (Beuchat L. R., 1997).

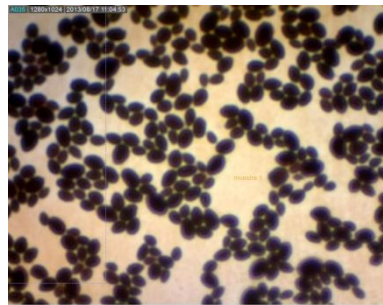


Figura 7. Levaduras

IDENTIFICACIÓN POR CROMÓFOROS

Existen diferentes métodos utilizados en la identificación y enumeración de los microorganismos capaces de utilizar la celulosa, siendo la base de éstos la hidrólisis de sustratos celulósicos. La utilización de medios líquidos que contienen celulosa permiten estimar cualitativa y cuantitativamente los microorganismos degradadores, los medios sólidos son generalmente más usados pero en éstos las colonias de microorganismos que utilizan el sustrato son con frecuencia difíciles de diferenciar de otros microorganismos que no lo hacen. Teather y Wood en 1982, observaron que el rojo congo (Figura 8) podía ser usado en los tubos de ensayo para evidenciar la hidrólisis de polisacáridos debido a que el colorante forma complejos con las moléculas aún no hidrolizadas, se ha usado en diferenciación de cepas patógenas de *Escherichia coli* (Berkhoff & Vinal 1986), facilitando así la diferenciación entre microorganismos celulolíticos y no celulolíticos por la formación de zonas de aclaramiento o pardeamiento (Figura 9) alrededor de las colonias (Hendricks, *et al.*, 1995) así como para el aislamiento de *Azospirillum* (Hernandez *et al.*, 2000), contiene una alta afinidad por los polisacáridos y ha sido utilizado para el diagnóstico de la amiloidosis (Bély *et al.*, 2006),



Figura 8. Agar rojo congo sin inóculo.



Figura 9. Agar rojo congo inoculado.

FERMENTACIÓN DE MICROORGANISMOS

El proceso de fermentación se conoce desde hace mucho tiempo, sin embargo cada día se estudian nuevas técnicas para mejorar esta área ya sea mediante mejoramiento del microorganismo (por ingeniería genética, fusión de protoplastos, mutagénesis y otras técnicas de microbiología aplicada) o la selección de métodos óptimos, así como el control de los diversos parámetros que determinan el crecimiento y producción de microorganismos (Swings *et al.*, 1977).

Mediante las fermentaciones es posible la producción de compuestos de gran valor agregado ya que este método es de bajo costo y con una productividad alta, lo cual trae beneficios para el sector en el cual se emplee (Wingren *et al.*, 2008).

Se pueden distinguir dos tipos de fermentaciones según el estado del medio de cultivo los cuales son: sólidas y líquidas.

Fermentación en medio sólido

Ésta definida como fermentación e ausencia (o cerca a la ausencia) del agua con libre flujo (Singhania *et al.*, 2009), sin embargo el sustrato posee cierto grado de humedad para soportar el crecimiento y metabolismo del microorganismo (Pandey, 2002; Raghavarao & Ranganathan, 2003)

FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

En ésta los nutrientes se encuentran suspendidos en un medio acuoso (Figura 10) junto con los microorganismos y son agitados para conservar la homogeneidad del sistema, se desarrollan flotando libremente en el volumen de medio de cultivo. Este tipo de cultivos se denomina en ocasiones cultivo sumergido.

El diseño de un fermentador líquido requiere tener en cuenta una serie de factores que influyen en el crecimiento, y en el rendimiento del microorganismo durante el proceso: temperatura, pH, movimiento, etc (Jackson, 1997; Tavorsky, 1992).

Tienen especial importancia dos problemas: la agitación destinada a asegurar una mezcla correcta de los ingredientes del medio y de los microorganismos que crecen en este tipo de fermentación y la humedad alta que facilita el crecimiento de microorganismos ya sean bacterias u hongos (Tavorsky, 1992).

Los requerimientos de energía son muy bajos, se producen pocos desechos líquidos y permite la producción de metabolitos en mayor concentración, se genera una reducción en el volumen del equipo por unidad de sustrato bio-convertido.

La elección del sustrato es la parte clave para el éxito del crecimiento del microorganismo en la fermentación ya que éste debe de proporcionar los nutrimentos necesarios y permitir la transferencia de oxígeno ya que el crecimiento de los microorganismos depende de la interacción del O_2 y el CO_2 ; así como la formación de enzimas y los productos metabólicos.

Los parámetros con las que debe de contar la fermentación a su inicio son contenido de humedad, pH, verificar si el sustrato requiere un pre-tratamiento, humedad relativa, temperatura de la incubación, agitación de la fermentación, cantidad del inóculo, adición de nutrientes como fuente de carbono. Altos contenidos de humedad, afectan la porosidad del sustrato así como el paso de oxígeno, además de promover una contaminación microbiana; del mismo modo la actividad de agua del sustrato influye en la actividad microbiana (Alquicira, 2003).



Figura 10. Fermentación en medio líquido.

DEFINICION DE ENZIMA

Las enzimas son proteínas de estructura tridimensional sumamente compleja, son biocatalizadores cuya función es acelerar ciertas reacciones bioquímicas específicas que forman parte del proceso metabólico de las células. Aceleran en el organismo diversas reacciones químicas que en condiciones normales solo tendrían lugar muy lentamente o no se producirían en absoluto (Bühleyr *et al.*, 1998), por lo general éstas afectan o no el equilibrio de una reacción, sino que simplemente la aceleran hasta alcanzar el equilibrio (Alquicira , 2003).

Prácticamente todas las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas. La sustancia sobre la que actúa la enzima se llama sustrato. El sustrato se une a una región concreta de la enzima, denominada centro activo (González J. M., 2010). El centro activo comprende:

- ② Un sitio de unión, formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato;
- ② Un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción.

Para la producción de enzimas de gran valor en la industria se utilizan diversas bacterias, levaduras y hongos; la síntesis de enzimas es esencial para estos microorganismos porque sus funciones vitales se mantienen gracias a las divisiones de sustratos y el metabolismo dependientes de las enzimas, las cepas seleccionadas o los microorganismos modificados genéticamente pueden producir cantidades de enzimas mucho mayores que en condiciones normales ya que dándoles las condiciones adecuadas como lo son temperatura, pH, disponibilidad de nutrimentos, se logrará obtener mejores volúmenes y se consideran más estables que las enzimas vegetales y animales (Carlón, 2007).

CLASIFICACION DE LAS ENZIMAS

Se pueden reconocer dos tipos de enzimas según el sitio donde actúen: enzimas intracelulares o endoenzimas (dentro de la célula) y extracelulares o exoenzimas (actúan fuera de la célula)..Éstas a su vez se dividen en diferentes clases y su nombre es adquirido de acuerdo a la molécula sobre la cual ejercen su acción catalítica (Julio G. Pereto, 2007)

- ④ **Oxidorreductasas:** Catalizan reacciones de oxidación-reducción es decir, transferencia de hidrógeno (H) o electrones (e) de un sustrato a otro. Entre las subclases de este grupo se encuentran deshidrogenasas, oxidasas, oxigenasas, reductasas, peroxidadasas.
- ④ **Transferasas:** Catalizan reacciones en las que hay una transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) de un sustrato a otro. Entre los ejemplos de estos grupos químicos están amino, carboxilo, carbonilo, metilo, fosforilo y acilo (RC=O).
- ④ **Hidrolasas.** Catalizan reacciones en las que se produce la ruptura de enlaces por la adición de agua (hidrólisis). Entre éstas encontramos a las estererasas, fostatasas y peptidasas.
- ④ **Liasas:** Catalizan reacciones de ruptura en las que se eliminan grupos (O₂, H₂O, CO₂ y NH₃) o soldaduras de sustratos para formar un doble enlace o se añaden a un doble enlace. Ejemplos: liasas, descarboxilasas, hidratadasas, dehidratadasas, desaminadasas y sintadasas.
- ④ **Isomerasas:** Se trata de un grupo heterogéneo de enzimas, las cuales catalizan varios tipos de reordenamiento intramolecular. Las epimeradasas catalizan la inversión de átomos de carbono asimétrico. Las mutadasas catalizan la transferencia intramolecular de grupos funcionales.
- ④ **Ligasas:** Catalizan la formación de un enlace entre dos moléculas de sustrato con hidrólisis simultanea de un nucleótido trifosfato (ATP, GTP, etc.). Los nombres de muchas ligadasas incluyen el término sintetadasa. Otras ligadasas se denominan carboxilasadasas.

CELULOSA

La celulosa es el componente más abundante que existe sobre la tierra, es producida por las plantas formando parte de su pared celular (Plomion *et al.*, 2001). En menos proporciones, es sintetizada también por algunos organismos como bacterias *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Sarcina* entre otras (Ross *et al.*, 1991; Czaja *et al.*, 2007).

La estructura química de la celulosa es un biopolímero lineal compuesto por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos tipo β 1-4 (Figura 11). Los extremos del polímero son asimétricos, los que contienen el carbono anomérico (C_1) libre de la molécula de glucosa puede reducir a un número de oxidantes (como el cobre), y se conocen como extremos reductores. Mientras que el C_4 con un radical hidroxilo libre es el extremo no reductor (Pettersen, 1984).

La celulosa es atractiva 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 enzimas necesarias para utilizarlo (Beguin & Aubert, 1994).

Existen dos tipos de celulosa la cristalina y amorfa. La primera es una celulosa purificada y parcialmente despolemerizada, blanca, inodora e insípido, es polvo cristalino compuesto por partículas porosas que en la industria alimentaria se usa para mantener la estabilidad de la emulsión y de la espuma, estabilizar altas temperaturas, mejorar la estabilidad del líquido, suplementos nutricionales y espesantes y la celulosa amorfa.

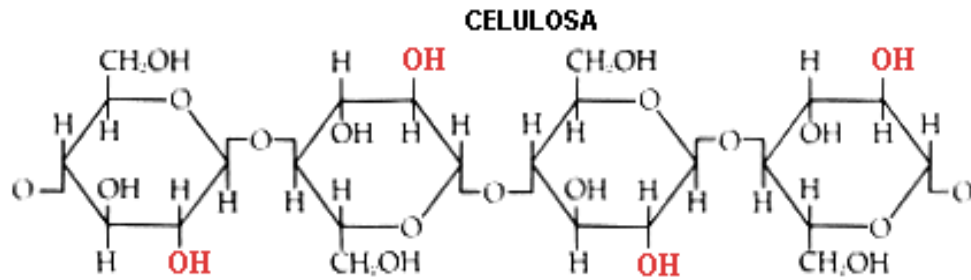


Figura 11 Modelo de la molécula de celulosa unida por puentes de hidrogeno (Pettersen, 1984).

CELULASAS

La celulasa es una enzima compleja especializada en descomponer celulosa, transformándola en múltiples monómeros de glucosa y utiliza dos mecanismos de hidrólisis del enlace glucosídico que generan dos posibles configuraciones estereoquímicas finales, esta enzima lleva a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición β (mecanismo de retención) y otro tipo en la que se pierde (mecanismo de inversión) (Figura 12) (Whithers, 2001).

Los animales no producen celulasa y para digerir más eficientemente a las plantas requieren de la actividad de los microorganismos en su estómago o intestinos; de tal modo que los animales herbívoros desarrollan "pequeñas cámaras fermentativas" en sus tractos digestivos (Cazamier *et al.*, 2003; Warnecke *et al.*, 2007).

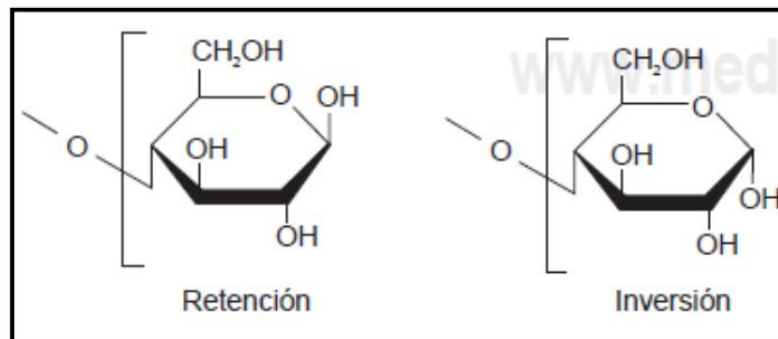


Figura 12. Glucosa después de la hidrólisis de celulosa (Whithers, 2001).

TIPO DE CELULASA

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinergista de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlaces, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa (Lee 1997).

El mecanismo aceptado para explicar la hidrólisis enzimática de la celulosa involucra la acción de las 3 enzimas: la endo β -1,4 glucanasa (β -1, 4 glucano hidrolasa), la exo β -1, 4 celobio hidrolasa y la β -1, 4 glucosidasa (Lymar *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2006). Éstas enzimas se describen a continuación.

Endoglucanasas

Hidrolizan aleatoriamente los enlaces β -1,4 glucosídicos intramoleculares accesibles de cadena de celulosa para producir oligosacáridos de varias longitudes. Éstas son 1,4- β D-glucanglucanohidrolasas (E.C. 3.2.1.4) que se agrupan en las familias 6, 8, 9 y 12 principalmente, de las glicosilhidrolasas (Henrissat & Bairoch, 1993; Goedegebuur *et al.*, 2002; Baldrian & Valaskova, 2008).

Actúan al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos y su actividad es con frecuencia medida sobre celulosa soluble con alto grado de polimerización, como es el caso de CMC (carboximetilcelulosa). La acción de las endoglucanasas sobre este sustrato celulósico se caracteriza por la disminución de la viscosidad realizando fracturas intramoleculares (Zhang *et al.*, 2006). Además la tasa de hidrólisis está condicionada a la habilidad de las endoglucanasas para actuar en las regiones amorfas de la matriz cristalina de la celulosa y crear nuevos extremos reductores en los cuales las exoglucanasas puedan actuar (Malherbe y Cloete, 2002).

La medición de la actividad de endoglucanasas puede ser basada en la reducción de la viscosidad del sustrato y/o en el incremento de extremos reductores que se determinan por técnicas que permitan medir azúcares reductores. Sin embargo, la actividad de las exoglucanasas también incrementa el número de extremos reductores por el cual, es recomendable que la actividad de las endoglucanasas sea medida por ambos métodos (viscosidad y extremos reductores) (Lynd *et al*, 2005).

Por otro lado, dicha actividad puede ser fácilmente detectada en medios con CMC o celulosa y adición de varios colorantes como rojo congo, debido a que éstos son absorbidos sólo por largas cadenas de polisacáridos. Este método es semi-cuantitativo y muy adecuado cuando se requiere procesar un gran número de muestras (Ten *et al*, 2004).

Exoglucanasas

Fragmentan los extremos reductores del sustrato generando unidades de celobiosa o glucosa. Éstas son las glucohidrolasas (1,4- β -D-glucohidrolasa, números de la comisión de enzimas 3.2.1.74); o celobiosas, las celobiohidrolasas (1,4- β -D-glucohidrolasas, número de la comisión de enzimas 3.2.1.91) (Baldrian & Valaskova, 2008).

Éstas fragmentan los extremos accesibles de la molécula de celulosa para liberar glucosa y celobiosa. La celulosa micro cristalina es un sustrato adecuado para la medición de la actividad por tener un bajo grado de polimerización y una baja accesibilidad (Lynd *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2006).

B-glucosidasas

Completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa o removiendo glucosas desde los extremos no reductores de pequeños celoligosacáridos. Son enzimas β -D- glucohidrolasas (EC 3.2.1.21), pertenecen a las familias 1 y 3 de las glicosil hidrolasas (Schmid & Wandrey, 1987; Lynd *et al.*, 2002; Baldrian & Valaskova, 2008).

Hidroliza la celobiosa soluble y otras celodextrinas con un grado de polimerización superior a 6 y la posterior producción de glucosa. La tasa de hidrólisis disminuye con el incremento en el grado de polimerización del sustrato. La actividad de esta enzima también puede ser medida usando celobiosa, la cual no se hidrolizará por la endoglucanasas ni exoglucanasas (Lynd *et al*, 2005).

Celulasas Totales

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

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática de las celulasas puede evaluarse de dos formas:

- ④ Medición de la actividad individual de cada celulasa (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas).
- ④ Medición de la actividad total de las celulasas (Zhang *et al*, 2006).

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASA

Entre los microorganismos productores de celulasa se encuentran bacterias y hongos aerobios y anaerobios, mesófilos y termófilos que ocupan una variedad de hábitats (Aubert, 1988).

Entre las bacterias degradadoras de la celulosa podemos encontrar las aerobias entre las cuales se puede mencionar: *Cellulomonas sp.*, *Microbispora bispora*, *Thermomonospora sp.*, *Cytophaga sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Vibrio sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Thermobifida sp.* Además algunas anaerobias como lo son *Acetovibrio cellulolyticus*, *Butirivibrio sp.*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides succinogenes*, *Clostridium cellulorans*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus*, *Rumimococcus flavefaciens* (Lynd, et al, 2002).

Bacterias con alta actividad específica de celulasas y pH óptimo para una buena actividad enzimática la cual se presenta en la Tabla 2.

Microorganismo	Actividad Específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	pH óptimo
<i>Bacillus subtilis</i>	514	5-7
<i>Clostridium thermocellum</i>	428	7
<i>Streptomyces murinus</i>	6.7	6
<i>Bacillus macerans</i>	5030	6
<i>Bacillus sp.</i>	369.6	9

Tabla 2. Bacterias con alta actividad específica de celulasas (Howard et al., 2003)

FACTORES QUE DETERMINA LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LAS CELULASAS

Existen diversos factores asociados al sistema enzimático de las celulasas, éste incluye la inhibición del complejo de celulasas por el producto final, inactivación térmica, sinergismo e irreversible adsorción de las enzimas, teniendo estos últimos la mayor influencia en la tasa de degradación del polisacárido (Mansfield *et al.*, 1999).

SINERGISMO

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

ABSORCIÓN

La hidrólisis de la celulosa difiere de otras reacciones enzimáticas en que el sustrato es insoluble y requiere una previa absorción de la enzima al sustrato. La absorción de las celulasas es facilitada por la presente de dominios en el sustrato los cuales son susceptibles al clivaje proteolítico mediante uniones por fuerzas de Van Der Waals y puentes de hidrógeno.

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

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

FACTORES QUE AFECTAN LA DEGRADACION ENZIMATICA

La metabolización de la celulosa está dada por diferentes factores los cuales afectan o benefician a la misma:

RELACIÓN ENZIMA SUSTRATO

Algunas enzimas permanecen libres en condiciones bajas de sustrato y no se alcanza la máxima velocidad. Cuando el sustrato se encuentra en exceso toda la enzima se transforma en enzima sustrato (ES) y la reacción se realiza a su máxima velocidad. Finalmente la reacción entra en equilibrio cuando no ocurren más cambios. Sin embargo si el producto (P) se quita después de que se produjo impedirá el establecimiento del equilibrio; por lo tanto el sustrato (S) se seguirá convirtiendo en producto (P).

En la Figura 13 se observa el efecto de la concentración del sustrato sobre el índice de la actividad enzimática. El índice aumenta rápidamente con incremento inicial en el sustrato; incrementos posteriores en las concentraciones del sustrato no tienen efectos sobre el índice ya que se vuelve dependiente de la concentración del sustrato el mismo efecto ocurre con un incremento de lo concentración de una enzima (Figura 14).

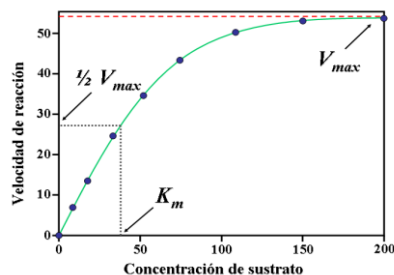


Figura 13. Concentración del sustrato sobre el índice de actividad enzimática

(Lenhiger 1993).

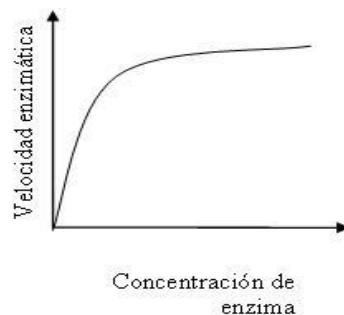


Figura 14. Concentración de la enzima en la velocidad enzimática (Lenhiger 1993).

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 en temperaturas moderadas mientras que la microflora termófila puede degradar la celulosa por arriba de los 45°C (Alexander, 1980). La velocidad de reacciones catalizadas por enzimas se incrementa en general con la temperatura dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activa, debido a que hay más moléculas con la energía suficiente para entrar en el estado de transición (Julio G. Pereto 2007).

Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

La velocidad de muchas reacciones enzimáticas se duplica aproximadamente, por cada 10 °C de aumento de la temperatura (Figura 15). La aparente temperatura óptima, es la resultante de dos procesos, uno el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura, y dos el incremento en la velocidad de desnaturalización térmica de la enzima al sobrepasar una temperatura crítica.

Aunque la mayoría de enzimas se inactiva a temperaturas comprendidas entre 55 °C y 60 °C, algunas de ellas son completamente estables y conservan su actividad a temperaturas muy superiores (Julio G. Peretó. 2007).

El coeficiente de temperatura varía de una enzima a otra según la energía de activación de la reacción catalizada, es decir, de la altura de la barrera de energía para pasar al estado de transición.

Las reacciones catalizadas por las enzimas parecen con frecuencia, poseer una temperatura óptima, donde se representa la actividad catalítica frente a la temperatura, estas enzimas al ser proteínas, se desnaturalizan por la acción del calor y se inactivan cuando la elevación de temperatura sobrepasa un cierto punto.

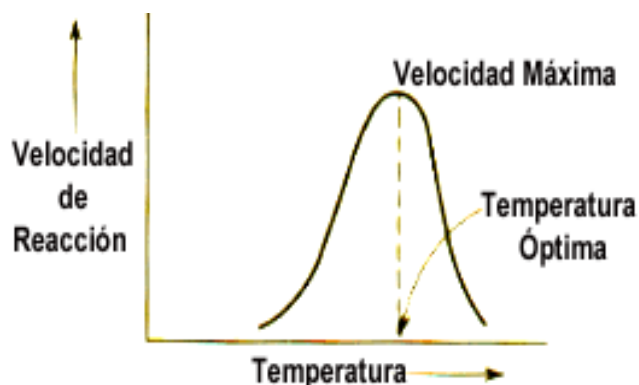


Figura 15. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción (Julio G. Peretó. 2007).

Efecto de la temperatura en la estabilidad de una enzima

Las enzimas estando en su aparente temperatura óptima suelen perder actividad enzimática (Figura 16) dependiendo de la duración del ensayo (Patnaik, 2002).

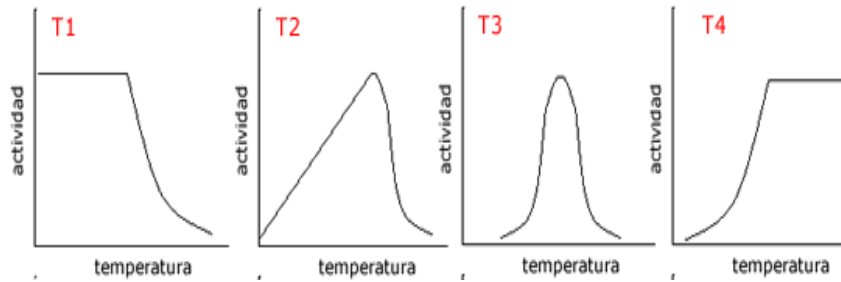


Figura 16. Efecto de la temperatura en la estabilidad de una enzima (Patnaik, 2002).

POTENCIAL DE HIDRÓGENO

En medios con pH entre neutro y alcalino, muchos microorganismos son capaces de crecer y liberar las enzimas apropiadas para la hidrólisis del polisacáridos (Whitaker, 1994).

Efecto del pH en la velocidad de reacción.

La mayoría de las enzimas poseen un pH característico en el cual la actividad es máxima; por encima o por debajo de este pH la actividad disminuye. Aunque los perfiles de las curvas de actividad en función del pH de muchas enzimas son acampanados pueden variar considerablemente (Figura 17). La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento ácido-base de la enzima y del sustrato, ya que éste afecta el grado de ionización de los aminoácidos del sitio activo tanto del sustrato como del complejo enzima sustrato, e influyendo en la afinidad que tenga la enzima por el sustrato (Badui, 2000).

La forma de la curva de actividad - pH varía con la concentración del sustrato. Estas curvas son mucho más significativas si la enzima se mantiene saturada con el sustrato en todos los valores de pH a los que se experimenta. En muchos estudios de cinética enzimática, el pH se mantiene constante, o muy próximo al pH óptimo. El pH óptimo de una enzima no es necesariamente idéntico al pH de su

entorno intracelular normal, el cual puede hallarse a su vez en la pendiente de su curva ascendente o descendente.



Figura 17. Efecto del pH en la velocidad de reacción de una enzima (Whitaker, 1994).

Efecto del pH en la estabilidad de una enzima

El pH influye directamente en la estabilidad de la enzima respecto al tiempo (Figura 18) es decir, en el pH óptimo de la enzima, ésta suele ser razonablemente estable a lo largo de los ensayos enzimáticos, pero fuera de este rango de pH hay una pérdida, para el caso de la pepsina, la enzima proteolítica del estómago, cuyo pH óptimo es de 2.0 pero se desnatura rápidamente a pH mayor a 8.0 (Whitaker, 1994).

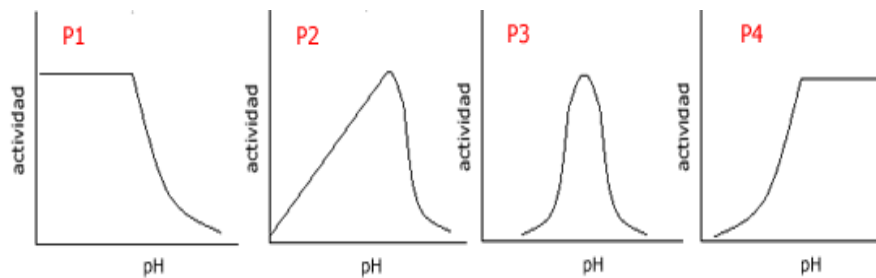


Figura 18. Efecto del pH en la estabilidad de una enzima (Whitaker, 1994).

5.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El presente trabajo se elaboró en dos fases: cualitativas y cuantitativas en las cuales se buscaba obtener los datos que nos muestren si los microorganismos empleados son adecuados o no para la producción de la enzima celulasa a nivel laboratorio.

CONTROL INICIAL Y PROPAGACIÓN DEL MICROORGANISMO

MICROORGANISMO EMPLEADO

Se utilizaron bacterias (bacilos y cocos) y levaduras aisladas del aguamiel que se encontraban en refrigeración en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

Se preparó agar nutritivo en un matraz Erlenmeyer para el crecimiento de los microorganismos del aguamiel. Se calentó hasta clarificar completamente y se esterilizó durante 15 minutos a 121°C (15 psi) tomando en cuenta las condiciones de asepsia para evitar contaminación en el medio de cultivo. Al vaciar el medio en las cajas Petri estériles se usó una campana de aire estéril (Scorpion Scientific) y se dejaron solidificar, se almacenaron en el refrigerador a 4°C.

Se sembró cada una de las cepas otorgadas para su purificación utilizando el método de siembra de estría por agotamiento donde se sembró sobre un medio sólido. Se tomó una carga de muestra que contenía microorganismos y se hicieron estrías con la muestra sobre una placa de agar de tal manera que la muestra se

diluyó sobre la superficie llegando un momento en el que los microorganismos depositados en las estrías estuvieron bien separados. Se colocó en la incubadora (Prendo INO 650V-7 Incubadora Orbital) a una temperatura de 32°C durante 48 horas monitoreando el crecimiento de los mismos.

TINCIÓN DE GRAM

Para asegurar que el cultivo estuviera puro se realizó Tinción de Gram, ya que permitió diferenciar dos grandes grupo de bacterias (Gram + y Gram -).

1. Se realizó un frotis previamente fijado al calor.
2. Se colocaron sobre las muestras unas gotas de colorante cristal violeta durante un minuto, se efectuó un lavado con agua destilada y se eliminó el exceso de agua.
3. Se añadieron unas gotas de la solución de lugol se dejó reposar durante un minuto, se lavó con agua destilada y se eliminó el exceso de la misma; todas las células siguen siendo azul- violeta.
4. Se efectuó un lavado con etanol.
5. Se agregó una solución de safranina durante un minuto y se lavó esta solución. Las células Gram – se observaran de color rosa o rojo mientras que las Gram + se observaran de color azul-violeta.
 - 🌀 Gram positivas: No se lavan con etanol, retienen el colorante violeta y se observan de ese color, la pared está formada por una capa homogénea y espesa de peptidoglicano, polisacáridos y poco o ningún lípido.
 - 🌀 Gram negativas: Se decoloran cuando se lavan con etanol, no retienen el colorante violeta y se observan rosadas, la pared está formada por una capa delgada de peptidoglicano y otra externa con lipoproteínas y polisacáridos (Anónimo ,2006)

La pared celular de las bacterias está compuesta por peptidoglicano, que es un polímero complejo de aminoazúcares y diferentes tipos de proteínas, dependiendo

del tipo de bacteria pueden además encontrarse lípidos, polisacáridos y otros componentes ácidos, lipoprotéicos y lipopolisacáridos; dicha composición de la pared es utilizada para diferenciar dos tipos de bacterias, de acuerdo a su respuesta a la tinción según demostró el científico danés Gram de donde se reconocen las bacterias Gram positivas y las Gram negativas (Anónimo , 2006).

PRESERVACIÓN DEL MICROORGANISMO EN GLICEROL-LECHE DESCREMADA

Esta técnica está basada en la conservación del los microorganismos en un medio en donde puedan mantener sus actividad a una tasa muy baja ya que se somete a congelación usado cultivos puros previamente analizados por la Tinción de Gram.

El glicerol y la leche descremada forman un entramado con los cristales de agua que protegen a las células sin alterar su estructura.

Para llevar a cabo esta conservación las muestras se habían purificado para que al ser conservada solo existiera un microorganismo en los tubos Eppendorf.

1. Se preparó una solución con glicerol (10 %) y leche descremada (Svelty 5%).
2. Se homogenizó en 100 mL de H₂O destilada
3. Se esterilizó a 121 °C (15 psi) durante 15 min.
4. Se dejó enfriar y se tomó 10 mL de la mezcla preparada la cual se agregó a la caja Petri que contenía los microorganismos (cultivo puro) y con ayuda de una asa bacteriológica se desprendieron las colonias para su conservación,
5. Se tomaron 1000 µL de la solución de la caja petri y se colocó en tubos Eppendorf previamente esterilizados (121°C por 15 minutos) con capacidad de 1.5 mL (Figura 19) y se almacenaron a temperatura de congelación (-20°C) para su conservación.



Figura 19. Microorganismos preservados en glicerol y leche descremada.

DETERMINACION DE PRUEBAS CUALITATIVAS

ACTIVIDAD CELULOLITICA

Para la medición de la actividad celulolítica se utilizó un medio a base de carboximetilcelulosa de sodio (CMC de Na) al 0.5 %, rojo congo (0.5 %), agar bacteriológico (1.5 %) y extracto de levadura (0.1%).

Se homogenizó y se esterilizó la solución a 121°C (15 psi) por 15 minutos, se enfrió y se vació en cajas Petri estériles (Figura 20), haciendo un pozo en el centro del agar rojo congo se inocularon los microorganismos (Figura 21) previamente conservados en glicerol y leche descremada manejando siempre un ambiente de asepsia para evitar contaminación del medio.

Posteriormente se colocó en una incubadora (Prendo INO 650V-7 Incubadora Orbital) a una temperatura de 32°C monitoreando la coloración del medio por la degradación que ejercían cada uno de los microorganismos sobre éste (Figura 22), tomando en cuenta el tiempo 0 hasta las 36 horas. Para corroborar esta prueba se siguió monitoreando cada 24 horas alcanzando las 132 horas.



Figura 20. Testigo del Agar Rojo Congo.

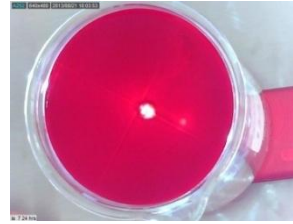


Figura 21 Inoculación del microorganismo.



Figura 22. Crecimiento del microorganismo.

DETERMINACIÓN DE PRUEBAS CUANTITATIVA Y CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN

FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

Después de los datos obtenidos con la prueba rojo congo se descartaron las muestras las cuales no presentaba degradación en el agar rojo congo para posteriormente iniciar la fermentación en medio líquido de las muestras las cuales presentaron degradación de la fuente de carbono que se les suministro al microorganismo

PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se seleccionaron las muestras Ba1 (bacteria de aguamiel 1), Ba3 (bacteria de aguamiel 3), y Ca1 (coco de aguamiel 1) y se sembraron sobre agar nutritivo para

la obtención de las colonias, se incubó a 32°C (Prendo INO 650V-7 Incubadora Orbital) por 48 horas para su crecimiento adecuado.

Después del crecimiento adecuado de los microorganismos se procedió al recuento de células, se colocaron 20 ml de solución Tween 80 al 0.1% previamente esterilizado a 121°C (15 psi) durante 15 minutos y con ayuda de una asa bacteriológica se desprendieron las colonias de la caja, se tomaron 100 µL de la suspensión de células y se diluyó en 20 mL de H₂O destilada y se homogenizó. Se colocó una gota sobre la cámara de Neubauer (Figura 23), se cubrió con un portaobjetos y posteriormente se observó en un microscopio con el objetivo 40X el cual es un aumento adecuado para la prueba. Las células presentes se contaron en los cuadros elegidos (formando una "Z"). Se contaron un total de 13 cuadros (Figura 24), cinco en cada línea (cinco arriba y cinco abajo) y tres de la diagonal que cruza el centro uniendo las líneas.

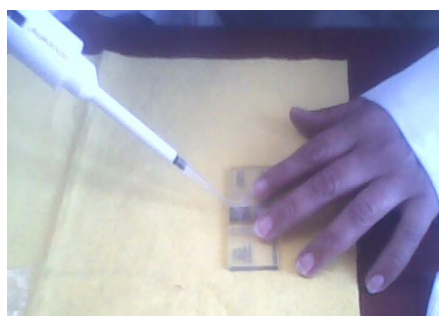


Figura 23. Aplicación de la muestra sobre la cámara de Neubauer.

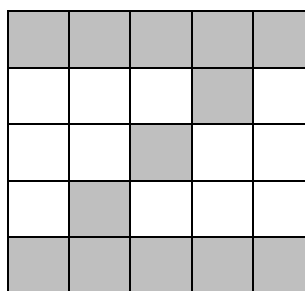


Figura 24. Diagrama para conteo de esporas.

Se determinó el número de esporas por mL utilizando la siguiente fórmula

$\text{Células / mL} = \text{promedio} \times 250,000 \times \text{factor de dilución (200)}$.

El resultado obtenido del recuento de células es lo que se inocula en cada uno de los frascos de cristal que contiene Czapek-Dox para el inicio de la fermentación.

CONDICIONES DE LA FERMENTACIÓN

Para la realización de la fermentación en medio líquido se utilizó la cantidad de 20 ml de solución Czapek-Dox (Anexo 5) previamente esterilizado, la cantidad de células/mL que se determinó en el recuento de las mismas para el inicio de la fermentación con ayuda de una micro pipeta, se homogenizo el medio y se colocó un tapón. Se sello con parafilm para evitar contaminación por acción de cualquier otro microorganismo no deseado.

En la primera fermentación se utilizó una concentración de CMC al 0.5% para la solución de Czapek-Dox, con esta concentración se eliminó la cepa identificada con Ca1 y en las posteriores se empleó una concentración 0.1 % de CMC de Na (Anhidro, Glicolato de celulosa de Sodio, Golden Bell reactivos).

La concentración de células utilizadas fue 1×10^6 células/mL las cuales se inocularon en condiciones de asepsia en 20 ml de solución de Czapek-Dox previamente esterilizada a 121 °C (15 psi) durante 15 min, se incubó a 32° C (Prendo INO 650V-7 Incubadora Orbital) proporcionándole una agitación de 150 rpm para mantener la homogeneidad entre el medio y el microorganismo monitoreando el crecimiento de las misma cada 12 horas. La obtención del extracto enzimático se realizó cada 12 horas desde el tiempo 0 hasta 48 horas de fermentación. Estos procesos se realizaron por triplicado.

EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO.

Cada una de las muestras con sus respectivos tiempos se guardó para su filtrado y recuperación del extracto enzimático con ayuda de una bomba de vacío (Millipore), matraz Kitazato y un embudo de porcelana (Figura 25). Se filtró la solución con un papel filtro Whatman N° 1 de cada fermentación la cual se monitoreo cada 12 horas de incubación se realizó la muestra por triplicado y se almacenaron en tubos de plástico Corning 430290 de 50 mL a 4°C (Figura 26).



Figura 25. Filtrado de las muestras



Figura 26. Muestras en tubos Corning.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para la actividad enzimática de los extractos, se empleó el método de Ghose. T.K. (1987) determinando los azúcares reductores de las muestras seleccionadas por el método de Miller (1989).

DETERMINACIÓN DE ENDOGLUCANASA

En esta prueba se detecta la actividad de las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en las regiones internas de la molécula de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización (Anexo 8).

FERMENTACION CON CMC AL 0.5% EN MEDIO CZAPEK-DOX

Se colocó en un tubo de ensaye las siguientes cantidades y se le realizaron los siguientes pasos.

Mezcla de reacción (MR)	Blanco enzimático (BE)	Blanco de sustrato (BS)
700 μ L de carboximetil celulosa al 0.1 %		550 μ L de buffer acetato sódico 50 mM pH 6.0
300 μ L de extracto enzimático		1250 μ L de DNS
Incubando a 55°C durante 5 min en un baño María (ThermoScientic)	1250 μ L de DNS	Incubando a 55°C durante 5 min en un baño María (ThermoScientic)
250 μ L de buffer acetato sódico 50 mM pH 6.0		
1250 μ L de DNS	Incubando a 55°C durante 5 min en un baño María (ThermoScientic)	
Se sometió a ebullición durante 5 minutos		
Baño de hielo durante 5 minutos		
5 minutos a temperatura ambiente		

Posteriormente fueron leídas a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV).

La mezcla de reacción (MR) y el blanco enzimático (BE) se compararon con una curva patrón de glucosa a 0.1% (Anexo 2).

FERMENTACION CON CMC AL 0.1% EN MEDIO CZAPEK-DOX

Se colocó en un tubo de ensaye las siguientes cantidades y se le realizaron los siguientes pasos.

Mezcla de reacción (MR)	Blanco sustrato (BE)	Blanco de enzimático (BE)
200 µL de carboximetil celulosa al 0.05%		200 µL de buffer de acetato (0.1 M ; 4.8 pH)
50 µL de extracto enzimático	50 µL de buffer acetato (0.1 M ; 4.8 pH)	50 µL de extracto enzimático
Incubando a 55°C durante 10 min en un baño María (Thermo Scientific)		
Ebullición durante 5 minutos		
250 µL de Buffer de Acetato (0.1 M ; 4.8 pH)		
1250 µL de DNS		
Se sometió a ebullición durante 5 minutos		
Baño de hielo durante 5 minutos		
5 minutos a temperatura ambiente		

La mezcla de reacción (MR) y el blanco enzimático (BE) se compararon con una curva patrón de glucosa a 0.1% (Anexo 3)

La determinación de azúcares reductores producidos por la hidrólisis enzimática de carboximetil-celulosa se utilizó para determinar la presencia de enzimas celulasas, mediante la prueba de DNS (Miller et al., 1989)

CUANTIFICACIÓN DE U/ mL

Las unidades de enzimas presentes en los extractos enzimáticos fueron calculadas de la siguiente manera.

$$U/mL = \frac{\mu \text{ mol}}{\text{mL} \frac{EE}{\text{min}}}$$

Donde: U= unidad enzimática que se define como la cantidad de μ mol del producto derivado de la hidrólisis de la enzima como se expresa a continuación:

μ mol de Glucosa en fermentación CMC al 0.5% en medio Czapek-Dox

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{mg c}}{\text{mL Rxn}} = \frac{1 \text{ mol}}{180,1600 \text{ mg c}} \left| \frac{1,000,000 \mu \text{ mol c}}{1 \text{ mol}} \right| \left| \frac{2.5 \text{ mol Rxn}}{0.3 \text{ mL EE}} \right| \left| \frac{1}{5} \right| = 9.25 \frac{U}{\text{mL}} \text{ de celulasa}$$

μ mol de Glucosa en fermentación CMC a 0.1% en medio Czapek-Dox

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{mg c}}{\text{mL Rxn}} = \frac{1 \text{ mol}}{180,1600 \text{ mg c}} \left| \frac{1,000,000 \mu \text{ mol c}}{1 \text{ mol}} \right| \left| \frac{1.75 \text{ mol Rxn}}{0.05 \text{ mL EE}} \right| \left| \frac{1}{10} \right| = 19.42 \frac{U}{\text{mL}} \text{ de celulasa}$$

EVALUACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Los azúcares reductores se evaluaron por el método de Miller *et al.*, (1989) con DNS (Anexo 7) buffer de acetato de sodio 50 mM (ph6.0) y buffer de acetato (0.1 M; 4.8 pH) (Anexo 6) extracto enzimático filtrado en papel Whatman No.1, éstos se determinaron en diferentes tiempos (0, 12, 24, 36 48 horas) por triplicado esto en la fermentación con una concentración de CMC a 0.5%

Las muestras tratadas se leyeron a 540 nm para cuantificar azúcares reductores con ayuda de un espectrofotómetro (UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV) y fueron

calculadas para saber la cantidad del consumo de sustrato. Se preparó una curva patrón de azúcares reductores, donde se emplearon las ecuaciones de la linearización de las curvas para la cuantificación del contenido de azúcares.

Determinación de exo-glucanasa

Se detecta la actividad de las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en las regiones externas de la molécula de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización (Anexo 9).

Se colocó en un tubo de ensaye las siguientes cantidades y se le realizó los pasos.

Mezcla de reacción (MR)	Blanco de sustrato (BS)	Blanco enzimático (BE)
1 mL de Buffer de Acetato (0.1 M ; 4.8 pH)		
Tira de papel filtro (Whatman #1)		50 μ L de extracto enzimático
50 μ L de extracto enzimático	Baño María (ThermoScientific), a 50°C durante 1 hora	
Baño María (ThermoScientific), a 50°C durante 1 hora	250 μ L de Buffer de Acetato (0.1 M ; 4.8 pH)	
250 μ L de Buffer de Acetato (0.1 M ; 4.8 pH)	1250 μ L de DNS	
1250 μ L de DNS		
Ebullición durante 5 minutos		
Baño de hielo durante 5 minutos		
5 minutos a temperatura ambiente		

Posteriormente fueron leídas a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV).

CUANTIFICACIÓN DE FPU/mL

Para lograr la cuantificación de las unidades de papel filtro se calcula con la siguiente fórmula:

$$FPU = (0.185) * \left(\frac{mg}{mL}\right)$$

Donde: 0.185 es constante y a lo que equivalen las unidades de papel filtro

EVALUACIÓN DE AZÚCARES TOTALES

Los azúcares totales se evaluaron bajo el método de Dubois *et al.*, (1956) con fenol-sulfúrico utilizando el extracto enzimático filtrado con papel (Whatman No. 1) los cuales se pusieron a peso contante para eliminarles la humedad (Anexo 10).

Ésta se determinó a los diferentes tiempos de la fermentación (0, 12, 24, 36, 48 horas), donde en un tubo de ensaye se aplicaron 250 µL de muestra (extracto enzimático), 250 µL de fenolsulfúrico se agitaron en un vortex, se colocaron en baño de hielo durante 5 minutos, transcurrido el tiempo se añadió por las paredes del tubo de ensaye 1000 µL de ácido sulfúrico concentrado, se agitó nuevamente en un vortex y se puso a ebulir por 5 minutos y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente para su posterior lectura 480 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS Velab Modelo 5600 UV).

Se preparó un curva patrón de azúcares totales donde se emplearon las ecuaciones de la linearización de las curvas (Anexo 4).

DETERMINACION DE BIOMASA

En la determinación de biomasa se sometió el papel filtro a peso constante durante 24 horas a una temperatura de 70°C, se filtró la muestra sobre el papel filtro y se colocó en una estufa a 70°C para obtener la diferencia de pesos, el extracto enzimático obtenido se evaluó bajo el Método de Miller (1989) para la determinación la cantidad de biomasa la cual no se pudo recuperar con el filtrado, las muestras se leyeron a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV).

6.- RESULTADOS

MICROORGANISMOS INICIALES

Para llevar a cabo este proyecto se realizó la purificación de los microorganismos provenientes del aguamiel: hongos, bacterias y levaduras para su posterior conservación en glicerol y leche descremada y así contar con los microorganismos para su uso en los diferentes pasos del mismo para tener como resultado una sola cepa la cual nos proporciona la mayor producción de la enzima en estudio.

DETERMINACIÓN DE PRUEBAS CUALITATIVAS

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS

La actividad se observó mediante la evaluación cualitativa con el revelado de las zonas de obscurecimiento utilizando el medio agar rojo congo, el diámetro de los halos en las muestras no muestra un patrón en específico, las cajas que contenían las cepas de levaduras mostraron degradación nula y en comparación de las cajas en las cuales se inocularon los cocos y bacilos presentando su mayor actividad entre las 12 y 24 horas, después de éstas los halos que se formaron fueron disminuyendo (Anexo 1) como se muestra en el monitoreo aplicándole una temperatura de 32°C.

Al realizar el cambio de temperatura de 32°C a 35°C y monitoreando cada 24 horas no se mostró ningún cambio en las cajas inoculadas por lo que se sabe que la actividad enzimática se realiza en las primeras horas después de haber sido inoculado el microorganismo en el agar rojo congo.

En comparación con otros estudios realizados para la obtención de la misma enzima utilizando el agar rojo congo y fuente de carbono CMC, un estudio

realizado por Lu *et al.* (2005) en donde los diámetros presentados por cepas aisladas de tallos de flores y que fueron cultivadas en el mismo agar e incubando a una temperatura de 32°C durante 5 días alcanzaron valores de 6.4 cm, lo cual demuestra una baja actividad en los microorganismos provenientes del aguamiel ya que en algunas cepas inoculadas no presentó ningún tipo de actividad.

Esta prueba muestra que aunque sean microorganismos aislados de la misma fuente y que éstos sean de la misma especie no desarrollan las mismas capacidades para llevar a cabo la degradación, pueden existir diferencias en la complejidad del sistema enzimático, lo cual le permita o no degradar el sustrato y así generar diferentes tasas de desarrollo en cada una de las cepas usadas.

Las cepas seleccionadas cuentan con un mecanismo enzimático adecuado para la degradación del sustrato, por lo cual se escogieron para llevar a cabo el proyecto.

El género de *Bacillus* es reportado como microorganismo con alta actividad celulolítica muchos de éstos están presentes en el suelo y en la materia orgánica en degradación así que juegan un papel muy importante en la biodegradación del ambiente y presentan una buena actividad enzimática.

DETERMINACIÓN DE PRUEBAS CUANTITATIVAS

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE LAS CEPAS AISLADAS

Con las pruebas realizadas del aislamiento de microorganismos celulolíticos por el agar rojo congo se seleccionaron las muestras que presentan mayor actividad de degradación enzimática para realizar las fermentaciones con las condiciones ya establecidas.

Las cepas seleccionadas Ba1 (bacteria de aguamiel 1), Ba3 (bacteria de aguamiel 3), Ca1 (coco de aguamiel 1) a las cuales se les realizaron las pruebas

preliminares para evaluar la capacidad celulolítica de cada una de ellas determinando la liberación de azúcares reductores por la técnica de DNS (Miller, 1959) y utilizando como sustrato CMC a 500 ppm indicaron la actividad celulolítica en la tres cepas en estudio, todas presentan actividad endoglucanasa durante el período de la fermentación, el tiempo de ésta es adecuado ya que en cada una de las muestras se pueden apreciar las 4 fases de la curva de crecimiento como se muestra en las gráficas (Figura 2) de cada una de las muestras.

Podemos concluir que tanto en la prueba cualitativa y en la cuantitativa de las cepas en estudio son adecuadas para la producción de la enzima de interés cada una de éstas en diferente proporción

Con la prueba de DNS (Miller, 1959) sabes que se llevó a cabo de manera adecuada la reacción enzima sustrato completa, la cantidad de enzima en el extracto enzimático de las fermentaciones es suficiente para hidrolizar la celulosa o para obtener azúcares reductores que pueden ser detectados por ésta técnica y se le proporcionaron las condiciones adecuadas para que ésta se realice como lo es pH entre 4.8 y 6.0, temperatura de $32^{\circ}\text{C} \pm 2$ y así poder detectar la enzima encargada de las degradación del sustrato.

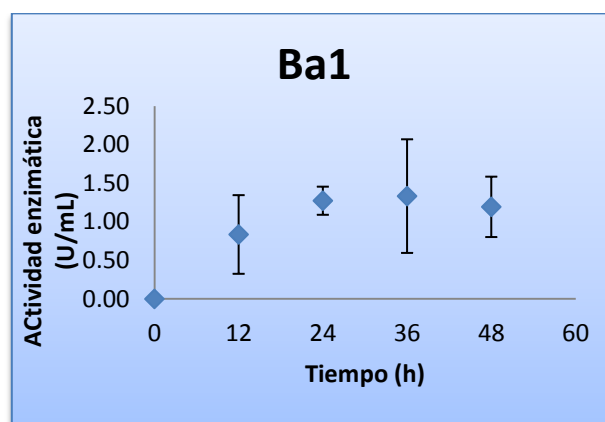


Figura 27. Actividad enzimática de la muestra Ba1 (bacilos de aguamiel 1)

Podemos observar que no existe una fase como tal de adaptación ya que al microorganismo se le proporciona los nutrimentos necesarios para iniciar actividad enzimática la cual se mantiene estable desde las 24 horas, teniendo su punto

máximo a las 36 horas hasta con pequeño descenso en las 36 y las 48 horas (Figura 27).

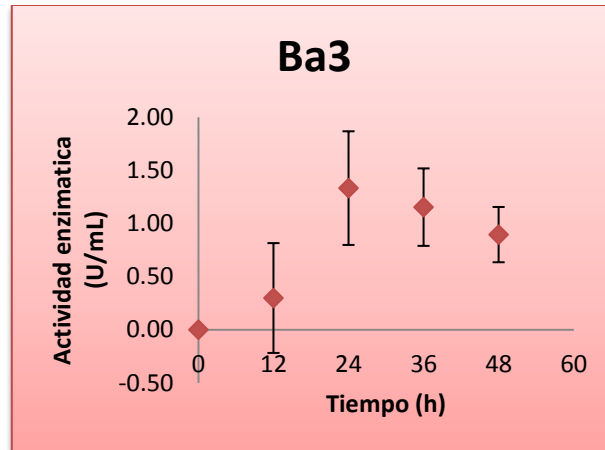


Figura 28. Actividad enzimática de la muestra Ba3 (bacilos de aguamiel 3)

Su fase de adaptación al medio es notable ya que entre las 0 horas a las 12 horas se inicia la adaptación y de las 12 a las 24 se dispara la actividad enzimática pero disminuye muy rápido después de las 36 inicia a disminuir (Figura 28).

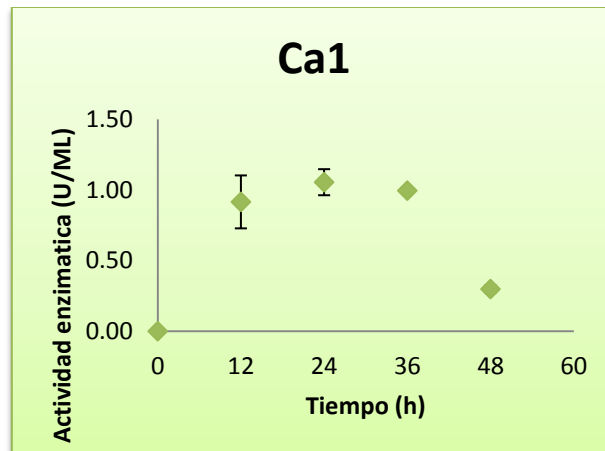


Figura 29. Actividad enzimática de la muestra Ca1 (Cocos de Aguamiel 1)

La actividad enzimática se dispara a las 12 horas y se mantiene estable entre las 24 y 36 horas, disminución drásticamente a las 48 horas en su actividad enzimática (Figura 29).

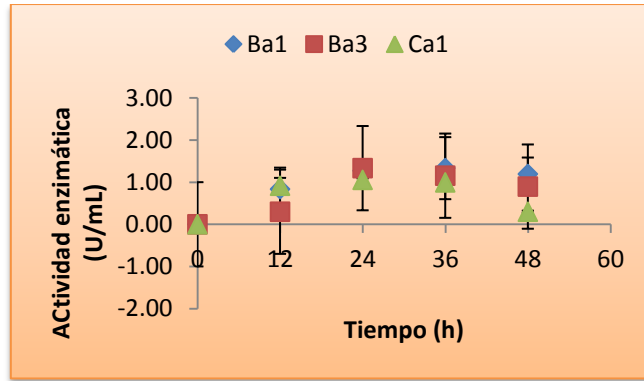


Figura 30. Comparación de las tres cepas en estudio

De acuerdo con la literatura se sabe que distintos *Bacillus* como *Bacillus licheniformis* presentes en residuos vegetales de flores en compostaje (Lu *et al.*, 2005) y *Bacillus subtilis* en muestras de suelo y agua de la región amazónica (Heck *et al.*, 2002) han demostrado un alto potencial celulolítico en comparación con los cocos, por eso se presenta mejor rendimiento en las dos muestras de bacilos en estudio la Ba 1 y Ba 3 éstos pueden tener una considerable tasa de crecimiento alta y así poder hidrolizar mejor la celulosa a glucosa (Figura 30).

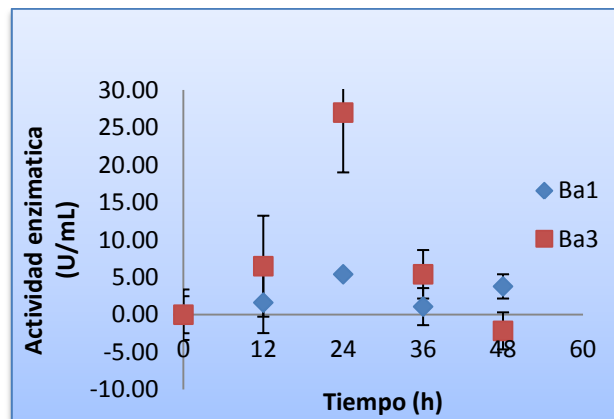


Figura 31 Análisis de la cepa Ba1 y Ba3 en la prueba de endoglucanasa por el método de Miller (1989)

La muestra de Ba 1 no muestra una actividad de endoglucanasa más estable porque su descenso no es muy notorio de un tiempo a otro y en la muestra Ba 3 nos presenta una actividad alta a las 24 horas pero desciende demasiado rápido

así que nos produce de la cadena de celulosa oligosacáridos de varias longitudes (Figura 31).

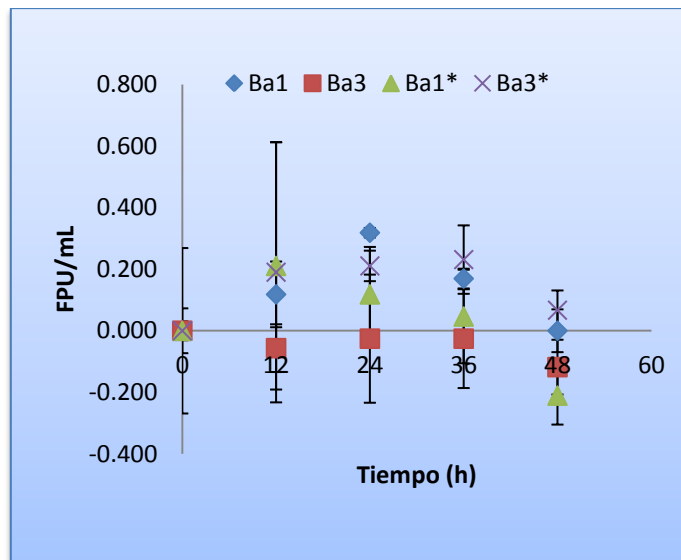


Figura 32 Análisis de cepa Ba1 y Ba3 por duplicado en la prueba de exoglucanasa

La muestra de Ba 1 presenta mejor rendimiento en la muestra de exoglucanasa, esto quiere decir que su actividad enzimática es mejor porque fragmenta los extremos de la cadena de celulosa generando unidades de glucosa en comparación con la muestra Ba 3 que no muestra un mismo patrón.

Al analizar las dos muestras de bacilos Ba1 y Ba 3 se presenta un comportamiento más estable en la prueba de endoglucanasa y exoglucanasa en la muestra Ba1; gracias a estas pruebas se puede determinar que la cepa etiquetada como Ba 1 presenta un mayor rendimiento en las dos pruebas y se presenta como cepa final para valorar su actividad enzimática para producir la enzima celulasa a nivel laboratorio proporcionándole las condiciones adecuadas para que se realice la actividad enzimática (Figura 32).

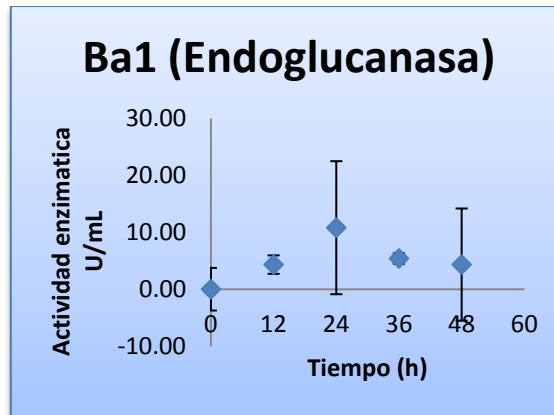


Figura 33 Cepa final Ba 1 actividad endoglucanasa

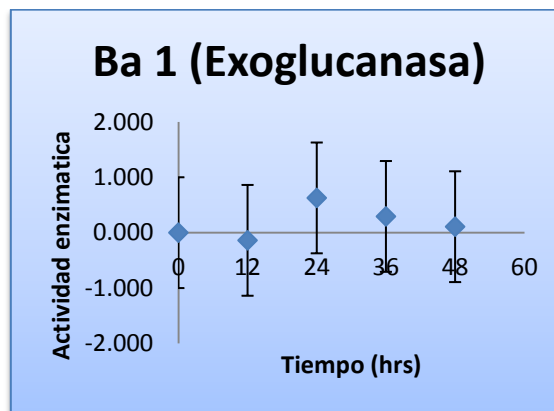


Figura 34 Cepa final Ba 1 actividad exoglucanasa

La cepa final etiquetada como Ba1 presenta el mejor rendimiento entre las otras dos cepas seleccionadas por las prueba de la actividad celulolítica.

La cepa Ba1 en la prueba de endoglucanasa han logrado hidrolizar los enlaces β -1,4 glucosídicos intramoleculares accesibles de cadena de celulosa para producir oligosacáridos de varias longitudes (Figura 33) y en la prueba de exogluconasa logró fragmentar lo extremos del sustrato para generar unidades de glucosa (Figura 34).

A esta cepa se le realizó la determinación de biomasa lo cual nos dió como resultado los siguientes datos (Figura 35).

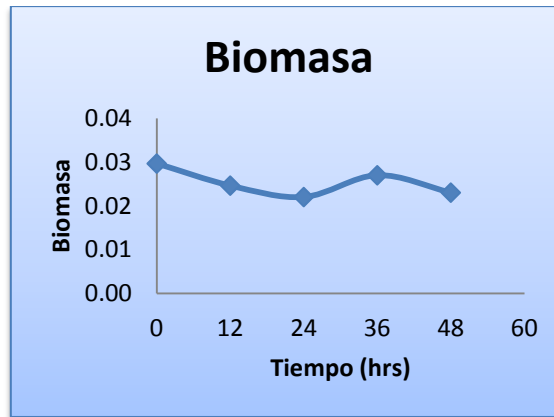


Figura 35 Cepa Ba1 Biomasa.

No existe un crecimiento adecuado en el medio Czapek-Dox y si existe es muy mínimo y no es detectable, y es un método indirecto para la cuantificación de biomasa.

CONDICIONES ÓPTIMAS DE LAS ENZIMAS

POTENCIAL DE HIDRÓGENO Y TEMPERATURA ÓPTIMA DE LAS CELULASA

Se usó la solución de buffer de acetato a 50 mM con pH 6.0 para la fermentación de CMC al 0.5% y una solución de buffer de acetato a 0.1 M con pH de 4.8 para la fermentación de CMC al 0.1 %, en cada uno de los pH se presentó una buena actividad enzimática de celulasa.

A un pH entre 4.8 y 6.0 la enzima celulasa puede realizar sus actividades enzimáticas, éste está directamente relacionado con la estructura de las enzimas puede ser mayor o menor dependiendo del microorganismo en estudio.

Las reacciones químicas que se presentan durante la prueba con el método de Miller (1989) usando una solución de búfer la cual nos ayudan a mantener constante el medio y que no existan otras reacciones no deseadas y mantener estable el medio para una mejor valoración.

Las temperaturas a las cuales se realizaron las pruebas son las adecuadas ya que los resultados alcanzados son satisfactorios teniendo una temperatura estable de 50°C con una incubación de 5 a 10 minutos para la cuantificación de azúcares reductores por el método Miller (1989) con DNS, la prueba se realizó por triplicado para mejores resultados, el medio en el cual se desarrolla la actividad enzimática también influye mucho en el valor de la temperatura óptima de la enzima.

Krishna (1999), reportó que el pH y la temperatura de la fermentación en medio líquido tiene un gran influencia en la producción de enzimas celulolíticas, en su investigación se presenta a un pH de 6.0 y se da una mayor liberación enzimática con una temperatura de 35°C.

ESTABILIDAD DE LA ENZIMA DE CELULASA

La temperatura usada para las reacciones de las enzimas es de 50°C y poniéndolas a temperatura de ebullición las enzimas seguían estables y no se desnaturalizaron.

La estabilidad térmica se midió evaluando la actividad enzimática residual, mediante la liberación de azúcares reductores y su cuantificación por el método Miller (1989)

7.- CONCLUSIÓN

Se logró el aislamiento de 14 diferentes microorganismos autóctonos del aguamiel identificados como Gram positivo de las cuales con la prueba de actividad celulolítica se descartaron las cepas que no presentan actividad enzimática como lo fueron las levaduras, a diferencia de las cepas de bacilos y cocos que fueron analizadas para obtener la mejor y así lograr la producción de la enzima celulasa, que obtuvo la mejor cepa para la obtención de la enzima fue la Ba1 (Bacilos de Aguamiel 1) pues presenta mayor concentración de azúcares reductores y actividad enzimática superior a las otra muestras.

Se comprobó que las condiciones de pH, temperatura, sustrato usadas durante el proyecto son las óptimas para el crecimiento y el desarrollo de los microorganismos en estudio pues presentan las cuatro fases de crecimiento durante la fermentación en medio líquido.

La producción de las enzimas por medio de microorganismos es más rentable ya que éstas son más estables que las enzimas vegetales y animales (Carlón, 2007), muchas de las bacterias las cuales presentan la mayor actividad en la producción de celulasas son los bacilos como lo son *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* entre otros, los cuales presentan un gran actividad a diferentes temperaturas y conociendo cuál de éstas es la óptima para la actividad enzimática ya que si se conocen las condiciones adecuadas de la reacción enzimática, se puede conocer el tiempo de producción ya que a las 36 horas la cepa presenta un óptimo desarrollo y buena producción de la enzima.

Parámetros como las moléculas de celulosa en las regiones amorfas, el grado de cristalina, la conformación estereoscópica, la rigidez de las unidades de celulosa, el grado de polimerización de la celulosa, la naturaleza de los componentes con los que la celulosa está asociada, la concentración y distribución de los grupos sustituyentes condicionan drásticamente la actividad de los microorganismos celulolíticos y así lograr degradar este tipo de sustratos, lo cual explica que el

comportamiento metabólico sea específico y por ende, la acumulación del producto de hidrólisis difiera de un ensayo a otro.

La cepa que muestra más estabilidad durante su actividad enzimática es la Ba 1 (Bacteria de Aguamiel) en la prueba de endoglucanasa y exoglucanasa sus resultados son superiores al de las otra muestras.


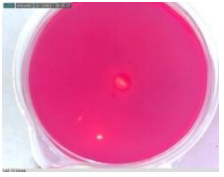

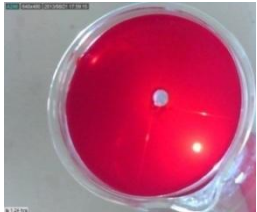

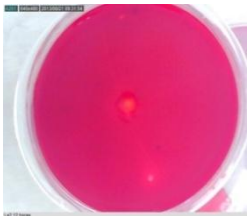
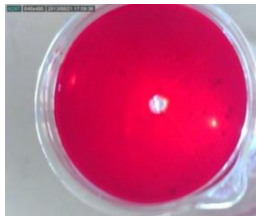

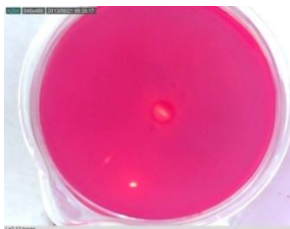

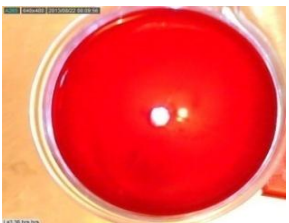
Se deben de seguir realizando estudios para obtener mejores cepas las cuales proporcionen una mejor y más estable actividad enzimática para optimizar procesos en cada una de las aéreas que se emplee los microorganismos nos dan enzimas más estables en comparación con las proporcionadas por los vegetales y animales.

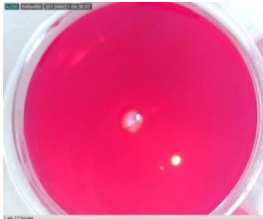



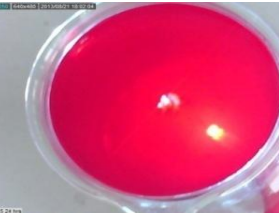
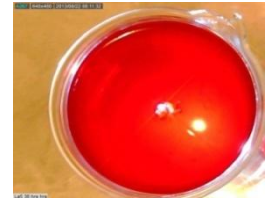




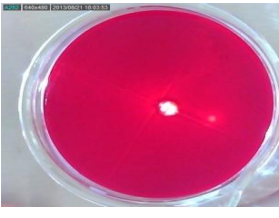
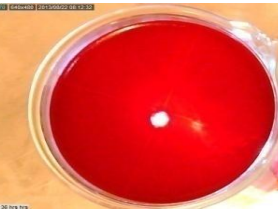
Conociendo las condiciones adecuadas podemos conocer mejor desarrollo del microorganismo y saber en qué momento es su punto máximo de producción.

8.- ANEXOS










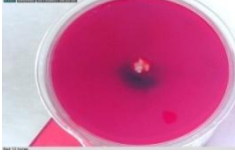


ANEXO 1 MONITOREO ROJO CONGO

Monitoreo de levaduras en medio rojo Congo


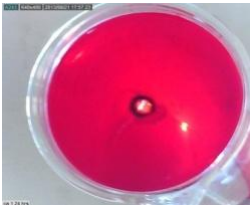
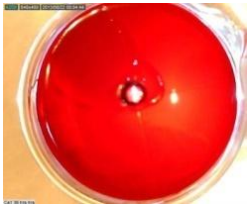


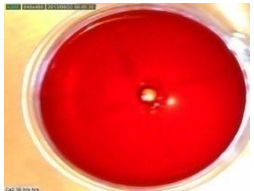
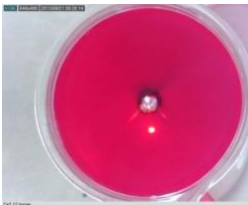


	Muestra inicial		Muestra 0 hrs	
				
Clave	12 hrs	24 hrs	36 hrs	
La1				
La2				
La3				

La4			
La5			
La6			
La7			

Monitoreo de bacilo en medio rojo congo

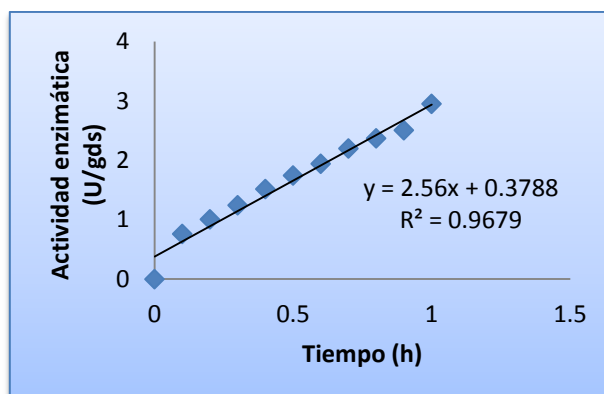
Clave	12 hrs	24 hrs	36 hrs
Ba1			
Ba2			
Ba3			
Ba4			

Monitoreo de cocos en medio Rojo Congo

Clave	12 hrs	24 hrs	36 hrs
Ca1			
Ca2			
Ca3			

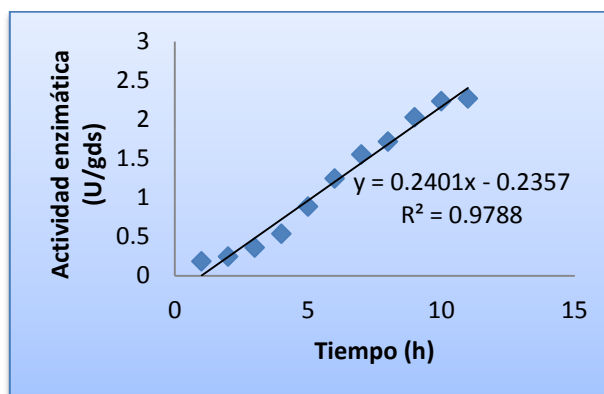
ANEXO 2 CURVA PATRÓN AZÚCARES REDUCTORES

CONCENTRACION DE CMC 0.5 %

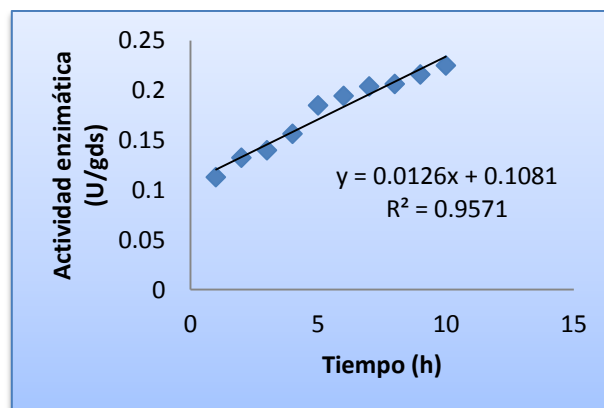


ANEXO 3 CURVA PATRÓN AZÚCARES REDUCTORES

CONCENTRACION DE CMC 0.1 %



ANEXO 4 CURVA PATRÓN AZÚCARES TOTALES



METODOLOGÍAS EXPERIMENTALES

ANEXO 5 MEDIO DE CULTIVO MINIMO EN SALES CZAPEK-DOX

Material	Cantidad
Matraz	1 pza
Agitador magnético	1 pza
NaNO ₃	7.65 g/L
KH ₂ PO ₄	3.04 g/L
MgSO ₄	1.52 g/L
KCl	1.52 g/L
CMC	0.5 % y 0.1 %

Procedimiento

- 1.- Pesar cada una de las sales y adicionar al matraz Erlenmeyer.
- 2.- Agregar agua destilada al matraz (1 litro).
- 3.- Adicionar la fuente de carbono requerida.
- 4.- Agitar durante 30 min.

ANEXO 6 SOLUCIÓN AMORTIGUADORA ACETATO SODICO 50 Mm (pH 6.0)

SOLUCIÓN A Y B

- Solucion A (AcidoAcetico)
5.72 ml aforar a un litro
- Solución B (Acetato de Sodio)
8.2 g aforar a un litro

Procedimiento

- 1.- Mezclar 4.8 mL de solución A y 45.2 mL de solución B.
- 4.- Adicionar 50 mL de agua destilada, para completar 100 mL de solución
- 5.- Mezclar durante 10 min.

ANEXO 7 REACTIVO DNS (CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES)

Se basa en la reducción del ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor, al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Chaplin, 1986), cuya presencia puede detectarse por lectura de la Absorbancia en la zona de 540-570 nm.

Material	Cantidad
DNS	10.0 g/L
Fenol	2.0 g/L
Sulfito de sodio	0.5 g/L
Hidróxido de sodio	10.0 g/L
Tartrato de sodio y potasio	200.0 g/L

Procedimiento

- 1.- Precalear agua destilada (100 mL) en vaso de precipitado a 50 °C con agitación
- 2.- Adicionar el DNS, el hidróxido de sodio, el tartrato de sodio y potasio, el fenol y el sulfito de sodio (En ese orden).
- 3.- Aforar con agua destilada al volumen deseado
- 4.- Forrar el contenedor con aluminio y almacenar en refrigeración

Nota: La disolución obtenida puede usarse durante 2 meses, si se guarda en la oscuridad y en refrigeración.

Referencia

Miller, 1959

ANEXO 8 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENDO-GLUCANASA

FUNDAMENTO

En este caso se detecta la actividad de las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en las regiones internas de la molécula de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización.

Material

Tubos de ensaye de vidrio (13 x 100)

Carboximetil celulosa a 500 ppm ó 100 ppm (Sustrato)

Buffer de Acetatos 0.1 M a pH 4.8 ó citratos 50 mM a pH 4.8

Baño maría a 50 °C

Reactivos para determinación de azúcares reductores (Miller - DNS) ó (Somogi-Nelson)

Procedimiento

☉ Blanco de enzima (BE):

En un tubo de ensaye colocar 200 μ L de buffer más 50 μ L de extracto enzimático

☉ Blanco de sustrato (BS):

En un tubo de ensaye colocar 200 μ L de sustrato más 50 μ L de buffer.

☉ Mezcla de reacción (MR):

En un tubo de ensaye colocar 200 μ L de sustrato más 50 μ L de extracto enzimático.

1. Cada tubo se coloca en baño maría a 50 °C durante 10 minutos y se detiene la reacción mediante ebullición en baño maría durante 5 minutos.

2. A cada tubo se le miden azúcares reductores. Cada una de las determinaciones debe realizarse por triplicado o de acuerdo a las muestras que se tengan. Los tubos pueden ser incubados simultáneamente.

Referencia

Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. Pure&Appl. Chem. 59: 257 – 268.

ANEXO 9 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD EXO-GLUCANASA

FUNDAMENTO

En este caso se detecta la actividad de las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en las regiones externas de la molécula de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización.

Metodología

Material

Tubos de ensaye (13 x 100)

Tiras de papel filtro Whatman #1 de 1 cm x 6 cm (Sustrato)

Buffer de Ac Cítrico/Citrato de Na 0.1 M a pH 4.8

Baño maría a 50 °C

Reactivos para determinación de azúcares reductores (Miller - DNS).

Procedimiento

Ⓢ Blanco de enzima (BE):

En un tubo de ensaye colocar 1 mL de buffer y se colocan 50 μ L de extracto enzimático

☉ **Blanco de sustrato (BS):**

En un tubo de ensaye colocar 1 mL de buffer y se colocan una tira de papel filtro

☉ **Mezcla de reacción (MR):**

En un tubo de ensaye colocar 1 mL de buffer y se colocan una tira de papel filtro. Se adicionan 50 μ L de extracto enzimático.

1. Cada tubo se coloca en baño maría a 50 °C durante 1 h y se detiene la reacción mediante ebullición en baño maría durante 5 minutos.
2. A cada tubo se le miden azúcares reductores. Cada una de las determinaciones debe realizarse por triplicado o de acuerdo a las muestras que se tengan. Los tubos pueden ser incubados simultáneamente.

Referencia

Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure&Appl. Chem.* 59: 257 – 268.

ANEXO 10 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES POR EL MÉTODO DE FENOL-SULFÚRICO

FUNDAMENTO

El método propuesto por Dubois et al en 1956 se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y temperaturas altas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa con el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismo y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de los compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con el fenol.

Materiales

- ☉ Muestra hidrolizada (Extracto)
- ☉ Matraz de aforación
- ☉ Papel filtro
- ☉ Fenol 5 %
- ☉ Autoclave
- ☉ Glucosa 500 ppm
- ☉ Agua destilada
- ☉ Vortex
- ☉ Micropipetas
- ☉ Tubos de ensayo 3*100 ml
- ☉ H₂SO₄ concentrado
- ☉ Espectrofotómetro

Procedimiento

1. 250 µl de muestra
2. Añadir 250 µl de fenol al 5 % en H₂SO₄
3. 3. Agitar en vortex y dejar en baño de agua con hielo por 5 min
4. Añadir 1 mL (1000 µl) de ác. sulfúrico H₂SO₄ concentrado
5. Agitar en vortex cuidadosamente y ebulir por 5 min
6. Enfriar a temperatura ambiente por 5 min
7. Leer en espectrofotómetro a una absorbancia de 480 nm

Nota: la curva de calibración se realiza con glucosa o xilosa

Referencias

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith F. (1956).Colorimetric method for determination of sugars and related substances.Analytical Chemistry. 28:3:350-356.

9.- BIBLIOGRAFÍA

Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor, S.A. Mexico. Pág. 162-177.

Alquicira Paez Lizbeth. Determinación de la especificidad de proteasas fúngicas en la hidrólisis de proteína. (Tesis Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, (2003).

Aubert, J. 1988. Biochemistry and Genetics of Cellulose degradation. Academic press. Usa. Pág 11.

Badui Dergal S. Química de los alimentos. México, 2006, Cuarta edición, Reacciones de oscurecimiento o pardeamiento, pag. 59-69.

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.x.

Béguin, P. & Aubert, J.-P. 1994. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol Rev. 13, 25-58.

Bély M, Makovitzky J. Sensitivity and specificity of red Congo Staining to Romhányi, comparison with Puchtler's or Benhold's methods. Acta histochemica 2006; 108:175-121.

Berkhoff H, Vinal C. Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive Escherichia coli pathogenic for poultry. Avian diseases 1986;30 (1):117-121.

Bühler, M., Limper, J., Müller, A., Schwarz, G., Simon, O., Sommer, M., y Spring, W. 1998. Las enzimas en la nutrición animal. Ed. AWT. Bonn, Alemania.

Carlón G.; El Uso de Enzimas en la Alimentación de las Aves. MVZ. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2007.

Carrard G, Koivula A, Soderlund H, Beguin P: Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:10342–10347.

Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M. & Brown, R. M., Jr. 2007. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*. 8, 1-12.

Escalante A, Rodriguez Diaz L, Medina A, Labastida C, Capella S, Vera L. Characterization of three Agave Species by gas Chromatography and solid – phase microextraction – gas chromatography – mass spectrometry. *J Chromatography*. 2004;1027:131 – 136.

Escalante A, Rodriguez M, Martinez A, López-Munguía A, Bolivar F, Gosset G. Characterization of bacterial diversity in Pulque a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Letters*. 2004;235:273-279.

G. Immanuel, C. Bhagavath, P. Iyappa Raj, P. Esakkiraj & A. Palavesam (2007) Production and Partial Purification of Cellulase by *Aspergillus niger* and *A. fumigates* Fermented in Coir waste and Sawdust. *The Internet Journal of Microbiology*. 2007 Volumen 3 Number 1.

González, J. M.; *Enzimas*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad del País Vasco, 2010.

Hendricks, C. Doyle, J and Hugley, B. 1995. A New Solid medium for Enumerating Cellulose-Utilizing Bacteria in Soil. *Appl. Environ Microbiol*. 61: 2016-2019.

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.

Henrissat, B. & Romeu, A. 1995. Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl hydrolases. *Biochem J*. 311 (Pt 1), 350-1.

Henrissat, B. & Bairoch, A. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 293 (Pt 3), 781-8.

Lee S. 2004. Development of a plate technique for screening of Polysaccharide-degrading microorganism by using a mixture of insoluble chromogenic substrate. *J Microbiol Methods.* 56:375-382.

Lyman, E. Li, B. And Renganathan, V. 1995. Purification and Characterization of a cellulose-binding β -glucosidase from cellulose-degrading cultures of a *Phanaerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ Microbiol.* 8: 2976-2980.

Lynd, L., Weimer, P., Zyl, H., Pretorius, I 2002. Microbial Cellulose utilization : Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 16: 577-583.

Lynd, L., Weimer, P., Zyl, H., Pretorius, I. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 16: 577-583.

Maldonado C, Bayona M, Poutou R. Efecto antagónico de *Zymomonas mobilis* spp. Frente a *Salmonella* sp. y *Proteus mirabilis*. *Unv Scient* 2001;6:17-25.

Maldonado C, Bayona M, Poutou R. Efecto antagonico de *Zymomonas mobilis* ssp. Frente a *Salmonella* sp y *Proteus mirabilis*. *Unv Scient* 2001; 6:17-25.

Malherbe, S y Cloete, T. E. 2002. Lignocellulose Biodegradation: Fundamentals and applications. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology* 1: 105-114.

Mansfield, S; Mooney, Cy Saddler, J. 1999. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnol. Prog* 15:804-816.

Miller G.L., (1989) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.

- 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.
- Plomion, C., Leprovost, G. & Stokes, A. 2001. Wood Formation in Trees. *Plant Physiol.* 127, 1513-1523.
- Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 55, 35-58.
- 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.
- Swings, J. y J de Ley, " The biology of *Zymomonas*", *Bacteriol., Rev .*, 41, pp 1-46 1977.
- Ten , L; Im, W; kim, M; Kang, M; Lee S. 2004. Development of a plate technique for screening of Polisaccharide-degrading microorganism by using a mixture of insoluble chromogenic substrate. *J Microbiol Methods.* 56:375-382.
- 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
- Withers, S. G. 2001. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr Polym.* 44, 325-337
- Zhang, Y. Himmel, M. Mielenz, J. 2006 Outlook for Cellulase improvement: Screening and selection Strategies. *Biotechnology Advances* 24: 452-481.