

# “UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO”



DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables  
sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”

## TESIS

Presentada por:

**JANETH ALEJANDRA ACOSTA ARANDA**

Para obtener el grado de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Buenavista, Saltillo, Coahuila; México.

Junio de 2013

**“UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO  
NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables  
sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

TESIS:

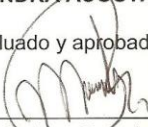
Que se somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial para  
obtener el título de:


**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

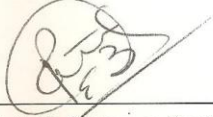
Presentado por:


**JANETH ALEJANDRA ACOSTA ARANDA**

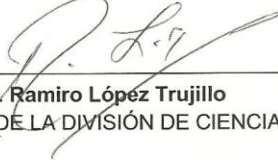
El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité:

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Mario A. Cruz Hernández**  
PRESIDENTE

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. Armando Robledo Olivo**  
SINODAL I

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Ruth E. Belmares Cerda**  
SINODAL II

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**  
SINODAL III

  
\_\_\_\_\_  
**DR. Ramiro López Trujillo**  
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Junio de 2013**

*El principio de la sabiduría es el temor de  
dios*

*Y el camino de la vida es hacia arriba al  
entendido.*

*Proverbios. 1:7; 15-24.*

## *Agradecimientos*

*Ha sido un momento lleno de esfuerzos y sacrificios, cerrada esta etapa, me queda agradecer principalmente a Dios por permitirme llegar a esta instancia del camino, en donde me vuelvo toda una profesional.*

*A mis padres **Juan y Martha**, quienes me han dado su amor incondicional, por creer en mí. Por hacerme realidad mi sueño de estudiar una carrera que me llena de orgullo.*

*A mis hermanos, **Aídee y Fernando**, por caminar conmigo durante este tiempo y el cariño que siempre me han brindado.*

*Al **M.C. Armando Robledo Olivo**, mi asesor de tesis, por la confianza depositada en mí, su apoyo y paciente guía para la realización de este trabajo que me engrandece profesionalmente y me impulsa a seguir adelante para mi desarrollo humano e intelectual.*

*A los **Doctores Mario A. Cruz Hernández, Ana V. Charles Rodríguez, Ruth E. Belmares Cerda** por sus conocimientos y consejos, por su apoyo en el momento en que yo los necesité. A ustedes mi admiración y respeto.*

*A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** que me permitió formarme profesionalmente a través de su personal docente.*

*A **J. Adrián Rosales Martínez**, mi novio quien lloró y rio en cada momento junto a mí y fue capaz de contenerme cuando todo iba mal. Gracias por amarme como solo tú lo puedes hacer.*

*A mis compañeras y amigas, **Carmen, Betsabe, Catalina, Pamela, Alejandra, Karol y Eduardo**, por todas las experiencias compartidas, cariño y apoyo.*

*A mis compañeros de laboratorio **Angélica, Abigail, Laura, María, Alex y Ulises** que de alguna u otra manera me apoyaron en la realización de mi trabajo y por los gratos e inolvidables momentos compartidos.*

*A quienes tienen tiempo de leer esta tesis*

*A quienes hoy me acompañan, Gracias.*

*Dedicatoria*

*A todos aquellos  
Quiénes forman  
Y han formado parte de mi vida*

## **ÍNDICE DE CONTENIDO**

<b>CAPÍTULO 1.-RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO 2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
3.1 JUSTIFICACIÓN .....	4
3.2. HIPÓTESIS .....	5
3.3. OBJETIVOS .....	5
3.3.1. OBJETIVO GENERAL .....	5
3.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
<b>CAPÍTULO 4. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>7</b>
4.1. EMPLEO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES .....	8
4.1.1. OLOTE DE MAÍZ .....	9
4.1.2. FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO .....	11
4.1.3. CARACTERÍSTICAS DE LA FERMENTACIÓN SÓLIDA .....	11
4.2. DEFINICIÓN DE ENZIMA.....	12
4.2.1. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS.....	13
4.2.2. ENZIMAS TERMOESTABLES.....	16
4.3. CELULASAS .....	18
4.3.1. TIPOS DE CELULASAS .....	18
4.3.2. MECANISMO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	19
4.3.3. CELULASAS TOTALES .....	20
4.3.4. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASAS.....	20
4.4. PROTEASAS .....	21

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

4.4.1. TIPOS DE PROTEASAS.....	21
4.4.2. MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEASA .....	23
4.4.3. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PROTEASAS.....	23
4.4.4. PROTEASAS TERMOESTABLES.....	24
4.5. CONDICIONES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. ....	25
4.5.1. CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA Y EL SUSTRATO .....	25
4.6. TEMPERATURA .....	27
4.6.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN .....	27
4.6.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA. ....	29
4.7. POTENCIAL HIDRÓGENO.....	30
4.7.1. EFECTO DEL pH.....	30
4.7.2. EFECTO DEL pH EN LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA. ....	31
4.8. PHYLUM ZYGOMYCOTA.....	32
4.8.1. TAXONOMÍA DE LOS ZIGOMICETOS .....	32
4.8.2. ESTRUCTURA Y FISIOLOGÍA DE LOS ZIGOMICETOS.....	34
4.8.3. ORDEN MUCORALES .....	34
4.8.4. FAMILIA <i>Mucoraceae</i> .....	35
<b>CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>37</b>
5.1. CONDICIONES INICIALES Y PROPAGACIÓN DE LA CEPA.....	37
5.1.1. MICROORGANISMO UTILIZADO .....	37
5.1.2. CRECIMIENTO A 50 °C .....	37
5.1.3. PREPARACIÓN DEL SOPORTE .....	37

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

5.1.4. TRATAMIENTO DE RESIDUOS AGRO-INDUSTRIALES PARA USO COMO SOPORTE INERTE .....	38
5.1.5. PRESERVACIÓN DEL MICROORGANISMO EN GLICEROL-LECHE DESCREMADA .....	38
5.2. DETECCIÓN DE FORMA CUALITATIVA DE PRODUCCIÓN DE LAS ENZIMAS EXTRACELULARMENTE: ETAPA 1.....	39
5.2.1. ACTIVIDAD CELULOLITICA .....	39
5.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA Y CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN: ETAPA 2. ....	41
5.3.1. FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO .....	41
5.3.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	41
5.3.3. CONDICIONES INICIALES DE LA FERMENTACIÓN .....	42
5.3.4. EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE FERMENTACIÓN EN SÓLIDO.....	42
5.3.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	43
5.3.6. DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES (MÉTODO DE MILLER 1989).....	43
5.3.7. DETERMINACIÓN DE L-TIROSINA (METODO DE KUNITZ 1946) .....	44
5.3.8. CUANTIFICACIÓN DE U/ mL .....	44
5.3.9. EVALUACIÓN DE AZUCARES TOTALES Y AZUCARES REDUCTORES PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE SUSTRATO .....	45
5.3.10. DETERMINACIÓN DE BIOMASA.....	45
5.3.11. PARÁMETROS CINÉTICOS INVOLUCRADOS CON EL SUSTRATO .....	46
5.3.12. CINÉTICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO .....	46
5.3.13. CINETICA DE PRODUCCIÓN DE CELULASA Y PROTEASA .....	47



**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

5.4. TEMPERATURA Y pH ÓPTIMO, ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS: ETAPA 3.....	47
5.4.1. POTENCIAL DE HIDRÓGENO (pH) ÓPTIMO DE CELULASA.....	47
5.4.2. pH ÓPTIMO DE PROTEASA.....	48
5.5. TEMPERATURA ÓPTIMA DE LAS ENZIMAS.....	48
5.5.1. TEMPERATURA ÓPTIMA DE CELULSAS.....	48
5.5.2. TEMPERATURA ÓPTIMA DE PROTEASA.....	48
5.6. ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS ENZIMAS.....	49
5.6.1. ESTABILIDAD TÉRMICA DE CELULASA.....	49
5.6.2. ESTABILIDAD TÉRMICA DE PROTEASA.....	50
5.6.3. PARÁMETROS CINÉTICOS RELACIONADOS CON LA ESTABILIDAD TÉRMICA.....	50
<b>CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
6.1. CONDICIONES INICIALES Y PROPAGACIÓN DE LA CEPA.....	52
6.2.1. ACTIVIDAD CELULOLÍTICA.....	52
6.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA Y CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN: ETAPA 2.....	55
6.3.1. BIOMASA.....	55
6.3.2. SUSTRATO.....	57
6.3.3. PRODUCTO.....	59
6.4. TEMPERATURA Y pH ÓPTIMO, ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS: ETAPA 3.....	62
6.4.1. pH ÓPTIMO DE LAS ENZIMAS.....	62
6.4.2.- TEMPERATURA ÓPTIMA.....	64
6.4.3. ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS ENZIMAS.....	65
<b>CAPÍTULO 7. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>68</b>

<b>CAPÍTULO 8. ANEXOS .....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>73</b>

### **INDICE DE FIGURAS**

FIG. 1. OLOTE DE MAÍZ.....	10
FIG. 2. RESIDUO AGROINDUSTRIAL (OLOTE DE MAÍZ).....	10
FIG. 3. LAS DOS POSIBLES CONFIGURACIONES DE CARBONO ANOMÉRICO DE LA GLUCOSA DESPUÉS DE LA HIDRÓLISIS DE CELULOSA: B (A LAS IZQUIERDA), LO QUE INDICA UN MECANISMO DE RETENCIÓN, Y A (A LA DERECHA) INDICA INVERSIÓN. ....	19
FIG. 4. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO SOBRE EL ÍNDICE DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (LEHNIGER 1993).....	26
FIG. 5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (LEHNIGER 1993).....	26
FIG. 6. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE UNA ENZIMA, LAS ENZIMAS VARÍAN CON RESPECTO A SU ESTABILIDAD TÉRMICA. LA PROPORCIÓN DESCENDENTE DE LA CURVA SE DEBE A LA DESNATURALIZACIÓN.....	28
FIG. 7. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS. ....	29
FIG. 8. EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	31
FIG. 9. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA VELOCIDAD DE INACTIVACIÓN DE LAS ENZIMAS A DIFERENTES VALORES DE PH.....	31
FIG. 10. ESTRUCTURA MORFOLÓGICA DEL ORDEN MUCORALES (WAINWRIGHT 1992)....	35
FIG. 11. AGAR ROJO- CONGO Y CARBOXIMETIL CELULOSA 0. 5%.....	39
FIG. 12 AGAR ROJO- CONGO CON SUERO DE LECHE 0.5%.....	40
FIG. 13 SOLIDIFICACIÓN DEL AGAR ROJO – CONGO. ....	40
FIG. 14 INOCULACIÓN DE LA CEPA. ....	40
FIG. 15 INCUBACIÓN A 50 °C. ....	40
FIG. 16.- CAMARA DE NEUBAUER. ....	41
FIG. 17 FERMENTACIÓN EN EXTRACTO SÓLIDO .....	43
FIG. 18 EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA.....	43

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

FIG. 19. AGAR ROJO- CONGO (TESTIGO).....	53
FIG. 20. AGAR ROJO – CONGO Y SUERO DE LECHE (0.5%).....	53
FIG. 21. AGAR ROJO – CONGO Y CARBOXIMETIL-.....	53
FIG. 22. PRODUCCIÓN DE BIOMASA POR <i>RHIZOMUCOR PUSILLUS</i> (SOC-4A); (◇) TEÓRICO; (-) EXPERIMENTAL. ....	56
FIG. 23. AZUCARES TOTALES; (◇) TEÓRICO; (--) MODELO EXPERIMENTAL. ....	58
FIG. 24. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CELULASA; (◇) TEÓRICO; (-) EXPERIMENTAL.....	60
FIG. 25. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PROTEASA; (◇) TEÓRICO; (-) EXPERIMENTAL.....	60
FIG. 26. PH ÓPTIMO Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CELULASA.....	62
FIG. 27. PH ÓPTIMO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PROTEASA.....	63
FIG. 28. TEMPERATURA OPTIMA DE CELULASA. ....	64
FIG. 29. TEMPERATURA OPTIMA DE PROTEASA. ....	65
FIG. 30. ESTABILIDAD TÉRMICA DE CELULASA; (◇) 75 °C; (□) 85 °C; (Δ) 90 °C, TEÓRICO; (---) EXPERIMENTAL. ....	66
FIG. 31. ESTABILIDAD TÉRMICA DE PROTEASA; (◇) 65 °C; (□) 75 °C; (Δ) 85 °C, TEÓRICO; (---) EXPERIMENTAL. ....	67

**INDICE DE TABLAS**

TABLA 1. CONTENIDO DE CELULOSA, HEMICELULOSA Y LIGNINA EN DIFERENTES BIOMASAS LIGNOCELULÓSICA EN BASE SECA. ADAPTADO DE SUN Y. Y CHENG, J. (2002), KLASS D., (1998) Y BALAT., (2010).....	9
TABLA 2. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE ENZIMAS .....	15
TABLA 3. REACCIONES DE BIOCONVERSIÓN Y APLICACIONES DE ENZIMAS TERMOESTABLES (RAKSHID 2003). ....	17
TABLA 4. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS RESPECTO DE SU SITIO DE ACCIÓN A LO LARGO DE LA CADENA POLIPEPTÍDICA SEGÚN EL COMITÉ DE NOMENCLATURA DE LA UNIÓN INTERNACIONAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR (TOMADO DE RAO <i>ET AL.</i> , 1998). LOS CÍRCULOS BLANCOS (○) REPRESENTAN LOS RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS EN LA CADENA POLIPEPTIDICA. LOS CÍRCULOS OSCUROS (●) INDICAN EL	

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

AMINOÁCIDO TERMINAL. LAS FLECHAS (---) INDICAN EL SITIO DE ACCIÓN DE LAS ENZIMAS. ....	22
TABLA 5. CEPAS COMÚNMENTE PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEASAS. ....	24
TABLA 6. PHYLUM ZYGOMYCOTA, CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y FISIOLÓGICA. ....	33
TABLA 7. RASGOS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LOS GÉNEROS DE LA FAMILIA <i>MUCORACEA</i> (WEITZMAN <i>ET AL.</i> , 1995). ....	36
TABLA 8 .....	42

## **1.-RESUMEN**

La utilización de residuos industriales resulta ser atractivo para la realización de estudios sobre la producción de enzimas. Sus características son muy variadas, pero el principal componente en diferentes porcentajes es la celulosa, lignina y hemicelulosa, sustrato atractivo para la producción de enzimas de interés industrial por fermentaciones microbianas. Los estudios cinéticos en fermentaciones se vuelven importantes, ya que permiten estudiar los valores y tiempos óptimos para la maximización de los rendimientos. De las enzimas más importantes a nivel industrial, destacan las proteasas y celulasas. Ambas con aplicaciones en los alimentos, detergentes, farmacéutica y cosmética. Existen principalmente dos procesos por los cuales, se pueden producir enzimas: Fermentación en medios sólidos (FMS) y Fermentación en medio líquido (FML). En esta investigación se ha buscado una alternativa para el aprovechamiento de un residuo en el estudio de producción de enzimas termoestables celulasas y proteasas, evaluando: la cinética de producción, los valores óptimos de actividad del extracto, así como la estabilidad térmica de la enzima. El objetivo general fue producir de forma extracelular las enzimas celulasa y proteasa por *Rh. pusillus* SOC-4A en FMS empleando olote de maíz como soporte-sustrato. Los objetivos específicos fueron evaluar la producción extracelular de las enzimas por *Rh. pusillus* SOC- 4A. Se realizaron cinéticas de fermentación, así como también se estudio el pH y temperatura óptima, y la estabilidad térmica de las enzimas. Se obtuvo la presencia extracelular de las enzimas en el medio cromogénicos de agar rojo-congo, y se presentó las zonas claras alrededor de las colonias, así como una actividad enzimática a un pH óptimo de 7.0 tanto para celulasa como para proteasa, con una temperatura óptima de 55 °C y 60 °C respectivamente. También *Rh. pusillus* (SOC- 4A) presentó una capacidad de producir enzimas extracelulares capaces de mantener más del 50 % de estabilidad a temperaturas de 85 y 90 °C durante 30 min.

**PALABRAS CLAVE:** proteasa, celulasa, olote de maíz

## **2. INTRODUCCIÓN**

La utilización de residuos industriales resulta ser atractivo para la realización de estudios sobre la producción de enzimas de importancia industrial. Valdez-Vazquez *et al.*, (2010) reportó que en México en el 2006 se produjeron 75.73 millones de toneladas de materia seca proveniente de 20 cultivos, de los cuales 60.13 millones de toneladas corresponden a residuos primarios, obtenidos al momento de la cosecha, entre los que están: hojas y tallos del maíz, tallos y vaina de sorgo, puntas y hojas de caña de azúcar, paja de trigo, paja de cebada, de frijol, así como cáscara de algodón. El resto, 15.60 millones de toneladas corresponden a residuos secundarios obtenidos del procesamiento post-cosecha, entre los que están el bagazo de caña de azúcar, bagazo de maguey o agave, mazorcas y olotes, así como pulpa de café

En general las características de los residuos son muy variadas, no obstante, comparten una característica principal que es el contenido de materia orgánica, del cual el principal componente de los residuos agroindustriales es la lignocelulosa, constituida por diferentes porcentajes de celulosa (40-60 %), lignina (10-25%), hemicelulosa (20-40%) (BNDES, 2008) y pectina; sustratos atractivos para la producción de enzimas de aplicación industrial, principalmente de aquellas que son inducibles, entre las que destacan: la celulasa, la hemicelulasa, la xilanasas y la pectinasa, las cuales marcaron una época en la historia de la biotecnología.

La capacidad que tienen algunos microorganismos para producir enzimas, es muy valiosa debido a la gran importancia que tienen dichos metabolitos a nivel industrial. Algunas bacterias, hongos y actinomicetos, aerobios, anaerobios, mesofílicos y termofílicos, cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para este propósito. Por tal razón, el estudio de estos microorganismos representa un importante recurso para lograr la disminución del impacto ambiental, con el aprovechamiento de residuos industriales que pueden servir como sustratos en fermentaciones microbianas. La optimización de la producción de enzimas a partir

## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

de microorganismos depende de una serie de factores interrelacionados, lo que significa que una enzima solo puede sintetizarse durante parte del ciclo de crecimiento. Es por ello que los estudios cinéticos en fermentaciones para la producción de metabolitos de interés se vuelve importante, ya que permite estudiar los valores y tiempos óptimos para la maximización de los rendimientos en cualquier medio de cultivo.

De las enzimas más importantes a nivel industrial, destacan las proteasas y celulasas, las cuales pertenecen al grupo de las hidrolasas, debido a sus diversas aplicaciones. Las proteasas son enzimas que degradan los sustratos de origen proteico dando como resultado cadenas más cortas (péptidos) o aminoácidos libres siendo las alcalinas las más utilizadas, mientras que las celulasas son enzimas que hidrolizan el puente glicosídico entre dos o más carbohidratos.

Actualmente una gran proporción disponible de las proteasas comerciales son derivadas de cepas de *Bacillus*; aunque también han sido empleadas las de origen fúngico. Las proteasas son enzimas de importancia central debido a que ocupan una posición primaria en ambos campos, tanto en el fisiológico como el comercial ya que son ampliamente usadas en alimentos, bebidas, panificadoras, ablandamiento de carne, síntesis del aspartame, tratamientos de pieles, detergentes e industria peleteras (Vazquez, 2008); sin olvidar su aplicación farmacéutica.

Las celulasas tienen aplicaciones importantes en la industria de producción de alimentos, detergentes y en la formulación de medicamentos. La celulosa (un polisacárido), es el principal componente de la membrana celular de las plantas y es el polímero más abundante en la biosfera. La mayor parte de los procedimientos estudiados a escala preindustrial utilizan enzimas celulasas producidas por *Trichoderma reesei*.

Los bioprocesos representan una alternativa atractiva para utilizar los residuos industriales como fuentes inductoras para el desarrollo de proteasas fúngicas. La utilización y aprovechamiento de residuos industriales que son susceptibles a la

## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

transformación para generar otro producto de valor económico, de interés comercial y/o social, fueron en la década de los años 70, un enfoque importante de estudio para una parte de los biotecnólogos de todo el mundo, actualmente mejor conocido como sustentabilidad.

Existen principalmente dos procesos por los cuales, se pueden producir enzimas: Fermentación en medios sólidos (FMS) y por fermentación en medio líquido (FML). El primero se utiliza preferencialmente para la producción de enzimas fúngicas ya que, a diferencia de la fermentación en medio líquido, es un método muy sencillo y de bajo costo, se obtiene en mayores volúmenes de producción, se generan bajas cantidades de aguas de desecho y se pueden emplear residuos agroindustriales mínimamente pre-tratados (Mitchell *et al.*, 2000; Pandey, 2003, Sandhya *et al.*, 2005).

### **3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 JUSTIFICACIÓN**

Actualmente una de las problemáticas que acontece a la degradación de la calidad del medio ambiente; son los residuos agro-industriales que son esparcidos en el ecosistema provocando una acumulación de estos y finalmente la contaminación de los recursos naturales: suelo, agua y aire, además de plantas y animales de los alrededores. Es por eso, que se han buscado alternativas que favorezca la reutilización de estos residuos, no solo favoreciendo al medio ambiente sino logrando la disminución de costos para las investigaciones tanto a nivel laboratorio como industrial.

En México se producen 9.25 millones de toneladas de olote de maíz por año como residuo vegetal, mismas que deben ser aprovechadas para obtener productos de valor agregado; como es el caso de las enzimas, siendo esta el área donde se le ha buscado una alternativa para el aprovechamiento de este residuo en el estudio



## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

de producción de enzimas termoestables, utilizando la Fermentación en estado sólido ya que además de ser un proceso fácil y de bajo costo, permite emplear el olote como soporte-sustrato.

En el presente trabajo se empleó el olote de maíz como soporte-sustrato para la producción de celulasa y proteasa en FMS por *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A), evaluando la cinética de producción, los valores óptimos de actividad del extracto, así como la estabilidad térmica de la enzima. Lo anterior llevado a cabo en las instalaciones del Departamento en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Hasta el momento, no existen reportes relacionados a la producción de enzimas termoestables usando olote como soporte-sustrato en fermentación en estado sólido.

### **3.2. HIPÓTESIS**

La cepa *Rh. pusillus* **SOC-4A** sintetizará extracelularmente celulasa y proteasa termoestables en fermentación en estado sólido empleando olote de maíz como soporte-sustrato.

### **3.3.- OBJETIVOS**

#### **3.3.1.- OBJETIVO GENERAL**

- Producir las enzimas celulasa y proteasa por *Rh. pusillus* SOC-4A en medio sólido empleando olote de maíz como soporte-sustrato.

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

**3.3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar en placa la síntesis extracelular de enzimas celulasa y proteasa de *Rh. pusillus* (SOC-4A) por un método cromogénico.
- Realizar cinéticas de fermentación para la síntesis de celulasa y proteasa de *Rh. pusillus* (SOC-4A) en medio sólido empleando olote de maíz como soporte-sustrato.
- Caracterizar el pH y temperatura óptimos de reacción para las enzimas celulasa y proteasa de *Rh. pusillus* (SOC-4A)
- Evaluar la estabilidad térmica a pH y temperatura óptima de reacción para las enzimas celulasa y proteasa de *Rh. Pusillus* (SOC-4A).

#### **4.- LITERATURA CITADA**

La ingeniería enzimática se inicia el siglo antepasado, cuando Takamine en 1873 patentó las amilasas (diastasas) producidas por hongos en fermentación sólida y Hansen inició, en 1875, una empresa para la extracción de renina de ternera. Takamine se instaló posteriormente en Estados Unidos, alrededor de 1890, para producir la takadiastasa, una mezcla de amilasas y proteasas de *Aspergillus oryzae* (García *et al.*, 1993).

Para el primer cuarto del siglo pasado, ya se usaban enzimas proteolíticas de origen animal y vegetal, habiéndose otorgado una patente a Wallerstein (1910) para el uso de papaína en la clarificación en frío de cerveza y la famosa patente de Rohm en 1913 para el uso de tripsina en detergentes. Tunga y Banerjee (1999) realizaron un sistema de producción de proteasas utilizando un grupo de Ficomicetos, en especial al *Rizhopus oryzae*; ya que en estudios previos se identificó como productor de una proteasas alcalina. Dicho sistema consistió en la fermentación en estado sólido utilizando como soporte salvado de trigo (Tunga (a), 1999).

El primer hongo termófilo estudiado fue *Mucor pusillus*, el cual fue aislado del pan y descrito hace siglos por Lindt (1886). Tiempo después Tsiklinskaya descubrió otro hongo temofilo, *Thermomyces lanuginosinus*, desarrollado en una papa (Maheshwari *et al.*, 2000).

Muchas enzimas importantes de producción industrial, como las proteasas, son obtenidas utilizando fermentación. Las proteasas de género *Mucor* han sido principalmente utilizadas en la industria del queso para la coagulación de la leche y como sustituto de la quimosina de ternero (Sousa *et al.*, 2002; Nouani *et al.*, 2011).

Gumaraes *et al.*, (2007) reportaron la producción a nivel laboratorio de D-fructofuranosidasa a partir de residuos agroindustriales de harina de yuca,

## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

mazorcas de olote, harina de avena, paja de arroz, bagazo de caña y salvado de trigo, por fermentación en cultivo sumergido con una cepa de *Aspergillus ochraceus*. La enzima tiene aplicación en la industria alimentaria para la elaboración de azúcares invertidos no cristalizables incluidos en mermeladas, dulces y chocolates suaves.

### **4.1.- EMPLEO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

Se han tomado diferentes criterios para la selección de residuos con fines de aprovechamiento biotecnológicos, algunos de ellos son que el principal componente pueda ser utilizado como sustrato para producción fermentativa, que el residuo esté disponible localmente y en cantidades necesarias, que no requieran pre-tratamientos y en caso de ser requerido que este sea sencillo y económico, que la disponibilidad del residuo permita planificar el proceso para el cual se va a utilizar y que sea estable, es decir, que no se descomponga fácilmente. Además, estos residuos deben de cumplir ciertas propiedades físico-mecánicas, para que puedan ser utilizados como soporte-sustrato para la producción fermentativa de los metabolitos de interés.

Estudios realizados por Botella *et al.*, (2005) demuestran que a partir de residuos de uva con una cepa de *Aspergillus awamori* obtuvieron mediante fermentación sólida a nivel laboratorio, una mezcla de celulasas, xilanasas y pectinasas, de aplicación en la industria textil, química y de alimentos. Oliveira *et al.*, (2006), obtuvieron enzimas xilanólíticas a partir de mazorcas y olotes, cáscara de avena y bagazo de caña por fermentación sumergida a nivel de laboratorio, con una cepa de *Penicillium janthinellum*, para ser utilizadas como aditivo en alimento de aves de corral, fabricación de pastas, harina de trigo y procesos de blanqueo en la industria química). Thanapimmentha *et al.*, 2012 reporta la producción de proteasas de *Aspergillus oryzae* en fermentación sólida de residuos de *Jatropha curcas*; las proteasas producidas pueden ser de utilidad en la industria de alimentos, farmacéutica y de papel.

## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

### **4.1.1.- OLOTE DE MAÍZ**

El residuo del desgranado del maíz (*Zea mays L.*) se conoce como olote de maíz, un tejido esponjoso y blanco que representa la médula donde se almacenan las reservas alimenticias del cereal (Fig. 1). Está compuesto en base seca por celulosa (45 %), hemicelulosa (35 %) y lignina (15 %) (Tabla 1). Actualmente en México el olote se emplea como forraje y soporte para disminuir la erosión en la tierra, ambos procesos con bajos rendimientos y poco redituables, de otra manera, los residuos del maíz son incinerados o esparcidos en la intemperie, generando contaminación ambiental (Fig. 2). Para emplear los residuos de la cosecha del maíz, evitando la contaminación por ellos y además generar metabolitos de interés como lo son las enzimas, se requiere el desarrollo de tecnologías que nos permitan obtener altos rendimientos, empleando el olote como soporte-sustrato (Robledo *et al.*, 2012).

**Tabla 1. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en diferentes biomásas lignocelulósicas en base seca. Adaptado de Sun Y. y Cheng, J. (2002), Klass D., (1998) y Balat., (2010).**

	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Extractivos (%)	Referencia
Maderas duras	40-55	24-40	18,25	3-8	1
Maderas blandas	45-50	25-35	25,35	2-5	1
Cáscaras de frutos	25-30	25-30	30-40	-	1
Mazorcas de maíz	45	35	15	-	1
Pastos	25-40	35-50	10-30	-	1
Papel	85-99	0	0-15	-	1
Paja de trigo	30	50	15	-	1
Hojas	15-20	80-95	0	-	1
Semillas de algodón	80-95	5-20	0	-	1
Papel periódico	40-55	25-40	18-30	-	1
Pulpa residuo	60-70	10-20	5-10	-	1
Desechos sólidos primarios	8-15	-	24-29	-	1
<i>Switch grass</i>	45	31,4	12,0	-	1
Bagazo de caña	22	15	11	-	2
Paja de trigo	37-41	27-32	13-15	5-9	2
Tallo de maíz	39-47	26-31	3-5	1-3	3

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---



Fig. 1. Olote de maíz.



Fig. 2. Residuo agroindustrial (Olote de maíz).

#### **4.1.2.- FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO**

La fermentación en medio solido está definida como una fermentación en ausencia (o cerca a la ausencia) de 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).

Mediante el uso de procesos de fermentación es posible la producción de compuestos de valor agregado. En este tipo de fermentación los residuos son utilizados como fuente de carbono-energía (Pandey *et al.*, 2000). Debido a que la composición del complejo enzimático producido por la fermentación de hongos, depende fuertemente de la lignocelulosa utilizada como sustrato, los microorganismos y las condiciones de cultivo (Uhlig, 1998 y Ovadón- Chacón & Waliszewki, 1998), existen reportes que describen la utilidad de la FMS al alcanzar un nivel específico en la producción de ciertas enzimas hidrolíticas (Viniestra-González *et al.*, 2003; Dos Santos *et al.*, 2004; Rodriguez & Sanromán, 2006 & Aguilar *et al.*, 2008), tales como pectinasas, hemicelulasas y celulasas, necesarias para una hidrólisis enzimática efectiva de residuos agroindustriales (Siqueira *et al.*, 2010).

La fermentación en medio solido se torna atractiva para la obtención de enzimas de origen fúngico, principalmente por el uso de una tecnología relativamente simple. La utilización de residuos agroindustriales como sustrato promueve una alternativa de usos.

#### **4.1.3.- CARACTERÍSTICAS DE LA FERMENTACIÓN SÓLIDA**

Debido al bajo contenido de agua, la fermentación en medio sólido estimula el crecimiento de las cepas fúngicas, evita contaminaciones microbianas (ya que su crecimiento es a partir del 40 a 70% de humedad), los requerimientos de energía son muy bajos, se producen menos desechos líquidos, permite la producción de

metabolitos en mayor concentración, hay una reducción de volumen del equipo por unidad de sustrato bioconvertido en comparación con una fermentación sumergida, la aplicación es directa en la fermentación como medio de conservación de alimentos, y que además aumenta su digestibilidad (Raghavarao & Ranganathan, 2003; Pandey, 2002; Viniegra *et al.*, 2003 ).

La selección del sustrato es una clave importante para la fermentación en medio sólido, ya que debe de proveer de nutrimentos y permitir la transferencia de oxígeno, ya que el crecimiento de los microorganismos depende de la interacción entre el O<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub>; así como la formación de las enzimas y los productos metabólicos.

La optimización de la fermentación depende de los parámetros iniciales, como son el contenido de humedad, el pH, si el sustrato requiere de pre – tratamientos, humedad relativa, temperatura de incubación, agitación o aireación, tamaño del inoculó, la adición de algunos nutrimentos como fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y algunos elementos traza. A 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).

#### **4.2.- DEFINICIÓN DE ENZIMA**

Las enzimas son catalizadores complejos, constituidas por proteínas globulares, que aceleran la velocidad de las reacciones químicas en un factor de 10<sup>12</sup> a 10<sup>20</sup> respecto a las reacciones no catalizadas enzimáticamente (Whitaker, 1994; Madigan *et al.*, 1999). En comparación, los catalizadores no enzimáticos usados en la industria son órdenes de magnitud menos eficaces, trabajando en condiciones favorables para las enzimas. La actividad molar de las enzimas es muy alta: una molécula de enzima puede transformar hasta 600,000 moléculas de sustrato por segundo (Fennema & Danson, 1993).



## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

La actividad catalítica de las enzimas depende de la integridad de su conformación proteica nativa. Si se desnaturaliza o disocia una enzima en sus subunidades, se pierde normalmente la actividad catalítica. Así la integridad de la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas enzimáticas es esencial para su actividad (Lehniger, 1991).

### **4.2.1. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS**

Muchas enzimas han sido designadas añadiendo el sufijo –asa al nombre del sustrato, es decir, de la molécula sobre la cual la enzima ejerce su acción catalítica (Tabla 3). Las enzimas se dividen en seis clases principales que son: oxidoreductasas, transferasas, hidrolizas, liasas, isomerasas y ligasas; cada una de las cuales se dividen a su vez en subclases de acuerdo con el tipo de reacción catalizada. Cada enzima es designada por un nombre recomendado, generalmente corto y apropiado para su uso habitual; por un nombre sistemático, que identifica la reacción que cataliza, y por un número de clasificación que se emplea cuando se precisa la identificación inequívoca de la enzima (Julio G. Peretó, 2007).

En este esquema, a cada enzima se le asigna una clasificación de cuatro números y un nombre con dos partes denominado por nombre sistemático. Además. La UIB sugiere para el uso diario una versión más corta del nombre sistemático denominada *nombre recomendado*. Por ejemplo, la alcohol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductasa (E.C. 1.1.1.1) se denomina habitualmente alcohol deshidrogenasa. (Las letras E.C. son una abreviatura de Enzyrna Comission, Comisión de enzimas.) Debido a que muchas enzimas se descubrieron antes de instituirse la nomenclatura sistemática, mucho de los nombres antiguos ya establecidos se han conservado.

Las seis categorías principales de enzimas son las siguientes:

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

1. **Oxidorreductasas.** Catalizan reacciones de oxidación-reducción. Entre las subclases de este grupo se encuentran deshidrogenasas, oxidasas, oxigenasas, reductasas, peroxidasas
2. **Transferasas.** Catalizan reacciones en las que hay una transferencia de grupos de molécula a otra. Entre los ejemplos de estos grupos están amino, carboxilo, carbonilo, metilo, fosforilo y acilo (RC=O). los nombres comunes triviales suelen incluir el prefijo trans. Entre los que están transcarboxilasas, tranmetilasas y transaminasas.
3. **Hidrolasas.** Catalizan reacciones en las que se produce la ruptura de enlaces por la adición de agua. Entre las hidrolasas están estererasas, fostatasas y peptidasas.
4. **Liasas.** Catalizan reacciones en las que se eliminan grupos (p. ej., H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> Y NH<sub>3</sub>) para formar un doble enlace o se añaden a un doble enlace. Los ejemplos son liasas, descarboxilasas, hidratasas, deshidratasas, desaminasas y sintasas.
5. **Isomerasas.** Se trata de un grupo heterogéneo de enzimas, las cuales catalizan varios tipos de reordenamiento intramoleculares. Las epimerasas catalizan la inversión de átomos de carbono asimétrico. Las mutasas catalizan la transferencia intramolecular de grupos funcionales.
6. **Ligasas.** Catalizan la formación de un enlace entre dos moléculas de sustrato. La energía para estas reacciones la aporta siempre la hidrólisis del ATP. Los nombres de muchas ligasas incluyen el término sintetasa. Otras ligasas se denominan carboxilasas.

## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

Tabla 2. Clasificación internacional de enzimas

No.	Clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxido reductasas	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H)
2	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua)
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por formación de grupos
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de la molécula dando formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O, C-N, mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP

Las enzimas microbianas, son las que se producen en mayor cantidad, debido a que tienen ciertas ventajas sobre las obtenidas a partir de plantas y animales. Recientemente, el interés en la producción de enzimas se ha centrado en los hongos, debido a que los procesos de producción de enzimas son más sencillos que en aquellos que en los que se utilizan bacterias. El estudio de los hongos para la producción de enzimas se basaba principalmente en los hongos mesófilos (temperatura óptima 20 a 45 °C), pero en la actualidad se ha incrementado el interés en la producción de enzimas de microorganismos termófilos (temperatura óptima de 45 a 80 °C), debido a que poseen características de gran interés industrial. Gracias a la termoestabilidad, la enzimas pueden tener una gran número de aplicaciones en la industria de los alimentos, farmacéutica, química, petrolera, papelera, peletera y de detergentes. Además, también pueden ser utilizadas en las síntesis de aminoácidos, síntesis orgánica y para estudiar

modelos de termoactividad y termoestabilidad (Johnvesly & Naik, 2001; Germano *et al.*, 2003; Haki & Rakshit, 2003; Sandhya *et al.*, 2005).

#### **4.2.2. ENZIMAS TERMOESTABLES**

El estudio de nuevos microorganismos extremófilos y sus enzimas ha tenido gran impacto en el campo de la biocatálisis, ya que están adaptados para sobrevivir en nichos ecológicos en donde prevalecen valores extremos de temperatura y pH, concentraciones salinas y presiones altas, entre otras condiciones extremas (Vieille & Zeikus 2000). Asimismo las enzimas termoestables producidas entre los 45 y 100 °C por los microorganismos termotolerantes, termófilos e hipertermófilos son generalmente resistentes a la desnaturalización química y proteolítica (Jaenicke, 1991).

La operación a altas temperaturas tiene influencia significativa en la disponibilidad de sustratos y productos, debido que incrementa su solubilidad, además la temperatura reduce la incidencia de contaminación ocasionada por el desarrollo de microorganismos mesófilos. Al mismo tiempo, las enzimas termoestables pueden realizar una amplia gama de bioconversiones, tal y como se observa en la Tabla 3. Debido a que las enzimas termoestables catalizan reacciones enzimáticas específicas, pueden ser utilizadas para realizar reacciones que no sería posible realizar por catálisis química (Becker *et al.*, 1997; Haki & Rakshit, 2003).

Una enzima ó proteína se llama termoestable, cuando tiene una larga vida media a una alta temperatura seleccionada. Una temperatura alta debe ser una que se encuentre por encima de los límites termófilos para el crecimiento [ $> 55$  °C]. La mayoría, pero no todas, de las proteínas de los termófilos son termoestables (Turner, 2007). Razones fundamentales para elegir enzimas termoestables para el bioprocesamiento, es su termoestabilidad intrínseca, lo que implica posibilidades

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

para el almacenamiento prolongado (a temperatura ambiente), una mayor tolerancia a disolventes orgánicos (Kristjansson, 1989) y mayores aplicaciones en diversos procesos.

Tabla 3. Reacciones de bioconversión y aplicaciones de enzimas termoestables (Rakshid 2003).

<b>Enzima</b>	<b>Temperatura óptima (°C)</b>	<b>Bioconversión</b>	<b>Aplicación</b>
<b>α- Amilasa</b>	50-60	Almidón → jarabe de dextrosa	Producción de maltosa
<b>Celulasa</b>	45-55, 95	Celulosa → glucosa	Hidrólisis de celulosa, degradación de polímeros en detergentes
<b>Proteasa</b>	65-85	Proteína → aminoácidos y péptidos	Homeado, detergentes, industria de la piel y fotografía
<b>Lipasa</b>	30-70	Remoción de grasa, hidrólisis, interesterificación, alcoholólisis, aminólisis	Lácteos, detergentes, farmacéutica, cosméticos, industria de la piel
<b>DNA polimerasa</b>	90-95	Amplificación de DNA	Ingeniería genética/PCR

### **4.3. CELULASAS**

#### **4.3.1. TIPOS DE CELULASAS**

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

De acuerdo al sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se dividen en tres grandes grupos.

1. **Endocelulasas** (También denominadas endoglucanasas) Estas son 1,4- $\beta$ -D-glucan glucohidrolasas (E.C. 3.2.1.4) que se agrupan en las familias 6,8,9 y 12 principalmente, de las glicosil hidrolasas (Henrissat & Bairoch, 1993; Goedegebuur *et al*, 2002; Baldrian & Valaskova, 2008).
2. **Exocelulasas** (Son también conocidas como exoglucanasas) las glucohidrolasas (1,4- $\beta$ -Dglucan glucohidrolasa, EC 3.2.1.74); o celobiosas, las celobiohidrolasas (1,4- $\beta$ -D glucan celobiohidrolasas, EC. 3.2.1.91) (Baldrian & Valaskova, 2008).
3. **B-glicosidasas**, Son enzimas  $\beta$ -D- glucósido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21), pertenece a las familias 1 y 3 de las glicosil hidrolasas (Schmid & Wandrey, 1987; Lynd *et al.*, 2002; Baldrian & Valaskova, 2008)

Las celulosas son glicosil hidrolasas y utilizan dos mecanismo de hidrólisis del enlace glucosídico que generan dos posibles configuraciones estereoquímicas finales (Fig. 3). Un tipo de enzima lleva a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición  $\beta$  (mecanismo de retención) y otro tipo en la que se pierde (mecanismo de inversión) (Whithers, 2001). Las glicosil hidrolasas se clasifican en base a su secuencia de aminoácidos. Este tipo de clasificación, por familias, permite identificar características estructurales de las enzimas, inferir su mecanismo de acción y determinar relaciones evolutivas entre ellas (Henrissat & Romeu, 1995).

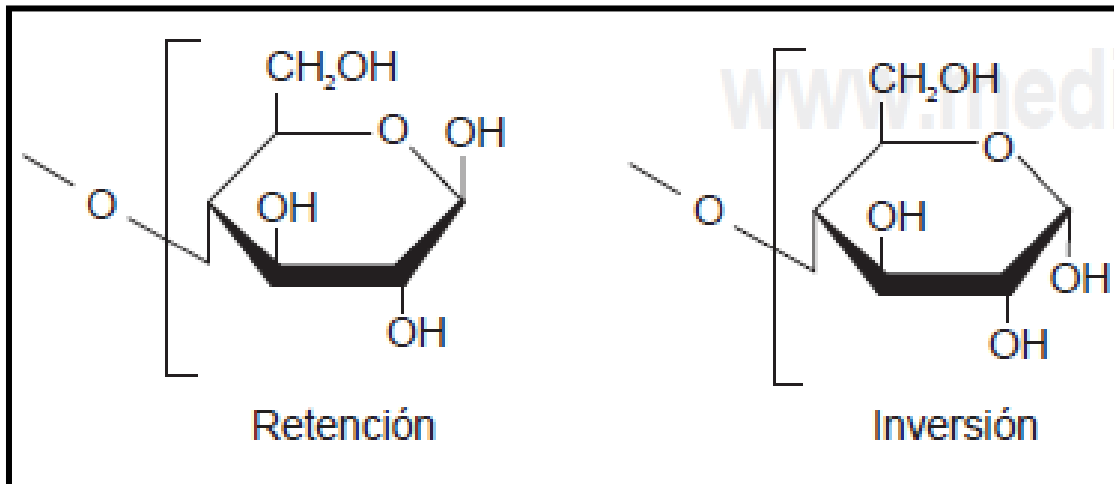


Fig. 3. Las dos posibles configuraciones de carbono anomérico de la glucosa después de la hidrólisis de celulosa:  $\beta$  (a la izquierda), lo que indica un mecanismo de retención, y  $\alpha$  (a la derecha) indica inversión.

#### 4.3.2. MECANISMO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El mecanismo ampliamente aceptado para explicar la hidrólisis enzimática de la celulosa involucra la acción enzimática de tres enzimas: la endo  $\beta$ -1,4 glucanasa ( $\beta$ -1, 4 glucano hidrolasa), la exo  $\beta$ -1, 4 celobiohidrolasas y la  $\beta$ -1, 4 glucosidasa (Lynmar *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2006).

La endo  $\beta$ - 1,4 glucanasa hidroliza aleatoriamente los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos intra-moleculares accesibles de cadenas de celulosa para producir oligosacáridos de varias longitudes (Horn SJ *et al.*, 2012)  $\beta$ -1,4 celobiohidrolasa cliva los extremos no reductores del sustrato generando unidades de celobiosa o glucosa y por último la  $\beta$ -1,4 glucosidasa, completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa o removiendo glucosa desde los extremos no reductores de pequeños celooligosacáridos. (Lynmar *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2006; Merino S *et al.*, 2007; Kostyley M *et al.*, 2012)

Para la efectiva digestión de la celulosa las enzimas fúngicas han evolucionado mecanismos sinérgicos que les permite contender con su recalcitrancia ( Henrissat

## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

*et al.*, 1985; Merino S *et al.*, 2007; Kostyley M *et al.*, 2012). Este fenómeno se refiere a la observación de que la actividad máxima de degradación de la celulosa no se da por enzimas individuales, sino por mezclas de tres o más enzimas (Nidetzky *et al.*, 1994; Carrad G *et al.*, 2000; Borastor AB *et al.*, 2004).

### **4.3.3.-CELULASAS TOTALES**

El sistema de celulasa está conformado por endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas, las cuales hidrolizan sinérgicamente la celulosa cristalina. La evaluación de la actividad de las enzimas celulolíticas es con frecuencia llevada a cabo usando sustratos insolubles los cuales incluyen papel filtro Whatman N° 1 y celulosa microcristalina. La heterogeneidad de la celulosa insoluble y la complejidad del sistema de celulasas causan problemas en la medición de 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 celulasas (Zhang *et al.*, 2006).

### **4.3.4. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASAS**

Las enzimas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo, sólo algunos de ellos producen enzimas celulasa (Ljungdahl & Eriksson 1985; Marsden & Gray 1986; Bath & Bath 1997; Dongowki *et al.*, 2002).

A partir de los hongos tales como: *Trichoderma reseei* (Reczey K. *et al.*, 1996), *Penicillium echinulatum* (Camassola M & Dillon., 2007), *Aspergillus niger* (Usama F. *et al.*, 2008), *Aspergillus niger* MS82 (Sohail M. *et al.*, 2009) *Aspergillus fumigatus* (Soni R. *et al.*, 2010), y *Trichoderma viride*, se han obtenido complejos



## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

celulolíticos utilizados en la mayoría de los estudios debido a que presentan un sistema enzimático completo de celulasas capaces de degradar parcial o totalmente la celulosa en celobiosa y glucosa (Ryu & Mandels 1980). Entre estos microorganismos, el hongo filamentoso *T. reesei*. Se caracteriza por la efectividad que tiene en la degradación de la celulosa nativa y cristalina con el complejo celulítico que produce y secreta, el cual presenta las tres actividades necesarias para la hidrólisis de la celulosa (endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, exo- $\beta$ -1,4-glucanasa y  $\beta$ -1,4- glucosidasa) (Ben-Ghendalia & Miron 1981) También, las celulasas de *T. reesei* tienen la ventaja de que estas son resistentes a inhibidores químicos y estables en reactores agitados bajo condiciones de pH 4.8 a 50 °C durante 48 h (Ryu & Mandels 1980).

### **4.4. PROTEASAS**

#### **4.4.1. TIPOS DE PROTEASAS**

Las proteasas se encuentran entre las proteínas más estudiadas, estas catalizan la escisión de enlaces peptídicos en proteínas, son la clase de enzimas que tienen aplicaciones en enormes campos tanto fisiológica y comercial. La proteasa microbiana representa uno de los tres mayores grupos de enzimas industriales con aproximadamente el 60 % de la venta total de enzimas en el mundo, situándolas como líderes en el mercado industrial de enzimas (Rai & Mukherjee, 2010).

La clasificación de estas enzimas suele ser laboriosa debido a su enorme diversidad de acción y estructura; por tanto, actualmente se clasifican con base en tres criterios generales: (i) tipo de reacción catalizada, (ii) naturaleza química del sitio catalítico, y (iii) relación evolutiva con referencia a su estructura. El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular basa la clasificación de las proteasas respecto de su sitio de acción a lo largo de la cadena polipeptídica.



#### **4.4.2. MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEASA**

El método de Kunitz (1946) el cual define la unidad de actividad enzimática como “La cantidad de enzima que produce un cambio en la absorbancia a 280 nm ó método colorimétrico en la cual se usa la precipitación de proteínas con TCA. Consiste en hidrolizar un sustrato como la caseína, luego se precipita la proteína con TCA (ácido tricloro acético) una vez precipitada y filtrada la proteína, se lleva a cabo la lectura del sobrenadante (aminoácidos).

El método de Lowry modificado por Peterson (1977) se utiliza para determinar la cantidad total de proteína presente en una solución, utiliza sero-albúmina bovina como proteína estándar en un intervalo de concentración de 0 a 200 mg/mL. Permite el análisis cuantitativo usando una medida de absorbancia de luz visible (750 nm). El mecanismo atrás de la prueba es que se forma un complejo cobre-proteína además del reactante A. Después este se reduce con la adición del reactivo B para formar un compuesto instantáneamente azul. La intensidad del color está en proporción a la cantidad de proteína presente en la muestra original.

Otro método utilizado para medir la presencia de proteasa es el de Bradford (1976), este método colorimétrico se basa en un cambio de absorbancia del colorante Azul Brillante de Comassie G-250 en el que en condiciones ácidas la forma roja del colorante se convierte en su forma más azul que se unen a la proteína que se está ensayando

#### **4.4.3. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PROTEASAS**

Entre los principales hongos productores de proteasas se encuentran tal como se muestra en la Tabla 5.

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

Tabla 5. Cepas comúnmente para la producción de proteasas.

Nombre de la cepa	Referencia
<i>Mucor pusillus</i> Lindt	Somkuti & Babel, 1967
<i>Mucor pusillus</i> , <i>Mucor miehei</i>	Osorio <i>et al.</i> , 2008
<i>Mucor circinelloides f. circinelloides</i> , <i>Mucor circinelloides f. griseocyanus</i> , <i>Mucor circinelloides f. janssenii</i> , <i>Mucor circinelloides f. lusitanicu</i> , <i>Mucor genevensis</i> , <i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i> , <i>Mucor hiemalis f. luteus</i> , <i>Mucor piriformis f. piriformis</i> , <i>Mucor piriformis f. nanus</i> , <i>Mucor racemosus f. chibinensis</i> , <i>Mucor subtilissimus</i> , <i>Mucor variosporus</i> , <i>Mucor carbonaceus</i>	Alves <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus spp.</i> y <i>Rhizopus spp.</i>	Carrillo <i>et al.</i> , 2008
<i>especies de cepas mutantes de Penicillium</i>	Chkireb <i>et al.</i> , 2009

#### 4.4.4. PROTEASAS TERMOESTABLES

La importancia que han adquirido las proteasas termoestables se debe a que pueden ser aplicadas en procesos que se llevan a cabo a temperaturas elevadas (> 50 °C) y valores extremos de pH, tales como la industria peletera, lavado de equipo (sanitización), alimentos, farmacéutica, obtención de hidrolizados de proteína, síntesis y resolución de muestras racemicas de aminoácidos, fotografía, papel, entre otros (Johnvesly *et al.*, 2002; Haki y Rakshit, 2003; Kazan *et al.*, 2005; Pena-Montes *et al.*, 2008).

Las proteasas termoestables son inusualmente estables a altas temperaturas (comparadas con sus contrapartes mesófilas), lo que les concede ventajas como modelo de estudio de los mecanismos fisicoquímicos y estructurales que confieren termoestabilidad enzimática (Zhu *et al.*, 2007).

#### **4.5. CONDICIONES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.**

Entre las condiciones que afectan la actividad enzimática de las enzimas se encuentran las siguientes:

- a) Concentración de la enzima.
- b) Concentración del sustrato.
- c) Potencial de hidrógeno (pH).
- d) Temperatura.

##### **4.5.1. CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA Y EL 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 Fig. 4 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

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

tienen efecto sobre el índice; ya que este se vuelve independiente de la concentración del sustrato, el mismo efecto ocurre con un incremento de la concentración de la enzima, como se aprecia en la Fig. 5.

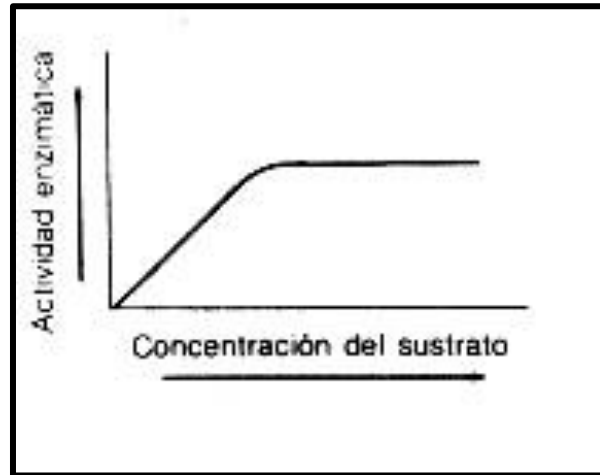


Fig. 4. Efecto de la concentración del sustrato sobre el índice de la actividad enzimática (Lehninger 1993).

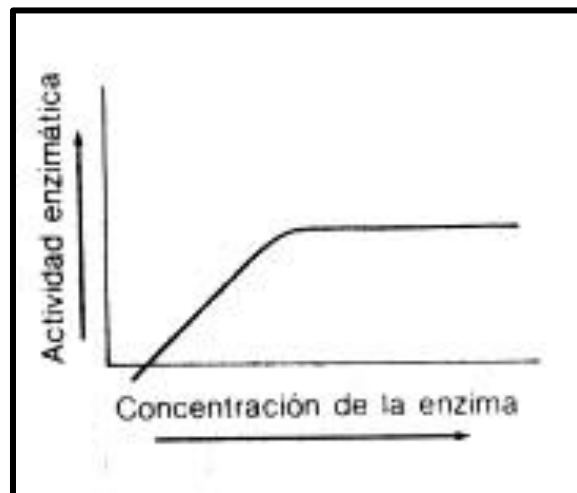


Fig. 5. Efecto de la concentración de la enzima en la actividad enzimática (Lehninger 1993).

## **4.6. TEMPERATURA**

Cada enzima tiene una temperatura óptima a la que actúa con su máxima eficacia. Debido a que las enzimas son proteínas, los valores de temperatura óptima dependen del pH y la fuerza iónica. Si la temperatura se incrementa más allá de la temperatura óptima, la actividad enzimática desciende bruscamente. La temperatura óptima de una enzima es normalmente cerca de la temperatura normal del organismo del que procede.

### **4.6.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN**

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. La velocidad de muchas reacciones enzimáticas se duplica aproximadamente, por cada 10 °C de aumento de la temperatura ( $Q_{10} - 2.0$ ). 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  $Q_{10}$ , 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. Aunque las reacciones catalizadas por las enzimas parecen con frecuencia, poseer una temperatura óptima como se muestra en la figura 6, 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.

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

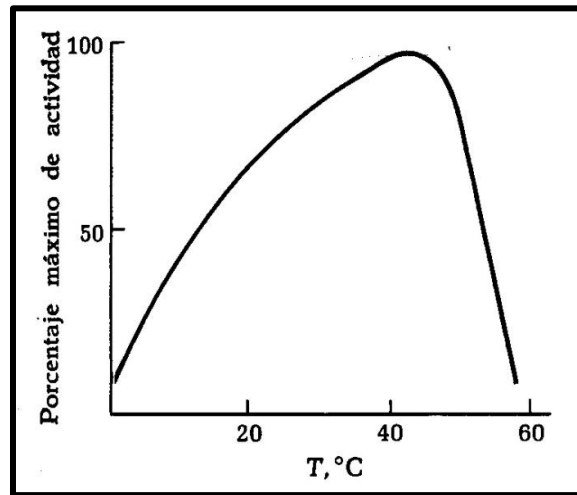


Fig. 6. Efecto de la temperatura sobre la actividad de una enzima, las enzimas varían con respecto a su estabilidad térmica. La proporción descendente de la curva se debe a la desnaturalización.

El efecto que tiene la temperatura en la actividad enzimática es la determinación de Q10, la cual está definida como el incremento en la tasa de reacción cuando se incrementan 10 °C la temperatura:

El coeficiente de temperatura (Q10) representa el factor por el cual la tasa de una reacción aumenta por cada incremento de 10 grados en la temperatura. La tasa, representa una medida del progreso de un proceso (velocidad a la cual los productos de una reacción se originan, mmol/s). En un experimento típico, el ritmo de los procesos fisiológicos en la investigación se miden a dos temperaturas diferentes T1 y T2 (donde T2 > T1), lo que se obtiene son dos tasas de reacción a dos diferentes temperaturas. La Ec. 1 se utiliza para estimar el Q10 del proceso. Los valores de Q10 son útiles ya que pueden utilizarse para inferir mecanismos del proceso fisiológico investigado. Q10 es un coeficiente adimensional, pues es el factor por el cual una tasa cambia, y es una manera útil de expresar la dependencia de la temperatura de un proceso. Si la velocidad de reacción es completamente independiente de la temperatura, el valor del coeficiente será de 1.



## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

Para los sistemas biológicos,  $Q_{10}$  el valor esta generalmente entre 1.5 y 2.5 (PhysiologyWeb, 2005).

$$Q_{10} = \frac{\text{Tasa de reacción}_{T+10^{\circ}\text{C}}}{\text{Tasa de reacción}_T} \quad [1]$$

### **4.6.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA.**

Cabe mencionar, que aún las enzimas estando en su aparente temperatura óptima suelen perder actividad enzimática dependiendo de la duración del ensayo (Patnaik, 2002).

La estabilidad térmica puede determinarse incubando la enzima en ausencia del sustrato, a diferentes temperaturas, de esta se toma una alícuota en la cual se determina su actividad enzimática a diferentes tiempos. Dando los resultados que se muestran en la Fig. 7 donde la enzima es completamente estable (ó al menos el % de pérdida es menor) en un rango de 20 a 30 °C, pero a temperaturas mayores de 40 °C las enzimas pierden un % de actividad, siendo más notorio a temperaturas como 60 y 70 °C. (Pandey *et al.*, 2003; Whitaker, 1994).

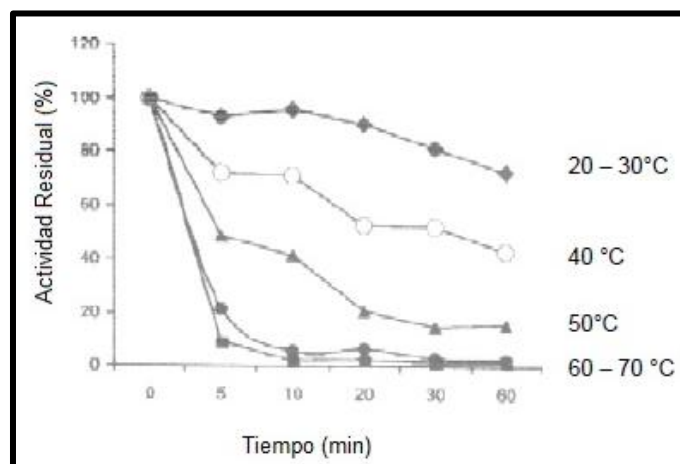


Fig. 7. Efecto de la temperatura en la estabilidad de las enzimas.

#### **4.7. POTENCIAL HIDRÓGENO**

La concentración del ión hidrógeno afecta a las enzimas en diversas formas primero, la actividad catalítica está relacionada con el estado iónico del lugar activo y si se presenta una variación en la concentración puede afectar a la ionización de los grupos del lugar activo. En segundo lugar, los cambios de los grupos ionizables pueden alterar la estructura terciaria de la enzima. Los cambios drásticos del pH frecuentemente conducen a la desnaturalización y unas pocas enzimas toleran cambios importantes del pH.

##### **4.7.1. EFECTO DEL pH**

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 de forma (Fig. 8). La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento ácido – base de la enzima y del sustrato, ya que este 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, ya que el valor de  $K_M$  de muchas enzimas varían con el pH (Whitaker, 1994). 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.

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

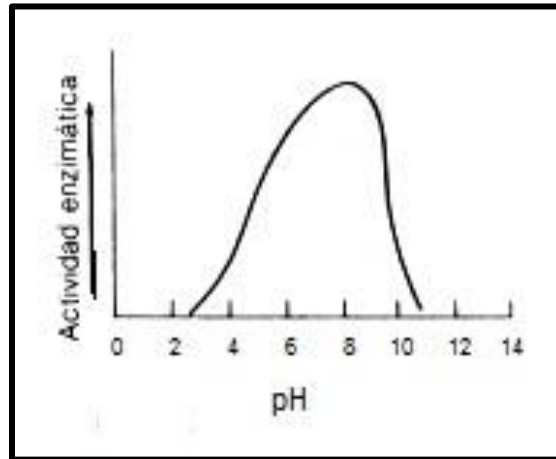


Fig. 8. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

**4.7.2. EFECTO DEL pH EN LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA.**

El pH influye directamente en la estabilidad de la enzima respecto al tiempo (Fig. 9), 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 desnaturaliza rápidamente a pH mayor a 8.0 (Whitaker, 1994).

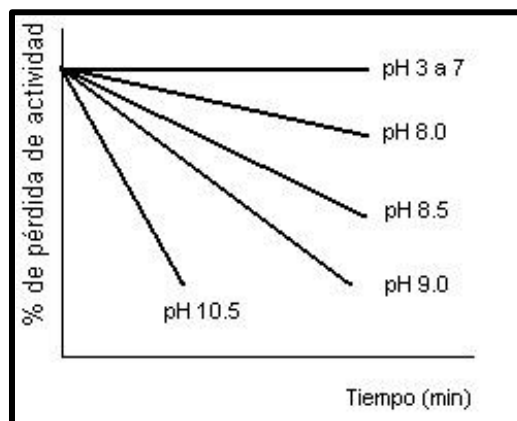


Fig. 9. Representación esquemática de la velocidad de inactivación de las enzimas a diferentes valores de pH.

#### **4.8. PHYLUM ZYGOMYCOTA**

El phylum Zygomycota está formado por organismos terrestres, algunos son pársitos de plantas, hongos y animales. Todos los zigomicetos se reproducen sexualmente mediante esporas diploides de paredes gruesas llamadas cigoesporas, que se dispersan en el aire y germinan en unas estructuras negras llamadas esporangios (Schübler *et al.*, 2001).

##### **4.8.1.-TAXONOMÍA DE LOS ZIGOMICETOS**

La clase *Zygomycetes* se divide en dos órdenes principales: Mucorales y Entomoftorales. Los hongos del orden Mucorales se distribuyen en seis familias diferentes: *Mucoraceae*, *Cunninghamellaceae*, *Mortierellaceae*, *Saksenaceae*, *Syncephalastraceae* y *Thamnidaceae*.

Los géneros y especies de la familia *Mucoraceae* los más comunes son *Rhizopus arrhizus* (*oryzae*), *Rhizopus microsporus* var. *Rhizopodiformis*, *Rhizomucor pusillus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Apophysomyces elegans* y *Saksenaea vasiformis* (Tabla 6).

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

Tabla 6. Phylum Zygomycota, clasificación taxonómica y fisiológica.

Reino	Fungi									
Phylum (división)	Ascomycota	Basidiomycota	Zygomycota	Glomerulomycota	Chytridiomycota					
Clase	Zygomycetes			Trichomycetes						
Orden	Mucorales	Entomoftorales	Dimargaritales	Endogonales	Harpellales	Kickxellales	Microsporidia			
Familia	Mucoraceae	Cunninghamiellaceae	Mortierellaceae	Syncephalastraceae	Salsenacca	Thamnidaceae				
Género	<i>Absidia</i>	<i>Cunninghamella</i>	<i>Mortierella</i>	<i>Syncephalastrum</i>	<i>Saksenaea</i>	<i>Cokeromyces</i>				
Especie	<i>A. Conymbifera</i>	<i>C. bertholletiae</i>		<i>S. racemosum</i>	<i>S. vasiformis</i>	<i>C. recurvatus</i>				
	<i>Apophysomyces</i>									
	<i>A. elegans</i>									
	<i>Actinomucor</i>									
	<i>Ambomucor</i>									
	<i>Circinella</i>									
	<i>Gongronella</i>									
	<i>Mucor</i>									
	<i>M. circillenooides</i>									
	<i>M. hiemalis</i>									
	<i>M. racemosus</i>									
	<i>M. ramosissimus</i>									
	<i>M. recurvus</i>									
	<i>Rhizomucor</i>									
	<i>R. miehei</i>									
	<i>R. pusillus</i>									
	<i>R. variabilis</i>									
	<i>Rhizopus</i>									
	<i>Zygorhynchus</i>									

#### **4.8.2.-ESTRUCTURA Y FISIOLÓGÍA DE LOS ZIGOMICETOS**

Los zigomicetos son hongos filamentosos que presentan una serie de elementos fenotípicos que apoyan en gran medida su identificación microbiológica. Crecen bien y rápidamente tanto en medios no selectivos como selectivos, formando elementos miceliares que se expanden rápidamente y cubren toda la placa en pocos días. Producen colonias algodonosas blancas, grisáceas o marrones, sin bordes definidos. La caracterización del género es microscópica y se basa en la presencia de hifas grandes y no tabicadas, anchas, similares a cintas, con un tamaño de 10 a 20 micras de diámetro y con ramificaciones que se separan de la principal en ángulos próximos a los 90°, con producción de esporangiosporas dentro de los esporangios. La variación inter-especies se da en altura, índice de crecimiento y grado de pigmentación. La diferenciación entre especies se consigue cuando se estudian elementos tales como los rizoides, los estolones y las columelas.

#### **4.8.3.- ORDEN MUCORALES**

Los representantes de este orden son a menudo llamados mohos negros, cuando a la vejez desarrollan un pigmento moreno. En muchos casos algunas de las hifas se introducen al sustrato para fijar las sustancias nutritivas (Toro et al., 1993)

Las especies de estos generos desarrollan estolones, rizoides (*Rhizopus*, *Absidia* y *Rhizomucor*) y el esporangio contiene en su extremo esporangiosporas entre 3-6 mm de diámetro cada una, que sirve como forma de diseminación.

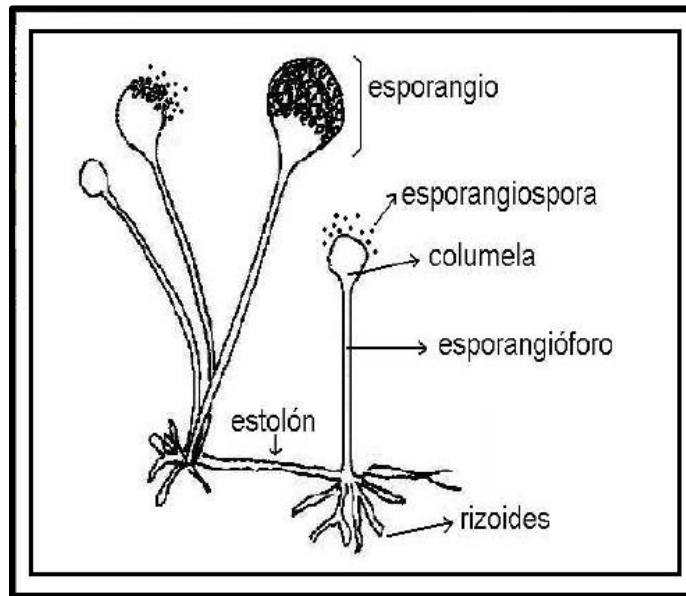


Fig. 10. Estructura morfológica del orden mucorales (Wainwright 1992).

Presenta formas irregulares, hifas características largas y con ancho de 10 a 30  $\mu$ m, no septadas, que adoptan a menudo formas curvas o cintas ramificadas en ángulo recto disposición que permite el libre flujo de núcleo y organelos citoplasmáticos ; por esta razón se desarrollan rápidamente en los medios de cultivo habituales (Patrick et al., 2006), como se muestra en la figura 10.

#### **4.8.4.-FAMILIA *Mucoraceae***

Hongos con esporangios provistos de columela, formada por la pared transversal que separa el esporangióforo del esporangio hacia el interior, a fin de constituir una estructura vesicular o con forma de cúpula, zigósporas desnudas o ligeramente cubiertas por apéndices, caracterizados por tener el talo no segmentado o ramificado.

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

Los géneros incluyen a:

- *Absidia*
- *Mortierella*
- *Rhizopus*
- *Apophysomyces*
- *Mucor*
- *Rhizomucor*

Los cuales poseen una temperatura óptima de crecimiento tal como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Rasgos para la diferenciación de los géneros de la familia *Mucoraceae* ( Weitzman *et al.*,1995).

Genero	Crecimiento óptimo	Esporangióforo	Columella	Esporangio	Rhizoid	Stylo-spore
<i>Absidia</i>	45°C	Ramificadas, hialino-	En forma de cúpula	En forma de pera	indistinto	-
<i>Apophysomyces</i>	≥42°C	Normalmente no ramificado de color marrón-grisáceo	Por lo general en forma de cúpula, rara vez alargada	En forma de pera	+	-
<i>Mortierella</i>	40°C	Ramificado, hialina	-	Esférica	+	+/-
<i>Mucor</i>	<37°C	Ramificados o no, hialina	+, En diferentes formas	Esférica	-	-
<i>Rhizomucor</i>	54°C	Ramificado, de color marrón	Formas esféricas	Esférica	+	-
<i>Rhizopus</i>	45°C	La mayoría marrón no ramificado	Formas esféricas y elongadas	Esférica	+	-



## **5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

El presente trabajo se elaboró en tres etapas: Etapa I.- Detección de forma cualitativa de producción de enzimas; II.- Determinación cuantitativa y cinéticas de fermentación; III.- Temperatura, pH óptimo y estabilidad térmica.

### **5.1. CONDICIONES INICIALES Y PROPAGACIÓN DE LA CEPA**

#### **5.1.1. MICROORGANISMO UTILIZADO**

La cepa de *Rhizomucor pusillus* SOC- 4A empleada, pertenece a la colección del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Coahuila (DIQ-UAdC)

#### **5.1.2. CRECIMIENTO A 50 °C**

En un matraz Erlenmeyer se preparó medio de PDA, se calentó hasta ebullición durante 1 minuto y se esterilizó a 121 °C (15 psi) durante 15 min, en condiciones asépticas se vació el medio de cultivo en cajas petri estériles y se almacenaron a 4 °C. La cepa de SOC- 4A se sembró en agar papa dextrosa (PDA), se incubó (Incubadora RIOSSA modelo E-71) a 50 °C durante 4 días y se analizó el crecimiento. La siembra se realizó por triplicado.

#### **5.1.3. PREPARACIÓN DEL SOPORTE**

El material fue donado por el instituto del maíz de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) de los cultivos experimentales para la evaluación de rendimiento. Se cortó en pedazos y se redujo a un tamaño de partícula de 1 mm de diámetro en un homogeneizador industrial de 5 L modelo LP12 Serie 600-182 marca JR maquinaria para mercados S.A. de C.V.

➤ **Obtención del Soporte**

Se tomaron las mazorcas enteras y se maceraron al tamaño más pequeño posible, los trozos obtenidos se fueron metiendo al molino, para recolectar el polvo a través de una malla que permitía el paso de un tamaño de partícula de 1 mm (malla #30). El polvo fue almacenado en contenedores de plástico con tapa de 3.6 L de capacidad. El rendimiento fue del 62.5 % (de 4 Kg de olote se obtuvieron 2.5 Kg de polvo fino para fermentar).

**5.1.4. TRATAMIENTO DE RESIDUOS AGRO-INDUSTRIALES PARA USO COMO SOPORTE INERTE**

Se colocaron 200 g de materia prima a usar como soporte en una olla de 5 L, se le adicionó agua mezclando los componentes, y posteriormente se puso a ebullición agitando esporádicamente durante 10 minutos. Al transcurrir este tiempo se filtró la mezcla con un colador de acero, colocando la mezcla en otra olla. Después se lavó la muestra en tres ocasiones con 1 L de agua destilada cada una, homogenizando a temperatura ambiente durante 1-2 minutos hasta que el filtrado se obtuvo lo más claro posible. Por último se extendió el material en charolas de aluminio y se secaron a 50-60 °C por 48 horas hasta peso constante.

**5.1.5. PRESERVACIÓN DEL MICROORGANISMO EN GLICEROL-LECHE DESCREMADA**

Se preparó una solución con glicerol (10 %) y leche descremada (Svelty 5%), y se homogenizó en 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada, se esterilizó a 121 °C (15 psi) durante 15 min. Se dejó enfriar y se tomó 20 mL de la mezcla preparada la cual se agregó al medio que contenía la cepa, se distribuyó con ayuda de un asa aséptica. Se

## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

tomaron 500  $\mu$ L de la solución de esporas; se colocó en tubos eppendorf estériles con capacidad de 1.5 mL y se almacenaron a -20 °C.

### **5.2. DETECCIÓN DE FORMA CUALITATIVA DE PRODUCCIÓN DE LAS ENZIMAS EXTRACELULARMENTE: ETAPA 1**

#### **5.2.1. ACTIVIDAD CELULOLITICA**

Para medir la actividad celulolítica se utilizó un medio a base de: carboximetil-celulosa (0.5 %), Agar Papa Dextrosa (2 %), extracto de levadura (0.1 %), Rojo congo (0.5 %) y Agar bacteriológico (1.5 %), (Fig. 11), y para proteasa se sustituyó la celulosa por suero de leche (0.5%) (Fig. 12). Se homogenizo y se esterilizó cada uno de los medios a 120 °C (15 psi) durante 15 minutos, se enfriaron y se vaciaron en cajas petri estériles (Fig. 13).

En condiciones asépticas, se inoculó la cepa SOC-4A en el centro del agar rojo-congo evitando la propagación de las esporas de forma irregular (Fig. 14); Posteriormente se incubó a 50°C durante 4 días (Fig. 15).



Fig. 11. Agar rojo- congo y carboximetil celulosa 0. 5%.

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---



Fig. 12 Agar rojo-congo con suero de leche 0.5%.

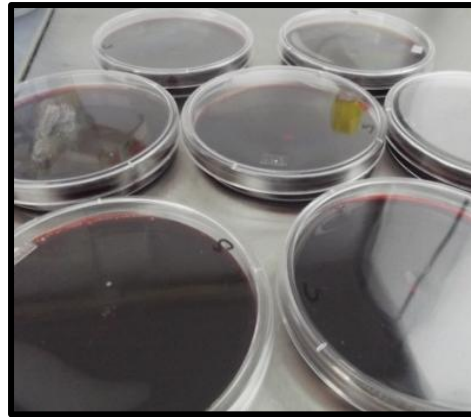


Fig. 13 Solidificación del agar rojo – congo.

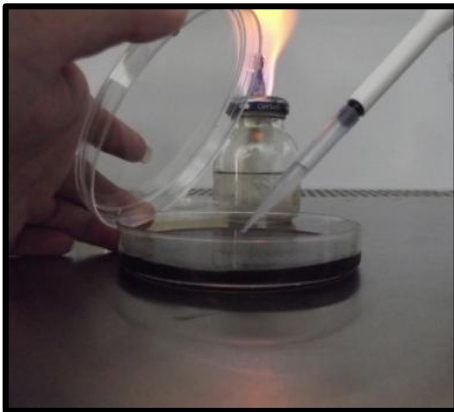


Fig. 14 Inoculación de la cepa.



Fig. 15 Incubación a 50 °C.

### **5.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA Y CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN: ETAPA 2.**

#### **5.3.1. FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO**

Se realizó la fermentación en medio sólido en cajas petri, la cepa SOC-4A se inoculó he incubó como a continuación se describe:

#### **5.3.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

La cepa SOC-4A se sembró en cajas petri en agar papa dextrosa (PDA), se incubó a 50 °C durante 4 días y las esporas producidas se cosecharon con 10 mL de solución de Tween 80 al 0.1 % previamente esterilizado a 120 °C (15 psi) durante 15 minutos. Una vez cosechadas y recolectadas, se tomaron 100 µL de la suspensión de esporas y se diluyó en 20 mL de H<sub>2</sub>O destilada, se utilizaron 20 µL de la dilución, se colocó en la cámara de Neubauer y se cubrió con un portaobjetos (Fig. 16); se observó en un microscopio con el objetivo 40X. Las esporas presentes se contaron en los cuadros elegidos (formando una “Z”). Se contaron un total de 13 cuadros, cinco en cada línea (cinco arriba y cinco abajo) y tres de la diagonal que cruza el centro uniendo las líneas. Se determinó el número de esporas por mL utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Esporas/mL} = \text{promedio} \times 250,000 \times \text{factor de dilución}$$

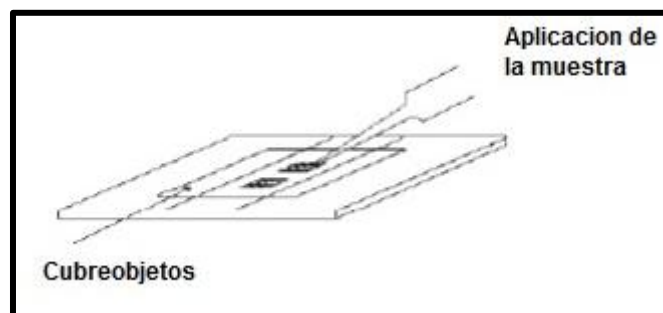


Fig. 16.- Camara de Neubauer.

### **5.3.3. CONDICIONES INICIALES DE LA FERMENTACIÓN**

Para la realización de la fermentación en medio sólido se utilizó las cantidades de soporte-sustrato y de esporas como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8

<b>COMPONENTES DE MEDIO DE FERMENTACIÓN.</b>	
<b>Czapek-Dox</b>	10 ml
<b>Olote</b>	3 g
<b>Esporas</b>	$1 \times 10^7$ esporas/gss

La concentración de esporas utilizadas fueron  $1 \times 10^7$  esporas/gss y se inocularon en condiciones asépticas en 3 g de olote y 10 mL de Czapek-Dox, estos dos últimos esterilizados previamente a 120 °C (15 psi) durante 15 min, se homogenizó con un asa aséptica y se incubó a 50° C.

Se cuantifico la actividad enzimática respecto al tiempo, la fermentación se realizó por triplicado y la obtención del extracto enzimático se realizó a diferentes tiempos **(0, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 hrs)**.

### **5.3.4. EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE FERMENTACIÓN EN SÓLIDO**

El medio sólido se disolvió en un vaso de precipitados con 40 mL de solución de Tween 80 (1 %) y NaCl (9 %) (Fig. 17). Para la obtención del extracto enzimático se utilizó una bomba de vacío (Millipore, modelo N° 115V); se extrajo la solución con filtro Whatman n° 1 (Maciel *et al.*, 2009) (Fig. 18); las muestras se almacenaron en recipientes de plástico de 60 mL a 4 °C por triplicado.

## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---



Fig. 17 Fermentación en extracto sólido



Fig. 18 Extracción enzimática

### **5.3.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Para la actividad enzimática de los extractos, se emplearon dos métodos como a continuación se describe:

### **5.3.6. DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES (MÉTODO DE MILLER 1989)**

En un tubo de ensaye se colocó 70  $\mu\text{L}$  de carboximetil-celulosa al 0.1 % en buffer acetato sódico 50 mM pH 6.0 como sustrato y 30  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, incubando a 50°C durante 5 min; se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de buffer acetato sódico 50 mM pH 6.0 y 600  $\mu\text{L}$  de DNS, se sometió a ebullición durante 5 minutos para detener la reacción en la muestra. Para el testigo se omitió la adición de extracto enzimático al inicio del procedimiento, se dejó enfriar y se agregó hasta el final. Para el blanco se sustituyó el extracto enzimático por buffer acetato sódico 50 mM pH 6.0.

El experimento se realizó por triplicado se leyó a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV), y se comparó con una curva patrón de glucosa a 0.1 % (Anexo). 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)

### **5.3.7. DETERMINACIÓN DE L-TIROSINA (METODO DE KUNITZ 1946)**

En un tubo de ensaye se adicionó 5 mL de caseína al 1% en buffer fosfato 50 mM pH 7.0 y 1 mL de extracto enzimático. Se incubó a 45°C durante 10 min, la reacción se detuvo con 5 mL de TCA al 10 % para la muestra. En el Testigo el extracto enzimático se adicionó hasta el final del procedimiento y en el blanco se sustituyo con buffer fosfato 50 mM pH 7.0.

Detenida la reacción se centrifugó a 1744 rpm durante 15 minutos, se tomó solo el sobrenadante, se incubo a 30°C durante 30 minutos, y se leyó a 275 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV). La evaluación se realizó por triplicado y se realizó una curva patrón con L-Tirosina en buffer fosfato 50 mM pH 7.0 al 0.1% (Anexo). La determinación de L- Tirosina producidos por la hidrólisis enzimática se utilizó para determinar la presencia de la enzima proteasa.

### **5.3.8. CUANTIFICACIÓN DE U/ mL**

Las unidades de enzimas presentes en los extractos enzimáticos fueron calculadas de la siguiente forma:

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

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

$\mu$  mol de glucosa:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{mg } c}{\text{mL Rxn}} = \frac{1 \text{ mol}}{180,000 \text{ mg } c} \left| \frac{1'000,000 \mu \text{ mol } c}{1 \text{ mol}} \right| \left| \frac{1 \text{ mL Rxn}}{0.030 \text{ mL EE}} \right| \left| \frac{1}{5 \text{ min}} \right| = 37 \frac{U}{\text{mL}} \text{ de celulasa}$$

$\mu$  mol de L- Tirosina:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{mg } T}{\text{mL Rxn}} = \frac{1 \text{ mol}}{181,000 \text{ mg } T} \left| \frac{1'000,000 \mu \text{ mol } T}{1 \text{ mol}} \right| \left| \frac{11 \text{ mL Rxn}}{1 \text{ mL EE}} \right| \left| \frac{1}{10 \text{ min}} \right| = 6 \frac{U}{\text{mL}} \text{ de proteasa}$$



### **5.3.9. EVALUACIÓN DE AZUCARES TOTALES Y AZUCARES REDUCTORES PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE SUSTRATO**

Los azúcares totales y reductores se evaluaron por el método de Dubois *et al* (1956) con fenol-sulfúrico y por el método de Miller *et al.*, (1989) con DNS respectivamente del extracto enzimático filtrado en papel Whatman No. 1. La cantidad de azúcares se determinó en diferentes tiempos (**0, 12, 24, 48, 72 y 96**) por triplicado; las muestras tratadas se leyeron a 480 nm para azúcares totales y 540 para azúcares reductores (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV) y fueron determinados para la cuantificación del consumo de sustrato.

Se preparó una curva patrón de azúcares totales y una curva patrón de azúcares reductores (Anexo), donde se emplearon las ecuaciones de la linearización de las curvas para la cuantificación del contenido de azúcares.

### **5.3.10.-DETERMINACIÓN DE BIOMASA**

Para la determinación de biomasa se colocó 100 µL de extracto enzimático y se le adicionó 1 mL de solución de Bradford (1976) en un tubo de ensaye, se realizó una curva patrón de albumina sérica bovina (BSA) en una solución al 0.1% en buffer fosfato 50 mM pH 7.0 y se comparo con la cantidad de biomasa obtenida. El ensayo se realizó por triplicado.

La producción de biomasa, fue evaluada mediante la ecuación logística de Velhurst- Pearl (EC. (Gatto *et al.*, 1988; Viniegra *et al.*, 2003).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_M \left[ 1 - \frac{X}{X_{max}} \right] X$$

Donde:  $X$  es la biomasa (g por L, por  $\text{cm}^2$  ó por Kg),  $\mu_M$  es la velocidad máxima de crecimiento específico ( $\text{h}^{-1}$ ) y  $X_{MAX}$  es el valor de equilibrio para  $X$  donde  $dX/dt = 0$ , para  $X > 0$ . La solución de la ecuación anterior es la siguiente:

$$X(t) = X_0 * e^{\mu_{max} * t} / \left( 1 - \frac{X_0 * (e^{\mu_{max} * t})}{X_{max}} \right) \quad [12]$$

Donde:  $X_0$  es la condición inicial para  $X$ , la ecuación 12 sirve para ajustar los datos experimentales de la ecuación 11, minimizando la suma de errores al cuadrado como función de los parámetros cinéticos  $X_0, X_{max}$  y  $\mu_M$ .

### **5.3.11. PARÁMETROS CINÉTICOS INVOLUCRADOS CON EL SUSTRATO**

Se calculó el rendimiento de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) que es la cantidad de biomasa producida por gramo de sustrato utilizado. El cálculo se terminó con la siguiente fórmula.

$$Y_{X/S} = \frac{X_2 - X_1}{S_1 - S_2}$$

Donde  $X_1$  = concentración inicial de biomasa,  $X_2$  = concentración de biomasa en el valor máximo de producto,  $S_1$  = concentración inicial de sustrato,  $S_2$  = concentración de sustrato en el valor máximo de producto.

$$q_s = \mu/Y_{X/S}$$

Con estos parámetros, se calculó la tasa específica de absorción de sustrato ( $q_s$ ), siendo estos calculados de la siguiente forma (Ludeking y Pirte, 1959):

$$S_Z(t) = S_{Z,0} + \left( \frac{1}{Y_{X/S}} \right) * \left( X(t) - X_0 - m * \frac{X_{max}}{\mu_{max}} * \ln \left( 1 - \frac{X_0 * (1 - e^{\mu_{max} * t})}{X_{max}} \right) \right)$$

### **5.3.12. CINÉTICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO**

La cinética de formación de producto fue modelada empleando la ecuación de Luedeking y Piret (1959) (Viniegra *et al.*, 2003).

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/x} \frac{dX}{dt} + kX$$

### **5.3.13. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE CELULASA Y PROTEASA**

$$Y_{PS} = \frac{P_2 - P_1}{S_1 - S_2} \quad q_P = \mu \frac{Y_E}{S} \quad Y_{PX} = \frac{P_2 - P_1}{X_1 - X_2} \quad P_R = \mu Y \frac{E}{x X_{max}}$$

$$P_Z(t) = P_{Z,0} + Y_{Z/x} * \left( X(t) - X_0 + k_Z * \frac{X_{max}}{\mu_{max}} * \ln \left( \frac{X_0 * (1 - e^{\mu_{max} * t})}{X_{max}} \right) \right)$$

Donde:  $P$ , es la concentración de producto;  $Z$ , es la enzima de interés (celulasa y proteasa);  $Y_{P/X}$ , es el rendimiento de producto en términos de biomasa (unidades de producto por unidades de biomasa) y  $k$ , es el coeficiente secundario de formación o destrucción de producto.

## **5.4. TEMPERATURA Y pH ÓPTIMO, ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS: ETAPA 3.**

### **5.4.1. POTENCIAL DE HIDRÓGENO (pH) ÓPTIMO DE CELULASA**

Se utilizaron soluciones buffer de acetatos 0.5 M, para los pH 4,5 y 6; buffer Tris-HCL 0.5 M, para los pH 7, 8 y 9; y buffer de glicina- NaOH 0.05 M para el pH 10, cada una de estas soluciones fueron preparadas con carboximetil- celulosa al 0.1% como sustrato. La lectura se realizó a 540 nm en el espectro (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV), el ensayo se realizó por triplicado. La actividad enzimática a diferentes pH fue evaluada indirectamente mediante la cuantificación de azúcares reductores por el método de Miller *et al.*, (1989) con DNS. El valor óptimo se calculó dividiendo el valor de cada pH, sobre el valor máximo obtenido.

#### **5.4.2. pH ÓPTIMO DE PROTEASA**

Se utilizaron soluciones buffer de acetatos 0.5 M, para los pH 4,5 y 6; buffer Tris-HCL 0.5 M, para los pH 7, 8 y 9; soluciones buffer de glicina- NaOH 0.05 M para el pH 10, cada una de estas soluciones fueron preparadas con caseína al 0.1% como sustrato con ebullición durante 10 minutos, se almacenaron a 4 °C. En este estudio se utilizaron estos diferentes pH, se centrifugó a 1744 rpm durante 15 minutos, se enfriaron las muestras y se tomo solo el sobrenadante, se incubo a 30°C durante 30 minutos y se leyó a 275 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV). El valor óptimo se calculo dividiendo el valor de cada pH, sobre el valor máximo obtenido. La determinación se llevó a cabo por triplicado mediante el método de Kunitz.

### **5.5. TEMPERATURA ÓPTIMA DE LAS ENZIMAS**

#### **5.5.1. TEMPERATURA ÓPTIMA DE CELULSAS**

Las temperaturas a las que se llevó a cabo las evaluaciones fueron en un rango de 50 °C a 85 °C, posteriormente se incubó a la temperatura correspondiente para cada evaluación durante 5 min. La actividad enzimática a diferentes temperaturas fue evaluada indirectamente mediante la cuantificación de azúcares reductores por el método de Miller (1989) con DNS. El valor óptimo se calculo dividiendo el valor de cada temperatura, sobre el valor máximo obtenido. El experimento se realizo por triplicado.

#### **5.5.2. TEMPERATURA ÓPTIMA DE PROTEASA**

Las temperaturas utilizadas en la evaluación fueron de 50 °C a 85 °C, posteriormente se incubó a la temperatura correspondiente durante 10 min, se

## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

centrifugo a 1744 rpm durante 15 min, finalmente se tomó el sobrenadante y se incubó a 30°C durante 30 min, se leyó la absorbancia a 275 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV). El valor óptimo se calculó dividiendo el valor de cada temperatura, sobre el valor máximo obtenido. El método empleado para la evaluación de la temperatura óptima fue el de Kunitz.

### **5.6. ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS ENZIMAS**

#### **5.6.1. ESTABILIDAD TÉRMICA DE CELULASA**

Las temperaturas utilizadas fueron 55, 65 y 75 °C. En las muestras se colocó 70 µL de sustrato de celulosa en buffer acetato sódico pH 6.0 y 30 µL de extracto enzimático en un tubo de ensaye, posteriormente se pre-incubó a 45 °C durante 5 min para después incubar a la temperatura correspondiente para cada evaluación, tomando una muestra cada 5 min durante 1 hora; se le adicionaron 300 µL de buffer acetato sódico 50 mM pH 6.0 y 600 µL de DNS, finalmente se sometió a ebullición durante 5 minutos para detener la reacción. Para el blanco se sustituyó el extracto enzimático por buffer de acetato pH 6.0. Se leyó a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV). La estabilidad térmica se evaluó midiendo la actividad enzimática residual, mediante la liberación de azúcares reductores y su cuantificación por el método de Miller (1989). El experimento se realizó por triplicado. La actividad residual se calculó con la siguiente fórmula:

$$AR = \frac{A}{A_0}$$

Donde: A es la actividad celulolítica residual y A<sub>0</sub> es la actividad celulolítica inicial.

### **5.6.2. ESTABILIDAD TÉRMICA DE PROTEASA**

Las temperaturas utilizadas para la evaluación de estabilidad térmica fueron 65, 75 y 85 °C. Para las muestras se colocó en un tubo de ensaye 500 µL de caseína en buffer fosfato 50 mM pH 7.0 y se le adicionó 100 µL de extracto enzimático, posteriormente se pre-incubo a 45 °C y después se incubó a la temperatura correspondiente tomando una muestra cada 5 min durante 1 hora, la reacción se detuvo con 500 µL de TCA al 10 %. Finalmente se centrifugó a 1744 rpm, se incubo a 30 °C, el sobrenadante se leyó a 275 nm (UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV). En el blanco se sustituyo el extracto enzimático por buffer fosfato. La estabilidad térmica se evaluó midiendo la actividad enzimática residual, mediante el método de Kunitz (1946). La actividad residual se calculó con la siguiente fórmula:

$$AR = \frac{A}{A_0}$$

Donde:  $A$  es la actividad proteolítica residual,  $A_0$ : es la actividad proteolítica inicial

### **5.6.3. PARÁMETROS CINÉTICOS RELACIONADOS CON LA ESTABILIDAD TÉRMICA**

Para la estabilidad térmica se utilizo un modelo bifásico, que describe la cinética de inactivación de primer orden:

$$A = A_L \exp(-k_L \cdot t) + A_S \exp(-k_S \cdot t)$$

Donde:  $A$  es la variable dependiente, expresada como actividad enzimática (U/gss),  $k_L$  y  $k_S$  es la constante de velocidad de inactivación de la fracción lábil y estable respectivamente ( $\text{min}^{-1}$ ),  $A_L$  y  $A_S$  son la actividad enzimática de la fracción lábil y estable,  $t$  es la variable independiente, expresada como el tiempo de

***“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por Rhizomucor pusillus SOC-4A”***

---

tratamiento (min). Los parámetros ( $A_L$ ,  $A_S$ ,  $k_L$  y  $k_S$ ) fueron estimados mediante regresión no lineal con el software polymath 6.0.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. CONDICIONES INICIALES Y PROPAGACIÓN DE LA CEPA**

Para la presente investigación se propago la cepa *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A) en PDA, se conservó a  $-20\text{ C}^\circ$  con leche descremada y glicerol, para las cinéticas de fermentación se utilizo olote de maíz, pre-tratado solamente para eliminar los azucares presentes en este residuo, y se determinó la producción de celulasas y proteasas termoestables.

### **6.2. DETECCIÓN DE FORMA CUALITATIVA DE PRODUCCIÓN DE LAS ENZIMAS EXTRACELULARMENTE: ETAPA 1.**

#### **6.2.1. ACTIVIDAD CELULOLÍTICA**

La detección cualitativa de la actividad enzimática de *Rhizomucor pusillus* (SOC - 4A), fue caracterizado con agar rojo- congo después de una incubación de 4 días a  $50\text{ }^\circ\text{C}$ . El principal interés de este trabajo de investigación fue la producción enzimática extracelular de esta cepa. Los resultados obtenidos se presentaron visibles por los halos de hidrólisis como se muestran en la figura 20 y figura 21; encontrándose que en la figura 19 no presenta ninguna zona clara ya que se utilizo como testigo para esta prueba. En el Agar rojo- congo (Fig. 20) se muestra el halo de hidrólisis por la presencia de proteasas segregadas por la cepa SOC-4A de manera extracelular al igual que para celulasa (Fig. 21). De esta manera se puede expresar que la prueba dio positivo para proteasas y celulasas como se muestra en el cuadro 1.

<b>Filum</b>	<b>Especie</b>	<b>Rojo congo</b>	
		<b>CMC</b>	<b>SL</b>
<b>Zygomycota</b>	<i>Rhizomucor pusillus</i> (SOC-4A)	<b>+</b>	<b>+</b>

**Cuadro 1.** Carboximetil- celulosa (CMC); Suero de leche (SL); +, zona clara; -, zona no clara.



**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---



Fig. 19. Agar rojo- congo (Testigo).

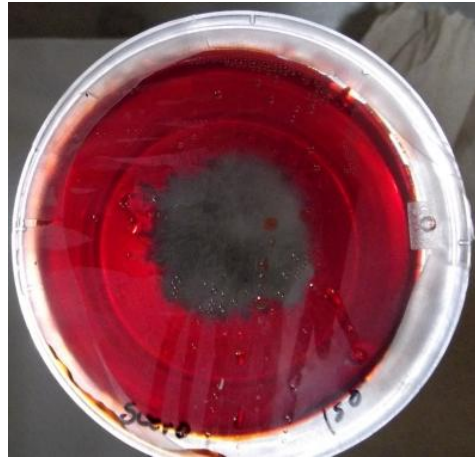


Fig. 20. Agar rojo – congo y suero de leche (0.5%).

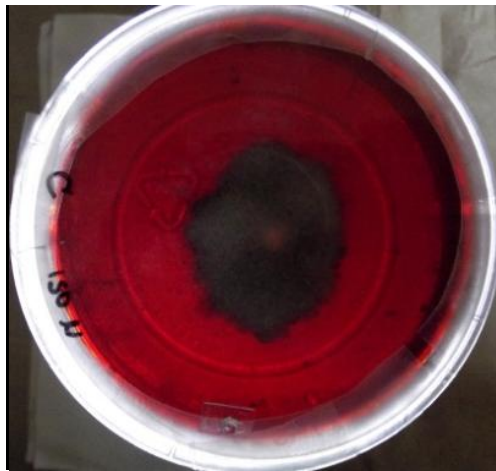


Fig. 21. Agar rojo – congo y carboximetil-celulosa (0.5%).

## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

Yoon *et al.*, (2007) realizaron un estudio comparando cuatro colorantes de los más comunes para determinar cuál de ellos es favorable para la detección de la actividad extracelular con diferentes especies de hongos. Reportan de acuerdo a los datos obtenidos que el rojo –congo es el colorante más recomendado para la realización de ensayos en placa para la selección de la degradación de celulosa llevada a cabo por hongos.

En un estudio realizado por Pérez *et al.*, (2007) la actividad celulítica se evidenció mediante evaluación cualitativa con el revelado de zonas de aclaramiento utilizando rojo-congo al 1% (p/V) como también ha sido reportado por diferentes autores (Hendricks *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Entre las especies utilizadas para esta investigación, utilizaron el hongo *Trichoderma ressei* y *Mucor mucedo* en placa de agar rojo-congo y CMC (0.5%), en el cuadro 2, muestra que la primera cepa si tiene reacción enzimática extracelular de celulasas mientras que la segunda cepa no la tiene basándose en la formación de zonas claras alrededor de las cepas, entre los cuatro colorantes utilizados, la formación de zonas claras fue más visible en las placas que contenían rojo-congo, detectándose una reacción positiva solo para alguna de estas cepas.

Cuadro 2. Reacción cromogenica de celulasas extracelulares por diferente hongos; + zoma clara; -, zona no clara.

<b>Filum</b>	<b>Especies</b>	<b>Rojo congo CMC</b>
<b>Ascomycota</b>	<i>Trichoderma ressei</i>	<b>+</b>
<b>Zygomycota</b>	<i>Mucor mucedo</i>	<b>-</b>

El uso de medios cromogénicos utilizando diferentes sustratos, en especial celulosa, resulta de fácil utilización para medir la actividad enzimática debido a la reacción cromogénica por la actividad extracelular de las enzimas de los hongos,

## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

estas reacciones se pueden detectar por las zonas claras que aparecen alrededor de las cepas por la degradación del sustrato tal como sucede con la celulosa, estos cambios de coloración pueden variar dependiendo del pH de los hogos.

Los hongos con la capacidad de producir celulasas extracelulares como se muestra con *Trichoderma reesei* (cuadro 2), el cual también ha sido reportado por diferentes autores es uno de los más comúnmente utilizados para la producción de estas enzimas.

### **6.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA Y CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN: ETAPA 2.**

Los valores obtenidos de biomasa, sustrato y producto fueron obtenidos en cada experimento. Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación logística, para obtener los parámetros cinéticos de  $X_0$ ,  $X_{max}$ ,  $\mu_M$ . Estos resultados fueron expresados en miligramos (mg) por gramos de extracto seco (gds), por tiempo en horas.

#### **6.3.1. BIOMASA**

La producción de biomasa en base a los resultados obtenidos se comporta de manera exponencial (figura 22) de 0 a 72 h, lo que indica una fuente de carbono de fácil asimilación que favorece el crecimiento microbiano. A partir de las 72 horas (punto máximo de 28.0 mg/gds), ocurre un decremento en la cantidad de la biomasa, posiblemente por efecto de las proteasas presentes en el medio, ya que como se mostró en la etapa de actividad en placa, el microorganismo es capaz de sintetizar la enzima inducida por la presencia de proteínas. Las tres repeticiones

## “Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”

no muestran una amplia desviación estándar, excepto al tiempo de 120 h, variación que pudo ser generada por la actividad enzimática de proteasa.

El modelo de la ecuación logística, representa perfectamente el comportamiento de crecimiento para las primeras 48 horas (—), con un  $X_{MAX}$  de 19.0 mg/gds, permaneciendo el comportamiento a partir de este punto de manera constante.

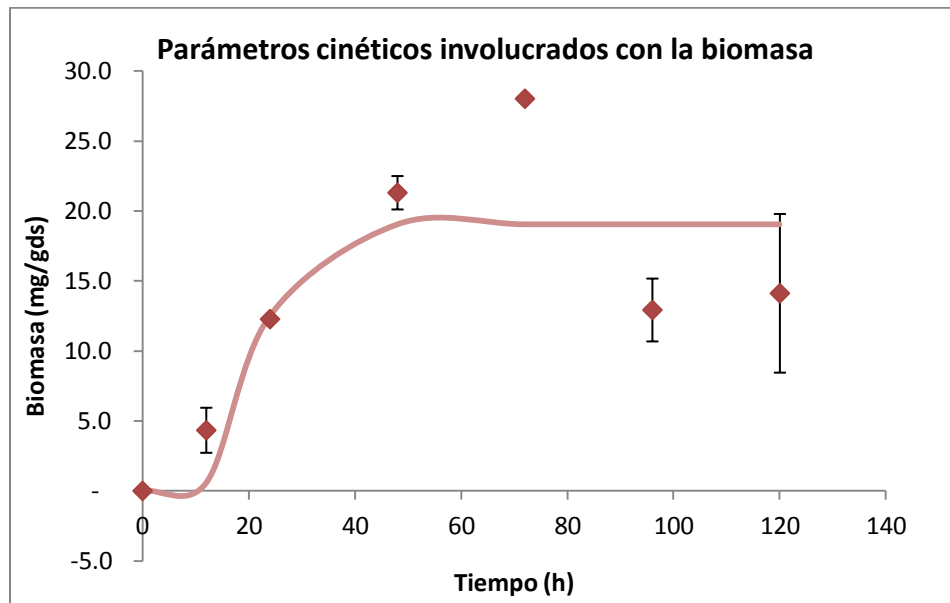


Fig. 22. Producción de biomasa por *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A); (♦) teórico; (-) experimental.

La falta de ajuste del modelo experimental con el comportamiento real de la producción de biomasa a partir de las 48 h, se puede deber a la complejidad del sustrato y los materiales que se van transformando conforme transcurre el tiempo. Como lo han mencionado Shi *et al.*, (2012) quienes estudiaron las interacciones entre el crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* y el comportamiento de la biomasa en tallos de algodón como sustrato, utilizando el método TKN (Total Kjeldahl Nitrogen) que fueron calculados para evaluar sus correlaciones lineales, observaron que los parámetros evaluados no pueden ser indicadores más precisos para la biomasa fúngica derivada del método TKN. Lo que sugiere que puede existir una relación no lineal entre sus resultados y los obtenidos con el

## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

método TKN. Shi *et al.*, (2012) menciona que las correlaciones lineales entre los métodos indirectos de estimación de biomasa y TKN, podían ser debido a la variación en el metabolismo micótico causada por la naturaleza heterogénea del sustrato.

Los modelos empleados se desarrollaron a partir de fermentaciones sobre material inerte, por lo que se requiere del desarrollo de modelos que se ajusten al comportamiento del hongo con este tipo de sustratos complejos.

### **6.3.2. SUSTRATO**

El sustrato utilizado comenzó a tener una disminución acelerada desde las 0 a las 24 horas y posteriormente seguir reduciéndose lentamente hasta casi permanecer constante hasta las 120 horas como se muestra en la figura 14. A medida que se presentó este comportamiento, la producción de biomasa aumentó (Fig. 23). El modelo experimental de la ecuación logística se ajustó al comportamiento del experimento realizado para esta investigación. Ardón C. (2007) afirma que un sustrato no funciona como tal cuando no posee las fuentes nutricionales que requieren las cepas de hongos y/o no son capaces de utilizarlos en forma natural sin que hayan sido sujetos a algún proceso de bioquímica o microbiológica. El olote de maíz, resulta favorable como sustrato para la actividad enzimática extracelular de *Rhizomucor pusillus*, permitiendo ser utilizado por el hongo y le permita crecer.

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

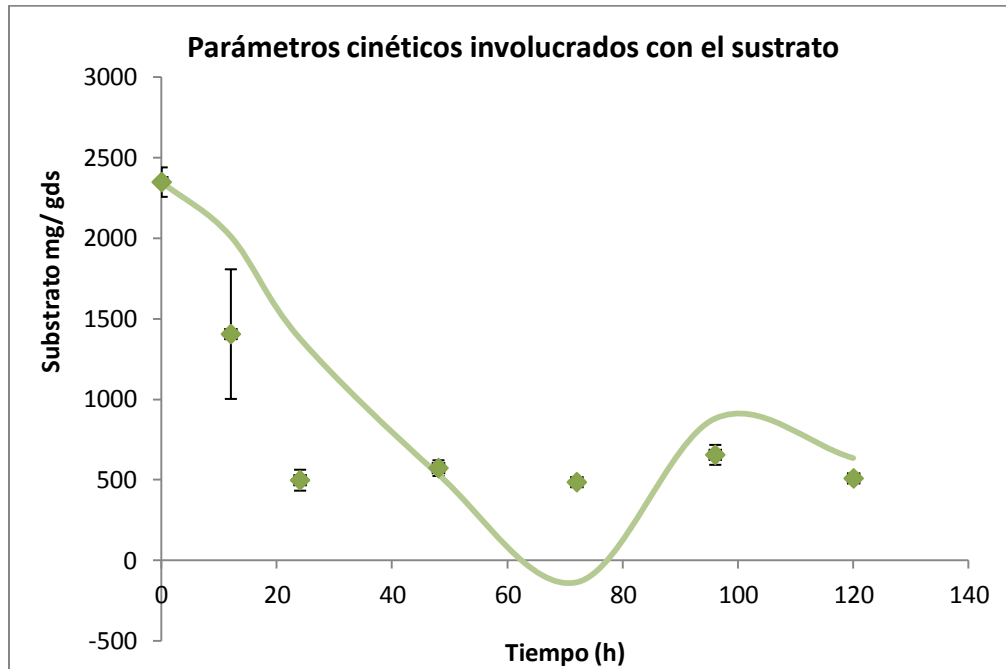


Fig. 23. Azúcares Totales; (◇) teórico; (–) modelo experimental.

El material celulósico tiene diferentes características físico-químicas como son: el tamaño y la superficie de las fibrillas, el espacio entre las microfibrillas y las moléculas de celulosa en las regiones amorfas, el grado de cristalinidad de la celulosa, la conformación estereoscópica y la rigidez de las unidades de la celulosa, la naturaleza, concentración y distribución de grupos sustituyentes (Malherbe y Cloete, 2002; Zhang *et al.*, 2006). Dichos parámetros explican que el comportamiento metabólico sea específico, ya que condiciona la habilidad de los microorganismos celulolíticos para degradar este sustrato y por ende, la acumulación del producto de hidrólisis difiera de una ensayo a otro.

### **6.3.3. PRODUCTO**

La actividad enzimática para la producción de celulasa fue calculada en unidades por gramo de soporte seco (U/gds). En base a los resultados obtenidos utilizando la prueba de DNS, la máxima actividad enzimática de celulasa se presentó a las 48 horas con 897 U/gds (299 U/mL) (Fig. 24). Para la actividad enzimática de proteasas (Fig. 25) también se presentó a las 48 horas con 17.06 U/gds (5.02 U/mL). El microorganismo puede comenzar su crecimiento en las primeras 12 h, debido a los azúcares monoméricos presentes en el material vegetal, los cuales no fueron removidos en su totalidad al efectuar los lavados de homogenización. De manera simultánea, el hongo sintetiza enzimas capaces de degradar el sustrato presente, el cual en su mayoría es celulosa y hemicelulosa, lo que incrementa los niveles de actividad celulasa desde las cero horas hasta el punto máximo (48 horas). Para el caso de la proteasa, el inicio de actividad enzimática es a partir de las 24 horas, para un punto máximo a las 48 h (Fig.25).

Torres (2010) realizó un estudio utilizando *Rhizomucor pusillus* utilizando una mezcla de pulpa de café, residuos de la extracción del aceite de olivo y bagazo de caña en las mismas proporciones para la producción de celulasas, xilanasas y pectinasas midiendo la actividad de estas por DNS. Se presentó una actividad de 35.1, 19.2 y 3.6 U/g respectivamente, esta última en un tiempo de 15 horas para celulasa. Presentándose esta producción de celulasa en un tiempo menor a comparación que la producción de *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A) utilizado en FMS con olote de maíz (Fig.24), pero en menor cantidad.

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

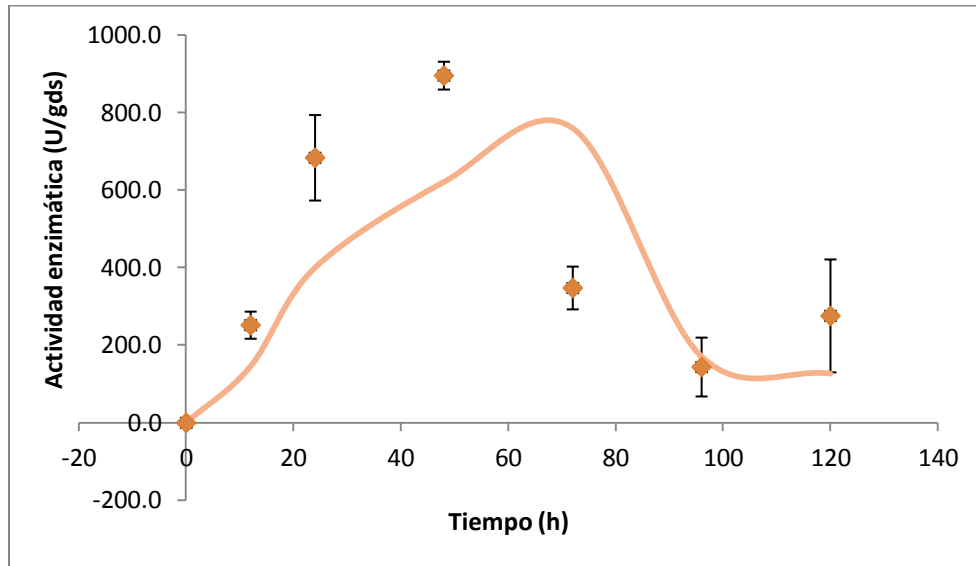


Fig. 24. Actividad enzimática de celulasa; (◇) teórico; (-) experimental.

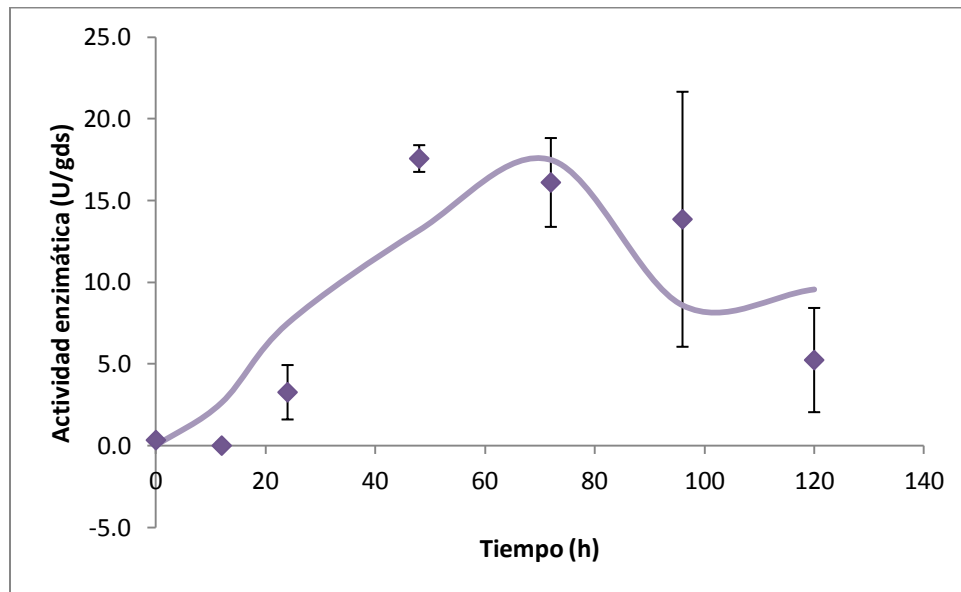


Fig. 25. Actividad enzimática de proteasa; (◇) teórico; (-) experimental.

Osorio (2008) estudió la cinética de producción de biomasa y renina a partir del hongo *Mucor miehei*, utilizando medios de cultivo con sustratos alternativos como fuente de carbono y de nitrógeno, que favorecieron la actividad enzimática, y establecieron como mejores medios de cultivo, el primero contenían suero de leche tanto como fuente de carbono y nitrógeno, y el segundo suero de leche y harina de maíz como fuente de nitrógeno. Su producción máxima se presentó a



## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

las 90 horas y a las 85 horas respectivamente. Osorio (2007) recalco que al utilizar melaza de caña en uno de los cultivos, no se presento actividad enzimática, la cual pudiera ser debido a la complejidad del medio, pues las melazas contienen una gran cantidad de iones que pueden inhibir la producción enzimática.

A diferencia de los estudios anteriores, la producción de proteasa por la cepa SOC-4A sobre olote de maíz fue considerable (5.02 U/mL), siendo que este material no se ha utilizado como soporte-sustrato en FMS para la producción de esta enzima. Es evidente que el uso adecuado de sustrato para la producción de enzimas es mayormente favorable por la cepa utilizada, así como lo menciona Osorio (2008) que utilizo suero de leche y harina de maíz como fuente de carbono y nitrógeno, en donde el hongo utilizado (*Mucor miehei*) tuvo una mayor producción de renina.

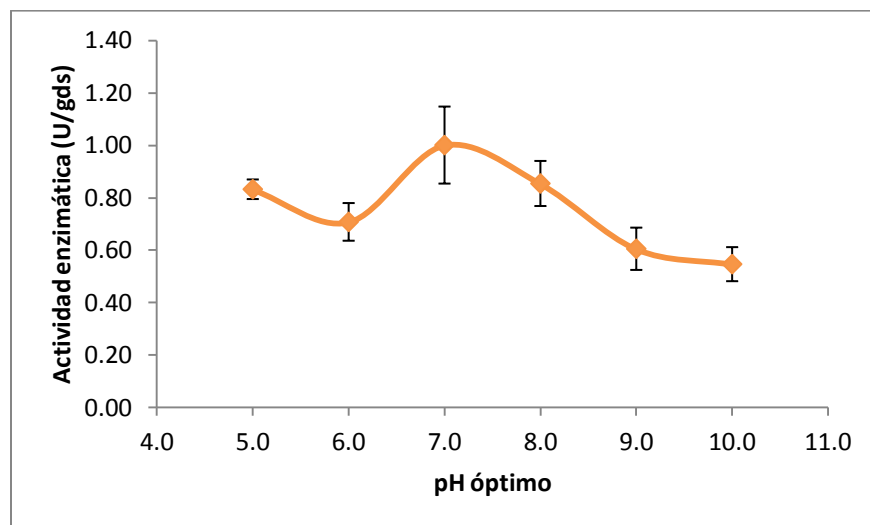
En la determinación de la actividad proteolítica en esta investigación para el agar rojo-congo se utilizo como fuente de proteína suero de leche, presentándose los halos de hidrólisis en la prueba, sin embargo, las cinéticas de FMS se realizaron con olote de maíz con la cepa *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A), el cual no fue tratado con el objetivo de adicionarle una fuente de proteína; siendo esto posible, la producción de proteasa se presentaría en mayor cantidad. La producción de celulasas por *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A) se presentó en mayor cantidad debido a que el sustrato seleccionado para esta investigación (olote de maíz) ya que tiene cantidades considerables de celulosa, hemicelulosa y lignina, y que pueden ser utilizados como soporte- sustrato para la producción de celulasas.

## **6.4. TEMPERATURA Y pH ÓPTIMO, ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS: ETAPA 3.**

### **6.4.1. pH ÓPTIMO DE LAS ENZIMAS**

La actividad enzimática de celulasa presentó una mayor producción a un pH de 7.0 (Fig. 26). Lo mismo ocurrió para la evaluación del pH óptimo de proteasa, presentando una mayor cantidad de actividad enzimática a un pH de 7.0 (Fig. 27). Se utilizaron buffer de 4 a 10 con caseína y carboximetil-celulosa al 0.1% respectivamente.

Algunos autores como Mejías *et al.*, (2000) determinaron el pH de la actividad enzimática de *Mucor pusillus* en la producción de proteasa y evaluaron el efecto del pH sobre la actividad coagulante y proteolítica del preparado enzimático. Se presentó un pH óptimo de actividad coagulante de 6.0 a 6.2 y de 5.8 para la actividad proteolítica. Wu *et al.*, (1996) obtuvieron lipasas con un pH óptimo de actividad enzimática a un pH de 8.0 producidas por *Rhizomucor miehei*.



**Fig. 26. pH óptimo y actividad enzimática de celulasa**

## “Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”

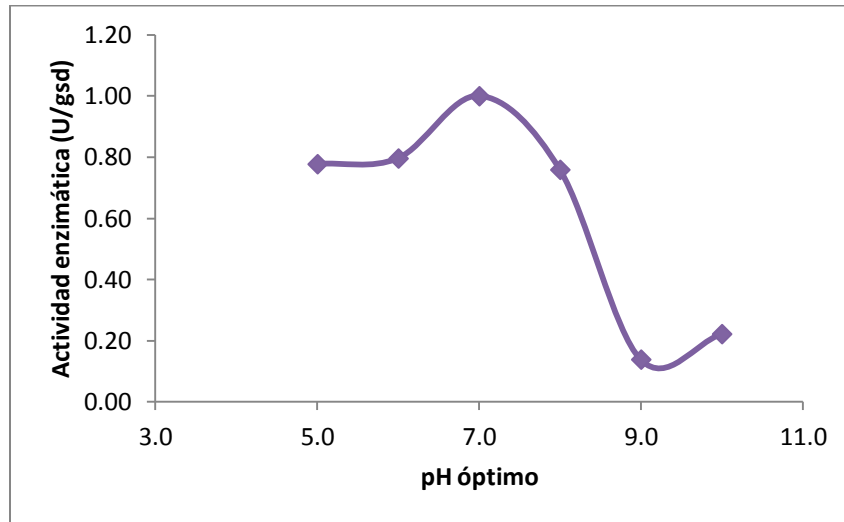


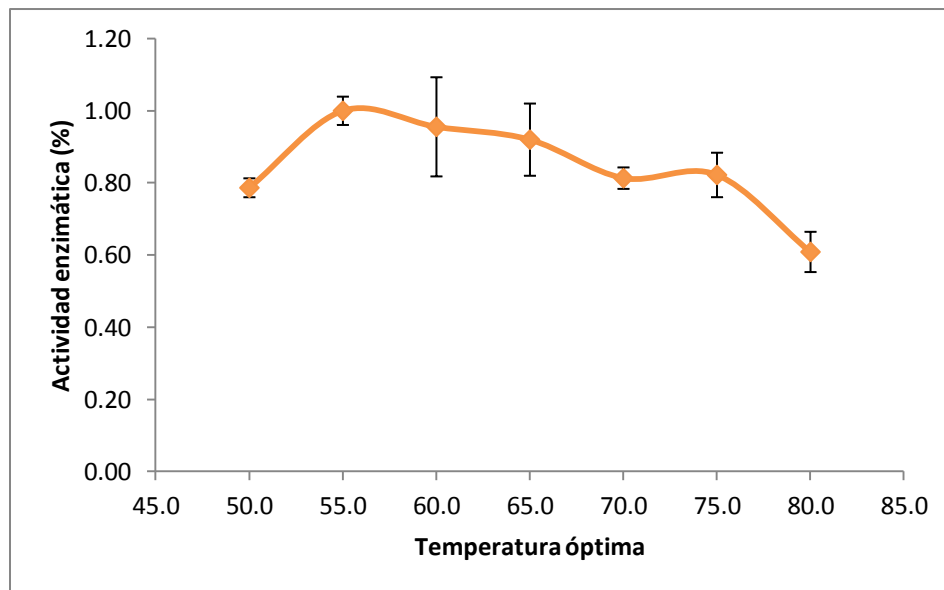
Fig. 27. pH óptimo de la actividad enzimática de proteasa.

El pH está directamente relacionado con la estructura de las enzimas y la actividad enzimática ideal de estas y se puede presentar a diferentes pH en menor o mayor proporción dependiendo del hongo que se trate. En los extractos enzimáticos de la FMS con olote de maíz utilizando la cepa de *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A) presentó una mayor actividad enzimática a pH 7.0 tanto para proteasa como para celulasa, y al compararse con los reportados por Mejías *et al.*, (2000) donde obtiene un pH de entre 5.2 y 6.2, el pH óptimo para la actividad de la enzima producida por *Mucor Pusillus*, son inferiores que los requeridos por *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A), a comparación que los reportados por Wu *et al.*, (1996) el pH óptimo (8.0) de *Rhizomucor miehei* se encuentra más cercano a la neutralidad al igual que el de *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A).

Estos resultados obtenidos nos permiten clasificar los extractos producidos como neutros, estos valores si presentan una variación significativa debido también al tipo de fermentación, sustrato utilizado y hongo utilizado entre los estudios realizados por otros autores

#### **6.4.2.- TEMPERATURA ÓPTIMA**

Al evaluar las condiciones de actividad enzimática para los extractos producido por la cepa de *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A), se observó que la mejor actividad enzimática se obtuvo a una temperatura de 55 °C y 60 °C para celulasa (Fig. 28) y proteasa (Fig. 29) respectivamente. Presento el 100 % de actividad enzimática para las dos enzimas evaluadas, lo cual nos indica que esta cepa aprovecha las fuentes de carbono y nitrógeno convirtiéndolos en los metabolitos que requerimos. Los resultados fueron adecuados a la ecuación de Arrhenius.



**Fig. 28. Temperatura óptima de celulasa.**

Peña (2009) reportó una temperatura óptima de 50 °C para una cepa de *Rhizomucor pusillus* strain (NRRL28626 18S) en la producción de lipasas en FMS, presentado el 100% de actividad enzimática. Mejías *et al.*, (2000) observaron una temperatura óptima de 55 °C en un estudio utilizando *Mucor pusillus* en la actividad enzimática para la coagulación de la leche. (Wu *et al.*, [1996]; González [2010]) también observaron una temperatura óptima de actividad enzimática de lipasas utilizando *Rhizomucor miehei* a 50 °C.

## “Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”

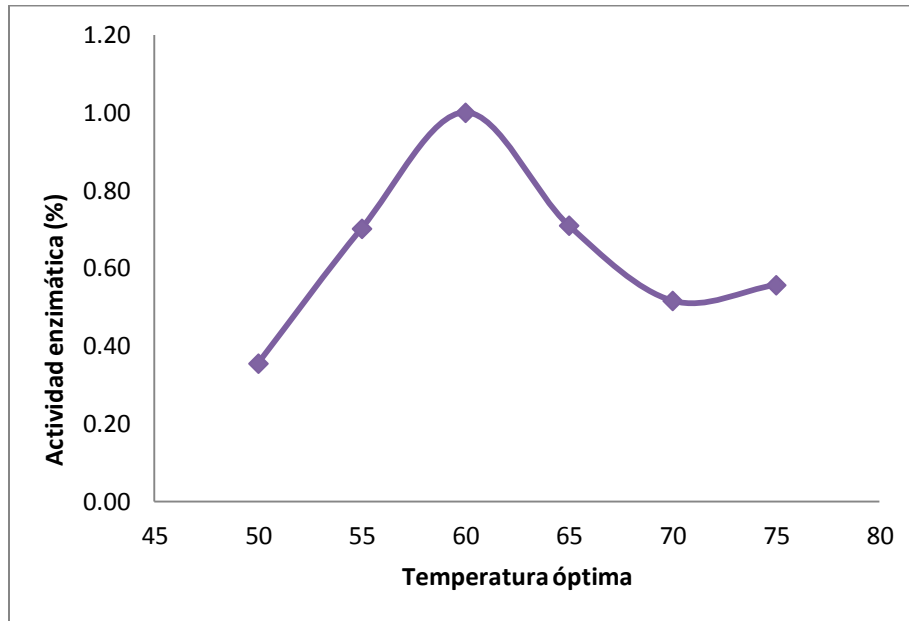


Fig. 29. Temperatura óptima de proteasa.

De acuerdo con los reportes realizados por los diferentes autores (Wu *et al.*, [1996] ;Peña [2009]; Mejías *et al.*, [2000]; y González [2010]), utilizando *Rhizomucor pusillus*, *Rh. Miehei* y *Mucor pusillus*, la mayor actividad enzimática se mostro a una temperatura optima de entre 50 y 55 °C, al igual que *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A) utilizado en esta investigación , el cual tuvo una temperatura óptima de actividad enzimática a 55 °C para celulasa y 60 °C para proteasa, evaluando los extractos proteolíticos obtenidos de la FMS utilizando olote de maíz como soporte sustrato , y fue comparado con las cepas mencionadas, ya que se trata del mismo hongo utilizado y son pertenecientes a la clase de los *Zigomicetos*. Además el medio en que se encuentre la enzima también influye en el valor de la temperatura óptima.

### 6.4.3. ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS ENZIMAS

De acuerdo a la figura 30 las celulasas extracelulares de *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A) muestra una actividad enzimática con una estabilidad a los 75 °C transcurrido un tiempo de 1 hora, y comienza a decrecer a 85 °C a partir de un

## “Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”

tiempo de 10 minutos, así como se puede observar las celulasas mantienen una actividad a los 85 °C de manera constante y comienza a decrecer a los 90 °C. En la figura 31, se muestra la estabilidad térmica de proteasa, esta tuvo una estabilidad de 1 hora a 65 °C, y comienza a decrecer a los 75 °C de la misma forma que ocurrió con la celulasa.

González (2010) presento un estudio con proteasa acida de *Mucor pusillus* para la coagulación de la leche, la cual mostro una estabilidad entre 30 y 50 °C. Produciéndose una inactivación brusca con el aumento de la temperatura, de modo tal que a 70 °C perdido el 75% de su actividad original en un periodo de 1 hora. López-Belmonte (1996) estudio una lipasa de *Rhizomucor miehei* trabajando de 37 a 50 °C cruda y semi-purificada, y mostro que la lipasa semi-purificada es menos termoestable debido a la pérdida total de su actividad con el tiempo con una actividad enzimática del 0%, y la lipasa cruda mostro un 6.6% de actividad a las 17 horas.

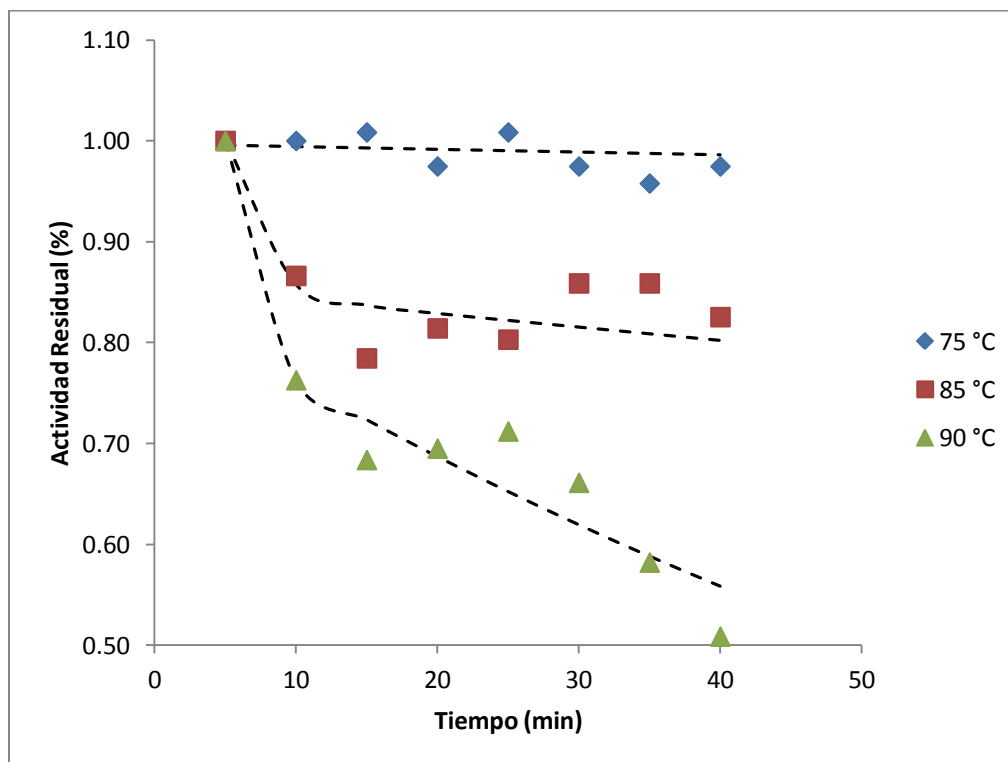


Fig. 30. Estabilidad térmica de celulasa; ( $\diamond$ ) 75 °C; ( $\square$ ) 85 °C; ( $\Delta$ ) 90 °C, teórico; (---) experimental.

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

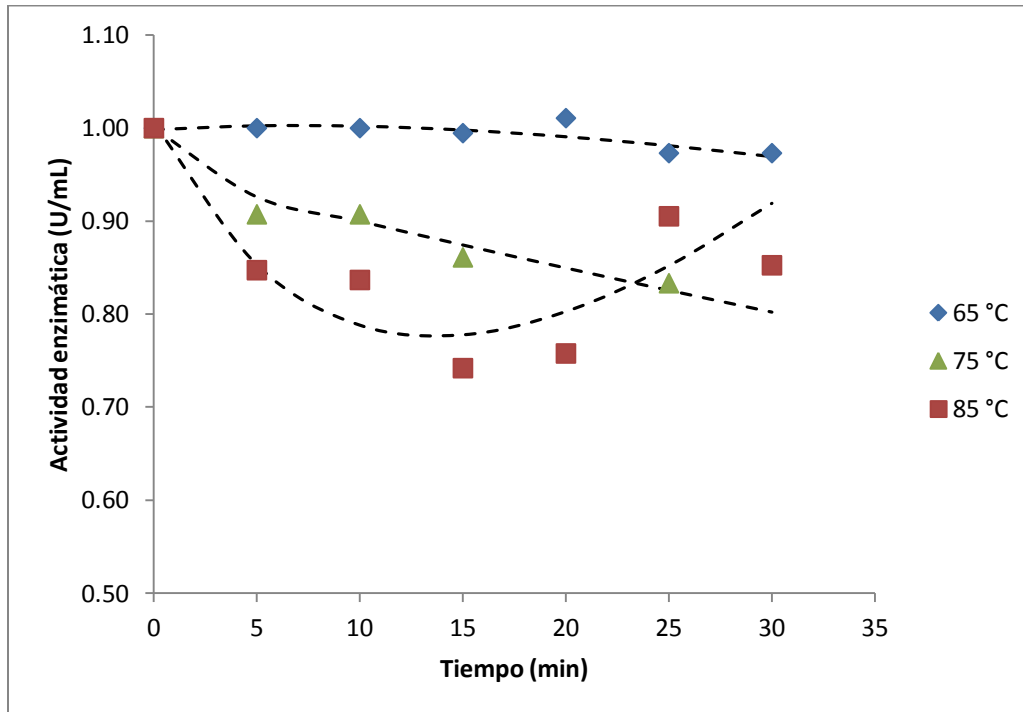


Fig. 31. Estabilidad térmica de proteasa; (◇) 65 °C; (□) 75 °C; (Δ) 85 °C, teórico; (---) experimental.

A comparación con los resultados obtenidos por esta investigación, las enzimas obtenidas muestran un estabilidad térmica por más tiempo, aun tratándose de cepas similares a *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A) como lo son *Rhizomucor miehei* y *Mucor pusillus* que pertenecen a la clase de los zigomicetes que presentan variaciones en la estabilidad térmica de los metabolitos producidos por estas cepas y los de *Rhizomucor pusillus*, quizás este comportamiento se presenta por el tipo de sustrato utilizado, la fermentación utilizada y el tratamiento recibido para enriquecer el sustrato.

## **7.- CONCLUSIÓN**

La actividad enzimática de los microorganismos se puede presentar con variaciones significativas debido a que cada uno de ellos requiere de factores diversos para su crecimiento, tales como el sustrato, pH óptimo del medio, temperatura óptima, la cual también se ve afectada por estos factores. Es por ello que los estudios sobre la producción de enzimas se han mostrado como tema importante para el desarrollo de metabolitos termoestables. Existen microorganismos usados comúnmente para la producción de celulasas y proteasas como lo son *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*, entre otros. Estos últimos presentaron una mejor actividad a diferentes temperaturas y pH del medio, el cual resulto adecuado para cada uno, de acuerdo a los requerimientos necesarios.

Cabe mencionar que la actividad enzimática se vio afectada por el pH factor que influye en la ionización de los aminoácidos de la estructura primaria y secundaria de las enzimas controlando de esta manera su actividad enzimática. La temperatura óptima de la actividad enzimática es un factor que también se debe considerar en la producción de enzimas, ya que conociendo las condiciones adecuadas de reacción de las enzimas, se puede disminuir el tiempo de producción.

En base a los resultados obtenidos de esta investigación, la cepa de *Rhizomucor pusillus* (SOC-4A) tiene la capacidad de secretar celulasas al medio al igual que las proteasas. El agar presentó una zona clara alrededor de la colonia en los cuales se contenía como sustrato celulosa y suero de leche para cada una de las evaluaciones; esta prueba como lo menciona Yoon *et al.*, (2007), es confiable para la detección de la actividad extracelular enzimática.

Los residuos agro-industriales permiten la producción de diversas enzimas de manera relativamente barata. El olote de maíz permite actuar como soporte-



## **“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

sustrato para la producción de celulasa y proteasa en fermentación en medio sólido por la cepa empleada en esta investigación.

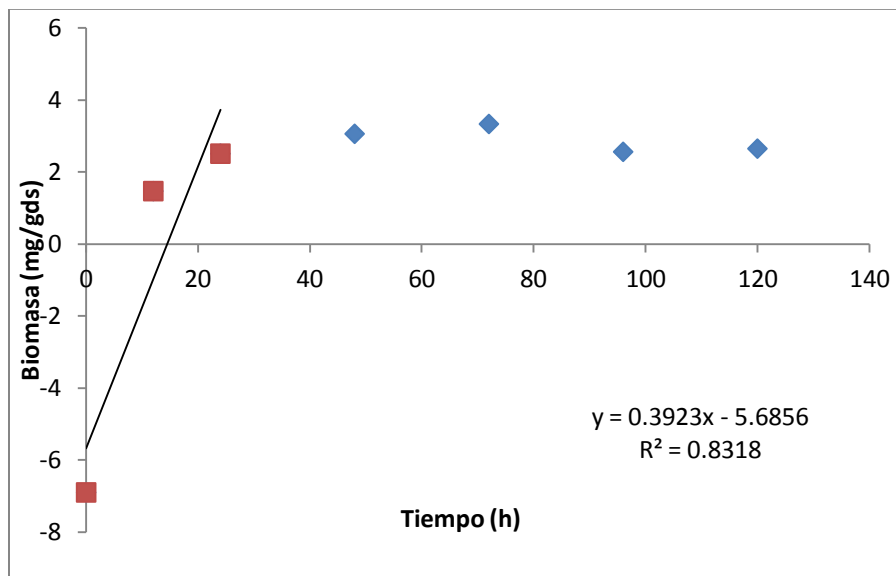
La cepa de *Rhizomucor pusillus* SOC-4A presentó la capacidad de crecer a una temperatura de 50 ° C y producir enzimas extracelulares capaces de mantener más del 50 % de estabilidad a temperaturas de 85 y 90 °C durante 30 min.

Las celulasas como metabolitos primarios en respuesta esencial para su crecimiento, tienen una temperatura óptima de 55 °C para una mejor actividad enzimática y retienen el 50 % de estabilidad a 90 °C durante 40 min. Como metabolitos secundarios se produjeron proteasas, con una temperatura óptima de actividad enzimática a los 60 °C y una estabilidad mayor al 70 % a los 85 °C durante 30 min.

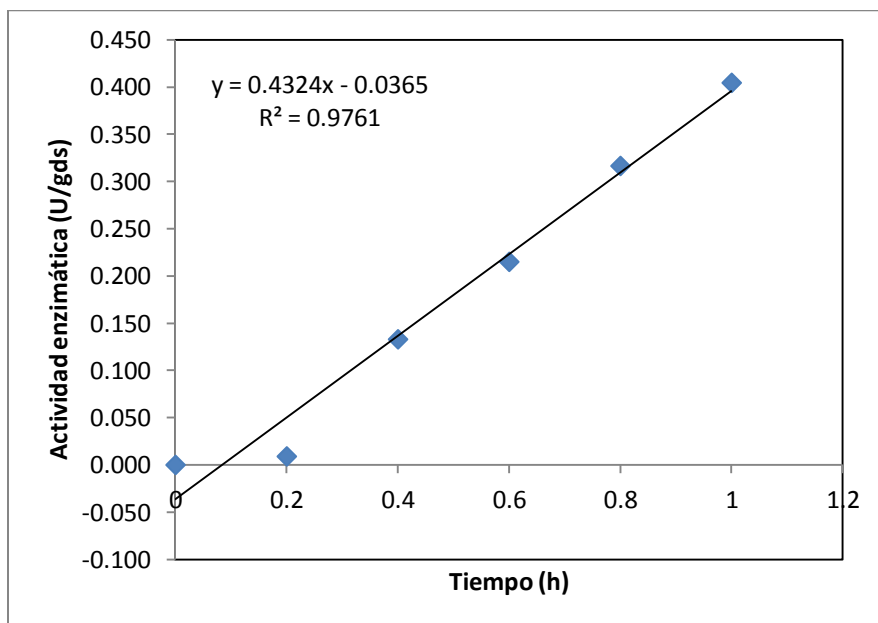
De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación resulta atractiva la utilización de esta cepa para la producción de enzimas termoestables en fermentación en medio sólido. Debido a los tiempos reducidos y alta producción.

## 8. ANEXOS

**Curva patrón de Biomasa**



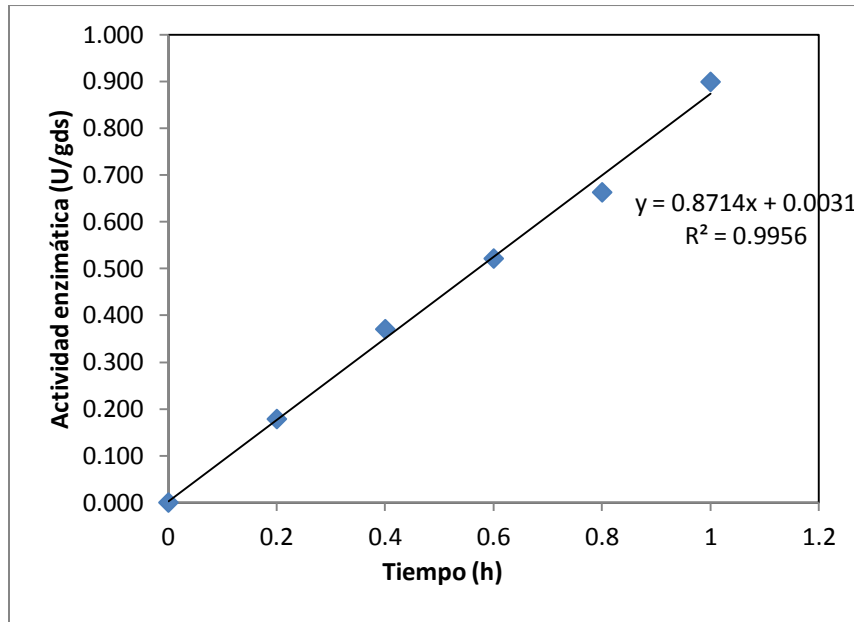
**Curva patrón de producto (celulasa)**



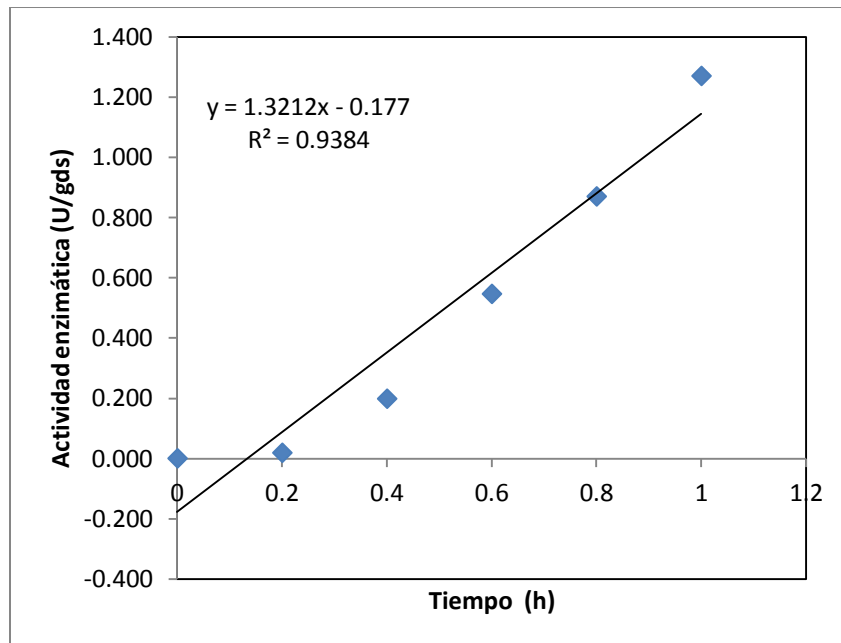
**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

**Curva patrón de producto (proteasa)**



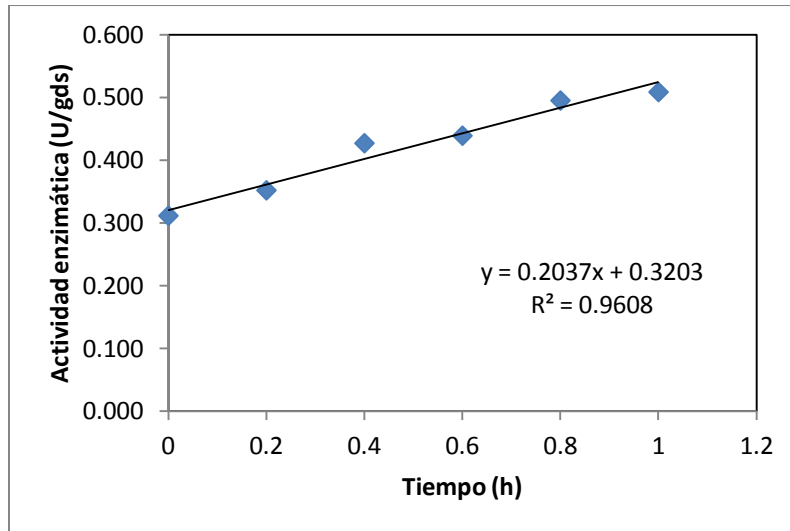
**Curva patrón de azúcares reductores**



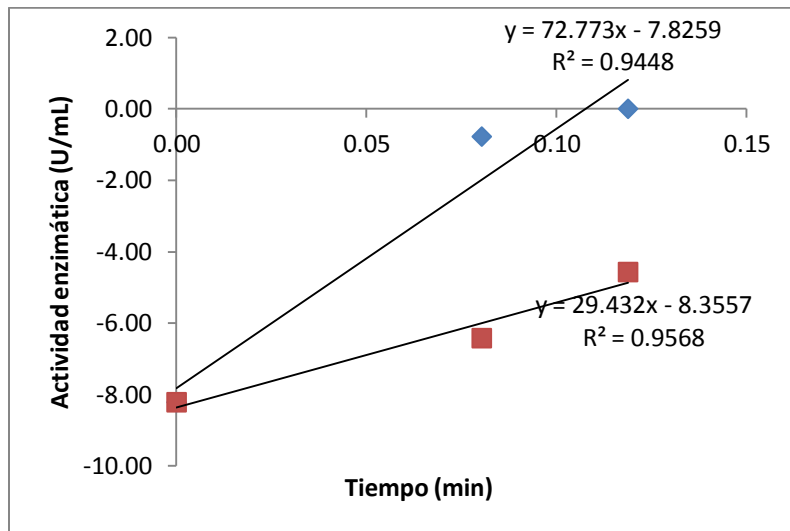
**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

**Curva patrón de azúcares totales**



**Curva patrón de estabilidad térmica**



## **9. BIBLIOGRAFÍA**

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

Alves María, De campos G., Okada K., Ferreira I., Ivo Aauto (2005). Detection of extracellular protease in *Mucor* species. Rev. Iberoam Micol. 22: 114-117.

Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ: Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. Biochem J 2004, 382:769–781.

Brethauer S, Wyman CE (2010): Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. Bioresour Technol, 101:4862–4874.

Buenrostro F. José, De la Garza T. Heliodoro, Ibarra J. Vrani, Aguilar Cristóbal, (2010). Aprovechamiento de las cascaras de mando como soporte para la producción de polisacaridasas. *Acta química mexicana*, Vol2 N°3.

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.

Ferrer M. Yoandy, León R. Marta, Michelena A. Georgina, Dustet M. Julio, Duque O. Arianna, Ibañes My Lai, Tortolo C. Keyla, (2011). Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulasa cristalina para posibles aplicaciones. ICIDCA 45 (1):3-12.

Gatto M., Muratori S., Rinaldi S., A functional interpretation of the logistic equation, Ecol. Modell. 42 (2) (1988) 155-159.

González Jorge, Rodríguez Jairo, Del Monte Alberto (2010). Las lipases: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. Biotecnología. Vol.N°12, 124-140.

***“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por Rhizomucor pusillus SOC-4A”***

---

Horn SJ, Sikorski P, Cederkvist JB, Vaaje-Kolstad G, Sørli M, Synstad B, Vriend G, Vårum KM, Eijsink VGH: Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:18089–18094.

Horn SJ, Sørli M, Vårum KM, Väljamäe P, Eijsink VGH: Measuring processivity. (2012), *Methods Enzymol* 510:69–96.

Igual M, Sampedro F, Martínez –Navarrete, Fan X. (2012). Combined osmodehydration and high pressure processing on the enzyme stability and antioxidant capacity of a grapefruit jam.

Kostylev M, Wilson DB: Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. *Biofuels* 2012, 3:61–70.

Lehtio J, Sugiyama J, Gustavsson M, Fransson L, Linder M, Teeri TT: The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:484–489.

Linder M, Teeri TT: The roles and function of cellulose-binding domains. *J Biotechnol* 1997, 57:15–28.

López-Belmonte M., Estudio de la actividad y enantioselectividad de derivados de la lipase de *Rhizomucor miehei*. (Tesis Doctoral). Facultad de Farmacia, Universidad Complutense (1996).

Martínez- Anaya C., Balcázar – López E., Dantán- González, Folch- Mallol L. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Rev Lat de Microbiología*; Vol. 50: 119-131.

Mejías E, Morales D, Cárdenas M.E. (2000). Parámetros de comportamiento bioquímico de la enzima. *Ciencia y tecnología de los alimentos*. ISSN: 0864-4497.

Merino S, Cherry J (2007): Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 108:95–120.

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

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

Nouani A, Moulti F, Belbraouet S, Bellal MM (2011). Purification and characterization of milk-clotting protease for *Mucor pusillus*: Method comparison. *African Journal of Biotechnology*. DOI: 10.5897/AJB10.1665.

Osorio Adriana, Gómez Natalia, Sánchez Claudia (2008). Evaluación de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de renina a partir del hongo *Mucor miehei*. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquina*. N° 45: 17-28.

Ovando Chacón S.L., Watiszewski K.N., (2005). Preparativos de celulosas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Biotecnología y Bioquímica*. 21(42): 111-120.

Paredes Mediana Daysi A. Obtención de enzimas celulósicas a partir de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*). (Tesis de Licenciatura) Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos (2010).

Peña Reyes Ruth. Caracterización taxonómica y molecular de cepas de hongos termófilos: estudios de crecimiento y producción de lipasas. (Tesis Licenciatura), Universidad Autónoma Metropolitana (2009).

Pérez Pérez Liliana I., Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). (Tesis de Licenciatura) Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencia Bogotá; 2007.

Ribes, J.A., Vanover-Sams, C.L., Baker, D.J (2000). *Zygomycetes in human*

Robledo Olivo (2006), Obtención de ácido elálgico mediante la biodegradación fúngica de elagitaninos en cultivo en medio sólido. (Tesis Maestría).

**“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A”**

---

Rodriguez G. Ibeth., Piñeros Yineth C., (2007). Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma sp.* Sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato, *disease Clin Microbiol Rev*; 13: 236-301.

Savitha S., Sadhasivam, Swaminathan K., Huei Lin Feng, (2011). Fungal Protease: Production and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Chemical Engineers*. 42: 298-304.

Shi Jian, Sharma – Shivappa, Ratna R., Interaction between fungal growth, substrate utilization and enzyme production during shallow stationary cultivation of *Phanerochaete chrsosporium* on cotton stalks (2012). *Enzyme and Microbial Technology*. 51:1-8.

Solera J. Federico, Rodríguez V. Adriana, Soto V. Bibiana, (2010).Evaluación de producción de proteasas en dos cepas de *Mucor sp.* por fermentación sumergida empleando dos tipos de medio de cultivo. *Biotecnología y Bioquímica*. 24:63-68

Torres- Narbona M., Guinea J., Muñoz P., Bouza E., (2007). Zigomicetos y zigomicosis en la era de las nuevas terapias antifúngicas, *Rev Esp Quimioterapia*; Vol. 20 (Nº 4): 375 -386.

Vázquez Imir, Aguilera Antonio, Prado Barragán Lilia, Aguilar C N , (2008). Producción Fúngica de proteasas inducidas con pelo de cerdo. *Biotecnología y Bioingeniería*. 19(2): 33-40.

Viniegra –González Gustavo, Ernesto Favela-Torres, Cristóbal Noé Aguilar, Sergio de Jesús Romero Gomez, Gerardo Díaz- Godínez, Christopher Augur (2003). Advantges of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering*. 13:157- 167.

Wood TM, McCrae SI: Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. *Adv Chem Ser* 1979, 181:181–209.



***“Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por Rhizomucor pusillus SOC-4A”***

---

Yoon Ji, Dog Yeon, Seung Ju, Seong Hwan Kim (2007). Comparison of dyes for easy detection of extracellular cellulans in fungi. Microbiology 35 (1): 21- 24.