

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

Presentado por:

BEATRIZ DEL CARMEN COUTIÑO LAGUNA

Que se somete a consideración de H. jurado Examinador Como Requisito
Parcial Para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Diciembre 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

Presentado por:

BEATRIZ DEL CARMEN COUTIÑO LAGUNA

Que se somete a consideración de H. jurado Examinador Como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Director



Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Asesor

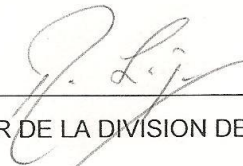


M. C. María Hernández González

Asesor



Lic. Laura Olivia Fuentes Lara



COORDINADOR DE LA DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

Dr. Ramiro López Trujillo

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Diciembre 2011



El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado en el marco de las actividades comprometidas del proyecto **“PRODUCCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE INTERÉS INDUSTRIAL A PARTIR DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE RUMEN”** con Clave: 02-03-0404-2219. El proyecto fue financiado por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro bajo la convocatoria de proyectos especiales de investigación.

Los colaboradores de esta investigación fueron:

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Dr. Jesús Manuel Fuentes Rodríguez

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

M.C. Alberto Guerrero Rodríguez

Dr. Antonio Aguilera Carbó

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara

LCN. Laura Maricela Lara López

*Hay hombres que luchan un día y son buenos.
Hay otros que luchan un año y son mejores.
Hay otros que luchan muchos años y son muy buenos.
Pero hay quienes luchan toda la vida,
esos son los imprescindibles.*

Bertolt Brecht

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, gracias por darme la vida, por la maravillosa familia en que nací, por todos esos momentos de dificultad los cuales me han llenado de fortaleza y por los momentos tan hermosos de mi vida. Pero sobre todo gracias por permitirme concluir esta etapa de mi vida y nunca dejarme sola.

A mi universidad, mi **ALMA MATER**, por abrirme sus puertas del conocimiento y brindarme muchas oportunidades.

A mi asesor de tesis, a la **Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**, por su valiosa cooperación para concluir este proyecto, por su paciencia, confianza y disposición.

A la **LCN. Laura Maricela Lara López**, gracias por su atención y apoyo brindado a lo largo de la realización de esta tesis. Pero sobre todo gracias por todos esos momentos tan bonitos y por su valiosa amistad.

Al doctor **Dr. Mario Alberto Cruz Hernández**, a la **Lic. Laura Olivia Fuentes Lara** por su apreciable tiempo y enseñanzas ofrecidas para la elaboración de este trabajo.

A los maestros del departamento de Tecnología de Alimentos que me brindaron sus conocimientos, por su paciencia, disposición y que con ello contribuyeron en mi formación académica. En especial a la **MC. María Hernández González**.

A mis grandes amigos y compañeros Julio, Gaby, A. Edwin, Chayan, Emilio, Víctor, Morras, Betty Negrete, Mary, Kony, Brenda, Luz, Blanquita, Norma, Adriana, Chelo, Joselyn, Jesús Alberto, Armando, Sra. Juanita, Lulú, María Concepción, Rodríguez.

DEDICATORIAS

Con amor, cariño y admiración a mis padres:

A mi padre: Mario Coutiño Solís (†)

A mi madre: María Luz Laguna Vázquez

Gracias por darme la vida, por todo su esfuerzo para poder alcanzar mis sueños y concluir etapas tan importantes como esta, por ser lo mejor de mi vida, todos esos consejos, gracias por confiar en mí y estar a mi lado en cada momento de mi vida, dios los bendiga, este logro fue inspirado en ustedes y para ustedes. Pero sobre todo gracias por ser mis padres los amo mucho.

A mi hermana: *Mirna de la Cruz Laguna* y hermanos: *Rodolfo de la cruz Laguna, Héctor de la Cruz Laguna, Miguel Ángel de la Cruz Laguna, Eduardo Coutiño Laguna.*, gracias por todo los quiero mucho, ya que con su ejemplo me dieron la fuerza para seguir adelante en mi vida, los admiro ya que han guiado mis pasos, que con sus consejos y apoyo he alcanzado grandes metas, las cuales son tuyas también y gracias a esto es lo que ha hecho que sea lo que soy.

A mi novio *German Cuapio Morales* gracias por toda tu paciencia, tus consejos por hacer de mí una mejor persona. Pero sobre todo por brindarme tu amor y compañía dios bendiga tus pasos.

A mis tíos (as): *Javier, Florinda, Doris.*

Por todo el ayer, hoy les dedico todo mi mañana

Los ama...

Beatriz del Carmen Coutiño Laguna

ÍNDICE GENERAL

Página

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Antecedentes	2
1.2 Justificación	3
1.3 Hipótesis	4
1.4 Objetivo general	4
1.5 Objetivos específicos	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Resumen	6
2.1.1 Condiciones del medio ruminal	6
2.1.2 Eficiencia microbiana	8
2.1.3 Bacterias	8
2.1.3.1 Bacterias Celulolíticas	11
2.1.3.2 Bacterias Hemicelulolíticas	11
2.1.3.3 Bacterias Pectinolíticas	11
2.1.3.4 Bacterias Amilolíticas	11
2.1.3.5 Bacterias Utilizan azúcares	11
2.1.3.6 Bacterias Utilizan ácidos	12
2.1.3.7 Bacterias Proteolíticas	12
2.1.3.8 Bacterias Productoras de amoníaco	12
2.1.3.9 Bacterias Lipolíticas	12
2.1.3.10 Bacterias Productoras de metano	13
2.1.4 Protozoarios	13
2.1.4.1 Protozoos Ciliados	14
2.1.5 Hongos	14
2.2 Enzima Celulasa	14
2.2.1 Generalidades de las enzimas	14
2.2.2 Poder catalítico	15
2.2.3 Especificidad	15
2.2.4 Actividad catalítica	15
2.2.5 Factores que afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas	16
2.2.5.1 Efecto del pH	16
2.2.5.2 Efecto de la temperatura	16
2.2.5.3 Efecto de la concentración del sustrato	16
2.2.5.4 Efecto de la actividad del agua	16
2.2.6 Nomenclatura y Clasificación	16
2.2.7 Uso industrial de las enzimas	18
2.3 Celulosa	20
2.3.1 Estructura de la celulosa	21
2.3.2 Función de la celulosa	22
2.3.3 Hidrólisis de la celulosa	22
2.3.4 Enzimas utilizadas en la degradación de celulosa	23
2.3.5 Sistemas agregativos	25

2.3.6	Sistemas no agregativos	25
2.3.7	Microorganismos que degradan la celulosa	25
2.3.8	Usos de celulosa en interés la industria alimentaria	26
2.4	Enzima Celulasa	26
2.4.1	Usos industriales	27
3.	MATERIALES Y METODOS	28
3.1	Localización del área de estudio	28
3.1.1	Material biológico	28
3.2	Preparación del medio	28
3.2.1	Siembra en medio sólido	28
3.2.2	Caracterización macroscópica	29
3.2.3	Caracterización microscópica	29
3.3	Purificación de los microorganismos aislados	31
3.4	Ensayo (Screening)	31
3.4.1	Medio específico sólido	32
3.4.2	Caracterización macroscópica	33
3.4.3	Caracterización microscópica	34
3.4.4	Curva de crecimiento	34
3.4.5	Producción de la enzima celulasa	35
3.4.6	Inducción de la actividad celulasa en medio líquido específico	35
3.4.7	Curva de crecimiento en medio específico	37
3.5	Preparación del sustrato específico para la producción de la enzima celulasa.	37
3.5.1	Cinética enzimática	38
3.5.2	Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret.	38
3.5.3	Determinación de azúcares reductores (Somogy-Nelson)	40
3.5.4	Cuantificación de la actividad enzimática	40
3.5.5	Reactivo 1 (Somogy)	40
3.5.6	Reactivo 2 (Nelson)	40
3.5.7	Cinética Enzimática	41
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
5.	CONCLUSIONES	73
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
7.	ANEXOS	80

ÌNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación de bacterias ruminales según su afinidad por el tipo de sustrato.	10
Cuadro 2. Componentes del medio de cultivo sólido para la producción de la enzima celulasa.	33
Cuadro 3. Componente del medio de cultivo líquido específico para la producción de celulasa.	36
Cuadro 4. Componentes del sustrato líquido específico para la producción de celulasa.	37
Cuadro 5. Preparación de muestras para la cuantificación de proteína total por el método de Biuret.	39
Cuadro 6. Morfología macroscópica de los microorganismos aislados en Agar Schaedler.	44
Cuadro 7. Morfología microscópica de los microorganismos aislados en Agar Schaedler.	47
Cuadro 8. Crecimiento de los seis microorganismos en diferentes tiempos (papel periódico como fuente de carbono).	54
Cuadro 9. Crecimiento de los seis microorganismos en diferentes tiempos (papel filtro como fuente de carbono).	57
Cuadro 10. Crecimiento de los seis microorganismos en diferentes tiempos (carboximetil celulosa como fuente de carbono).	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Clasificación morfológica de las bacterias	9
Figura 2. Protozoo ciliado proveniente del rumen bovino	14
Figura 3. Microfibrillas estructurales de la celulosa	20
Figura 4. Estructura de la celulosa unidos por enlaces glucosidicos	21
Figura 5. Celulosa amorfa y cristalina	21
Figura 6. Complejo enzimático que forma a las celulosas	27
Figura 7. Siembra del microorganismo en estría abierta cruzada	29
Figura 8. Frotis de la tinción de Gram	30
Figura 9. Cajas Petri conteniendo cultivos puros para el Screening	32
Figura 10. Medios sólidos seleccionados y vaciados en cajas Petri	32
Figura 11. Representación de una colonia pura obtenida del líquido ruminal	34
Figura 12. Montaje del equipo para la realización de la cinética enzimática	38
Figura 13. Cuantificación de los azucares reductores desde la cinética hasta la lectura en el espectrofotómetro	41
Figura 14. Crecimiento del microorganismo incubado a 40 ° C, de la cepa VML-2 obtenida del líquido ruminal	43
Figura 15. Cajas Petri con las 6 cepas puras obtenidas de la purificación	46
Figura 16. Morfología microscópica de los microorganismos Gram positivos aislados del líquido ruminal	48
Figura 17. Morfología microscópica de los microorganismos Gram negativos aislados del líquido ruminal, cepa # 5 y caja # 6	49
Figura 18. Morfología microscópica de los microorganismos Gram positivos aislados del líquido ruminal, cepa # 3 y caja # 7	49
Figura 19. Cajas Petri empleando papel periódico como fuente de carbono	52

Figura 20. Cajas Petri empleando papel filtro como fuente de carbono	55
Figura 21. Cajas Petri empleando carboximetil celulosa como fuente de carbono	58
Figura 22. Cajas Petri conteniendo la cepa cuatro	61
Figura 23. Curva de crecimiento de la cepa 4 en medio líquido específico con papel periódico incubado a 40 ° C	63
Figura 24. Curva de crecimiento de la cepa 4 en medio líquido específico con papel filtro incubado a 40 ° C	64
Figura 25. Curva de crecimiento de la cepa 4 en medio líquido específico con carboximetil celulosa incubado a 40 ° C	65
Figura 26. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa # 4 en la producción de proteína	68
Figura 27. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa # 4 en el medio con papel periódico	70
Figura 28. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa # 4 en el medio con papel filtro	71
Figura 29. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa # 4 en el medio con carboximetil celulosa	72

RESUMEN

La presente investigación estudia el efecto de la cepa VML-2 obtenida de rumen bovino sobre la degradación de 3 sustratos: papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa.

Posteriormente se realizó una inducción de la cepa bacteriana seleccionada (VML-2) para llevar a cabo el estudio enzimático, diseñando medios específicos líquidos para la producción de la enzima celulasa, empleando como única fuente de carbono el papel periódico rico en celulosa, papel filtro y carboximetil celulosa.

Se realizaron tres curvas de crecimiento de los tres sustratos en medio líquido presentando una velocidad específica de crecimiento de: periódico $\mu = 0.9729$ DO/h, filtro $\mu = 0.8646$ DO/h, cmc $\mu = 0.9963$ DO/h; por lo que el microorganismo no tardó en adaptarse a los medios ya que la fase exponencial se presentó en las primeras horas de fermentación (12 h), posteriormente se realizó una cinética enzimática a tiempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos, empleándose el extracto enzimático producido. Se determinó el contenido de proteína extracelular por el método de Biuret, donde se observaron diferencias de: periódico $\mu = 0,8178$ DO/h, filtro $\mu = 0,9606$ DO/h, cmc $\mu = 1$ DO/h, ya que la mayor producción se observó en las primeras horas (12 h). Se determinó también la actividad enzimática por el método de Somogy-Nelson obteniéndose resultados de: periódico 0.8178 g/L, filtro 0.9606 g/L, cmc 1 g/L; en las primeras horas de fermentación (12 h). En la determinación de los azúcares reductores se obtuvo resultados significativos ya que en el sustrato de papel periódico se obtuvo la mayor cantidad enzimática con valores de 1 U; donde U se define como: la cantidad de azúcares reductores liberados en mg/ml por cada mg de proteína en 1 hora, empleando celulosa como sustrato al 1 %.

Palabras claves: *microorganismos del rumen, actividad celulosa, microbiota bacteriana, aislamiento, purificación.*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las enzimas son una clase especial de proteínas que aceleran la velocidad de las reacciones químicas que ocurren en una célula. Por esto se las conoce como “catalizadores biológicos”. El modo de acción es específico ya que cada tipo de enzima actúa sobre un tipo particular de reacción y sobre un sustrato específico(Enzimas-Aliadas).

Desde hace cientos de años se han venido empleando enzimas en procesos de fermentación tales como la elaboración de quesos, elaboración del pan, vino y cerveza. Antes del siglo XIX, se creía que estos fenómenos y otros similares eran reacciones espontáneas. No se conocía de la existencia y función de las enzimas. Hasta que en 1857 el químico francés Louis Pasteur comprobó que la fermentación sólo ocurre en presencia de células vivas (Enzimas-Aliadas).

La producción de enzimas para uso industrial tuvo sus orígenes en Dinamarca y Japón, a finales del siglo XIX, cuando se produjeron las primeras preparaciones de renina a partir del estómago de terneros y de amilasa de origen fúngico. Las enzimas son productos de las células y por lo tanto pueden obtenerse a partir de tejidos animales, vegetales o mediante procesos de fermentación empleando microorganismos seleccionados. En cuanto a las enzimas de origen animal, se han obtenido pocas, por ejemplo lipasa pancreática y tripsina (Carrera,2003).

Debido a que el empleo de algunas enzimas de origen vegetal y animal ha ido decayendo, se ha optado a favor de las enzimas de origen microbiano dentro de las cuales se encontró a la celulasa; la cual es rápidamente hidrolizada en la naturaleza, particularmente por los organismos anaeróbicos del rumen y del intestino, que son responsables de la digestibilidad de la celulosa en los animales rumiantes y en los herbívoros (Carrera,2003).

Siendo las celulasas un complejo enzimático usado para depolimerizar materiales de celulosa esta tienen una amplia aplicación en industrias (Zavala-Ginoa) del almidón y del azúcar, jugos de fruta, de pulpa y de papel (Carrera, 2003).

1.2 Justificación

La diversidad de microorganismos del rumen es importante porque la presencia de especies distintas aporta un conjunto mayor de genes y complementos de enzimas, así como reacciones bioquímicas precisas para una conversión máxima de productos alimenticios en células microbianas y productos de fermentación. Existen en el rumen especies que se superponen en su capacidad para utilizar un determinado sustrato.

Reportes en la literatura mencionan que al estudiar las enzimas celulasas que utilizan naturalmente los hongos y bacterias para degradar la celulosa, se encontró que la hidrólisis (degradación) de este polímero es muy compleja. Por eso, es necesario investigar las estructuras y funciones de estas enzimas para conocer con mayor detalle los mecanismos enzimáticos involucrados en la degradación de la celulosa. Ya que, sus actividades hidrolíticas son afectadas por una serie de factores físicos y químicos que limitan su aplicación industrial, ya que es necesario aislar cepas con mejores rendimientos en la cantidad de enzimas liberadas al medio extracelular y que mantengan la calidad intrínseca de dichas enzimas.

Muchas son las utilidades industriales que se le puede dar a la celulosa. Para la industria de alimentos, por ejemplo, es sometida a modificaciones que generan una serie de compuestos con múltiples propiedades funcionales: la carboximetil celulosa que se utiliza como espesante, la celulosa microcristalina es usada como anticompactante. Sin embargo, es menos conocido que la celulosa se encuentra comercialmente disponible en una gran variedad de presentaciones, se espera que las enzimas obtenidas del rumen bovino

permitan mejorar los procesos ya existentes, o bien encontrar nuevas aplicaciones.

Es por esto que todas las pruebas, resultados y conocimientos obtenidos de la actividad microbiana ruminal son de suma importancia para la presente investigación ya que todas las cepas obtenidas servirán como fuente de investigación para otras posibles investigaciones. Por lo que es muy importante tener un registro y mantenerlas en las condiciones adecuadas.

1.3 Hipótesis

En el rumen se favorece el crecimiento de especies de bacterias, entre ellos las que pueden digerir las paredes de las células de plantas (celulosa) para producir azúcares sencillos (glucosa). Por lo que la cepa VML-2 aislada de rumen bovino es capaz de producir una celulasa degradadora de celulosa.

1.4 Objetivo general

Emplear la cepa VML-2, aplicando tres sustratos diferentes, para la producción de la enzima celulasa mediante el empleo de 3 fuentes de carbono.

1.5 Objetivos específicos

- Resembrar las bacterias en Agar Schaedler (medio de cultivo comercial específico para anaerobios), las veces que sean necesarias (hasta obtener una cepa pura).
- Caracterizar macroscópicamente y microscópicamente las colonias obtenidas aisladas en Agar Schaedler.

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

- Seleccionar los microorganismos microbianos para la producción de la enzima celulosa de interés industrial mediante el diseño de medios de cultivos inductores.
- Emplear un solo microorganismo bacteriano adaptado a los medios de cultivos inductores.
- Determinar la velocidad de crecimiento mediante técnicas espectrofotométricas.
- Determinar la capacidad de producción de proteína mediante técnicas espectrofotométricas.
- Determinar y cuantificar la actividad enzimática, mediante técnicas espectrofotométricas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Rumen

Los rumiantes poseen el beneficio de tener una cámara fermentativa pre-gástrica, formada por tres compartimientos: el retículo, el rumen y el omaso. Estos compartimientos, también llamados pre-estómagos, se caracterizan por tener un epitelio no secretor (Van Lier, 2008). En estas cámaras se realiza la mayor parte de la digestión del alimento ya que este es un proceso dinámico relacionado a la ingestión y deglución del alimento (ingesta) y la salida de líquido, bacterias y alimentos residuales no digeridos (M-Kamande, 2006), todo esto es debido a la fermentación microbiana (principalmente por hidrólisis y oxidación) (Van Lier, 2008).

Anatómicamente el rumen es uno de los tres pre-estómagos que tienen los rumiantes, antes de llegar al estómago verdadero o abomaso (Valdez-Sepúlveda, 2010).

El rumen, a través de su fuerte musculatura permite la mezcla y la agitación del contenido ruminal. Su principal función es servir como una cuba de fermentación y la presencia de ciertas bacterias estimulan el desarrollo de gases. Estos gases se encuentran en la parte superior del rumen, con dióxido de carbono y metano formando la mayor porción (Ishler, 2011).

2.1.1 Condiciones del medio ruminal

La fermentación ruminal es la actividad metabólica de los microorganismos (m. o.) presentes en el rumen. En los rumiantes, la degradación de los sustratos moleculares por la acción de bacterias y otros m.o. se realiza por una hidrólisis enzimática igual que en la digestión glandular; la diferencia mayor es que las enzimas digestivas en la fermentación son de

origen microbiano, por lo que se le denomina 'digestión aloenzimática' (Van Lier, 2008).

La correcta fermentación bacteriana de los ruminales debe considerarse, ya que fuera de sus rangos normales provocan alteraciones de la digestión. Las condiciones del medio ruminal deben estar en un rango compatible con el crecimiento de micro-organismos que sean adecuados para la fermentación (Van Lier, 2008). Para esto deben de tener:

- **Ecosistema abierto y continuo:** Se debe permitir una entrada continua de sustratos y una salida permanente de desechos y de m. o. muertos, con la finalidad de que pueda desarrollarse una población de m. o.
- **Aporte constante de sustrato:** La ingesta que realiza el rumiante provee a los m. o. Los sustratos para su sustento, ya que estos necesitan nutrientes para poder desarrollarse, multiplicarse y mantenerse como población.
- **Tiempo de retención:** Los procesos fermentativos son más lentos que la digestión, para que la fermentación sea eficiente, el contenido ruminal debe ser retenido en el retículo-rumen tiempo suficiente para permitir la acción microbiana.
- **Medio acuoso:** Las acciones bioquímicas se realizan en un medio acuoso. Gran parte de las enzimas bacterianas son extracelulares y actúan en el líquido ruminal.
- **Anaerobiosis:** El ambiente ruminal es anaerobio. Ya que en presencia de O₂ en lugar de obtener productos que se utilizan como fuente de energía disponible para el animal, como los ácidos grasos volátiles, obtendríamos CO₂ y H₂O.

- **Osmolaridad:** La fermentación normal se lleva a cabo con una osmolaridad entre 260 y 340 mOsm (miliosmoles= expresa la concentración de solutos totales en una solución).
- **pH:** Puede variar entre 5.8 y 7.0. Luego de la ingesta de concentrados el pH baja considerablemente (por la rápida fermentación producida lo cual genera un medio ácido).
- **Temperatura:** Debido a la enorme cantidad de procesos metabólicos que se producen en el rumen la temperatura suele ser 1 ó 2 grados por encima de la temperatura corporal del animal (32 a 42 °C).

2.1.2 Eficiencia microbiana

La mayoría de los microorganismos que se encuentran en el retículo rumen son anaerobios estrictos aunque existen algunos facultativos. Estos microorganismos son principalmente bacterias, protozoarios, y hongos del tipo de las levaduras. Estos se agrupan de acuerdo al sustrato que utilizan (cuadro 1). La mayor parte de la concentración está en forma de bacterias, las cuales pueden contar 10^{10} a 10^{11} células/gramo de contenido ruminal (Ishler, 2011).

2.1.3 Bacterias

Las bacterias son los microorganismos principales en la digestión retículo-rumen, ya que este se encuentra distribuido en diferentes proporciones; el 25 % de las bacterias se encuentran en la fase líquida del rumen, el 70% adherida a las partículas en suspensión y un 5% adherida a los protozoos o a la pared ruminal.(M-Kamande, 2006), y se clasifican por su forma (cocos, bacilos y espiral)(figura 1) o afinidad por el sustrato(Valdez-Sepúlveda, 2010) y de acuerdo a su tamaño (generalmente de 0,3 a 50 μ m), así como también de acuerdo a sus diferentes estructuras.

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).



Figura 1. Clasificación morfológica de las bacterias (Valdez-Sepúlveda 2010)

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

Cuadro 1. Clasificación de bacterias ruminales según su afinidad por el tipo de sustrato.

GRUPO DE BACTERIAS RUMINALES DE ACUERDO AL SUSTRATO	
Pectinolíticas	Hemicelulolíticas
Butyrivibrio fibrisolvens	Butyrivibrio fibrisolvens
Bacterioides ruminicola	Bacterioides ruminicola
Lachnospira multiparus	Ruminococcus spp.
Treponema bryantii	
Streptococcus bovis	
Succinivibrio dextrinosolvens	
Ureolíticas	Amilolíticas
Succinivibrio dextrinosolvens	Bacterioides amylophilus
Selenomonas spp	Streptococcus Bovis
Bacterioides ruminicola	Succinimonas amyolytica
Ruminococcus bromii	Bacteroides ruminicola
Butyrivibrio spp	
Treponema spp	
Que utilizan azúcares	Que producen metano
Treponema bryantii	Methanobrevibacter ruminantium
Lactobacillus vitulinus	Methanobacterium formicicum
Lactobacillus ruminus	Methanomicrobium mobile
Proteolíticas species	Que utilizan ácidos
Bacterioides amylophilus	Megasphaera eisdenii
Bacterioides ruminicola	Selenomonas ruminantium
Butyrivibrio fibrisolvens	
Streptococcus bovis	Celulolíticas
Que producen amoníaco	Bacterioides succinogenes
Bacterioides ruminicola	Ruminococcus flavefaciens
Megasphaera eisdenii	Ruminococcus albus
Selecnomonas ruminantium	Butyrivibrio fibrisolvens

2.1.3.1 Bacterias Celulolíticas: son las que hidrolizan la celulosa y metabolizan los azúcares solubles producidos, para poder producir celulasa, la cual es una enzima extracelular capaz de hidrolizar los enlaces β de la celulosa. Son las bacterias más importantes en el rumen y las especies más importantes que degradan la celulosa son: *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Bacteroides succinogenes* y *Butyrivibrio fibrisolvens*. Bajo determinadas condiciones especies tales como *Eubacterium cellulosolvens* puede constituir la bacteria celulolítica más importante en el rumen (Blanco, 1999).

2.1.3.2 Bacterias Hemicelulolíticas: son las bacterias capaces de degradar, utilizar con eficiencia a la hemicelulosa, y las principales bacterias son: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola* y *Ruminococcus spp* (Blanco, 1999).

2.1.3.3 Bacterias Pectinolíticas: son bacterias que degradan la pectina y las principales en el rumen son: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola* y *Lachnospira multiparus*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Treponema spp.* y *Streptococcus bovis* (Blanco, 1999).

2.1.3.4 Bacterias Amilolíticas: estas bacterias suelen predominar en el rumen cuando se consume una dieta rica en almidón ya que esta utiliza los almidones como sustrato debido a que posee una amilasa extracelular que parte al azar la cadena de α del almidón produciendo maltosa (Blanco, 1999).

2.1.3.5 Bacterias Utilizan azúcares: estas aparecen cuando se consume una dieta rica en cereales o forrajes jugosos que contienen elevadas concentraciones de azúcares. Son todas aquellas bacterias del rumen que degradan carbohidratos complejos y son capaces de fermentar algunos azúcares simples. Dentro de las cuales encontramos a *R. flavefaciens* puede fermentar la glucosa, *Treponema bryantii* se asocia a especies celulolíticas del rumen y estas espiroquetas utilizan algunos de los azúcares y celulo-dextrinas que se liberan durante la degradación de la celulosa. *Lactobacillus vitulinus* y *L.ruminus*, se han identificado como fermentadores de azúcar en el rumen (Blanco, 1999).

2.1.3.6 Bacterias Utilizan ácidos: estas bacterias realizan la fermentación secundaria de los productos finales de otras bacterias, los ácidos que se incluyen son lactato (es fermentado a acetato, propionato y á. grasos de cadena larga por bacterias *Metagasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium*), succinato (producto final de bacterias como las celulolíticas y es convertido en propionato y CO₂ por *S. Ruminantium*, *Veillonella alcalescens*, *Anaerovibrio lipolytica* y *Propionibacteria.*) y metanoato (es usado como precursor para la producción de metano por *Methanobrevibacter ruminantium*) (Blanco, 1999).

2.1.3.7 Bacterias Proteolíticas: estas bacterias disponen de exopeptidasas para descomponer oligopeptidos hasta aminoácidos y péptidos de cadena más corta. Producen enzimas hidrolíticas que rompen enlaces. Las principales bacterias en el rumen son: *Bacteroides amylophilus*, *B. ruminicola*, algunas cepas de *Butyrvibrio fibrisolvens* y *Streptococcus bovis*(Blanco, 1999).

2.1.3.8 Bacterias Productoras de amoniaco: dichas bacterias producen amoniaco mediante la desaminación de aminoácidos y es realizada por las principales bacterias en el rumen responsables de dicho proceso las cuales son: *Bacteroides ruminicola*, *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium* y unas pocas especies de *Butyrvibrio*(Blanco 1999).

2.1.3.9 Bacterias Lipolíticas: estas bacterias se encargan de metabolizar activamente a los lípidos y dicha función es realizada por bacterias como: *Anaerovibrio lipolytica* hidroliza triglicéridos y fosfolípidos para liberar glicerina y tres ácidos grasos. La lipasa esta bacteria es extracelular y va unida a la membrana. *Galactolípidos*, *fosfolípidos* y *sulfolípido*, son hidrolizados por un *Butyrvibrio spp*(Blanco, 1999).

2.1.3.10 Bacterias Productoras de metano: estas bacterias regulan la fermentación total al eliminar H₂ gaseoso. La reducción del CO₂ con H₂gaseoso es el método primario por lo que se produce CH₄ en el rumen. Las bacterias más importantes son: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicum* y *Methanomicrobium mobile*(Blanco, 1999).

2.1.4 Protozoarios

La población de protozoarios en el rumen es menor a la de las bacterias, encontrándose en concentraciones de 1 millón por ml de contenido ruminal. Aproximadamente el número de protozoos n es de unos 10^4 a 10^6 células/ml de contenido ruminal. Todos los protozoos son anaerobios estrictos (Blanco, 1999).

La mayoría de las especies son ciliados y flagelados (figura 2). Los ciliados pertenecen a la familia *Isotrichidae* (géneros *Isotricha* y *Dasytricha* son prevalentes) y a la familia *Ophryoscolecidae* (géneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium* y *Ophryoscolex* son prevalentes). Los protozoos no pueden sintetizar proteínas a partir de N no proteico, tampoco pueden degradar la celulosa (Blanco 1999), pero si consumen y metabolizan azúcares solubles, hidrolizan bacterias para utilizarlas como sustrato logrando con esto limitar el crecimiento bacteriano. La principal función de dichos microorganismos es su capacidad para frenar la digestión de los sustratos que se fermentan con rapidez, como el almidón y algunas proteínas. Esto es posible ya que los protozoarios engloban al almidón y a las proteínas almacenándolos y protegiéndolos de la acción bacteriana. Contribuyen a la digestión de fibra (Nava-Cuéllar, 2001).

La clasificación de los protozoarios ruminales también se basa en su morfología y su afinidad al sustrato que degradan (ejemplo: localización de cilios, celulolíticas, amilolíticas, proteolíticos) (Valdez-Sepúlveda, 2010).

2.1.4.1 Protozoos Ciliados: Son muy versátiles en su capacidad para degradar y fermentar una amplia gama de sustratos. Ingieren las partículas de los alimentos y atacan a la totalidad de los principales componentes de los vegetales, incluyendo celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón, azúcares solubles y lípidos (Blanco, 1999).



Figura 2. Protozoo ciliado proveniente del rumen bovino.

2.1.5 Hongos

Los hongos que se encuentran en el rumen tienen la capacidad de fermentar polisacáridos (celulosa), calculándose que más del 8% de la biomasa microbiana del rumen está constituida por estos (Nava-Cuellar, 2001).

2.2 Enzima Celulasa

2.2.1 Generalidades de las enzimas

Las enzimas son catalizadores de origen proteico producido por los microorganismos vivos, actúan como catalizadores biológicos llevando a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades, no se consumen durante la reacción. Cada reacción que se lleva a cabo en la célula es catalizada por una enzima en particular, es por esto que en una célula se encuentran un gran número de enzimas. Por ser catalizadores son responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos. Aceleran las reacciones bioquímicas en relación con reacciones no catalizadas a temperaturas alrededor de 37 ° C (Rodríguez, 1999).

Por su naturaleza proteica las enzimas tienen una estructura tridimensional globular y solo presentan actividad cuando tienen una

conformación espacial que permite establecer una disposición óptima de los aminoácidos de su centro activo o sitio catalítico.

Para la hacer notables a las enzimas se toman en cuenta tres características principales sobre otros catalizadores (Rodríguez, 1999).

2.2.2 Poder catalítico

La velocidad catalítica se lleva a cabo más rápidamente y a temperaturas más bajas, cuando en la reacción catalizada se utiliza una enzima. Debido a su naturaleza proteica, la actividad catalítica de las enzimas depende del pH y de la temperatura de reacción. La eficiencia catalítica de las enzimas es muy alta a bajas temperaturas (Rodríguez, 1999).

2.2.3 Especificidad

Las enzimas son específicas tanto en la naturaleza del sustrato que utilizan, como en la reacción que catalizan. Esto les permite modificar selectivamente componentes alimentarios individuales sin afectar a otros. Esta propiedad las hace muy diferentes a muchos catalizadores no biológicos (Rodríguez, 1999).

2.2.4 Actividad catalítica

En las enzimas su actividad catalítica puede ser regulada por pequeños iones u otras moléculas (Rodríguez, 1999).

2.2.5 Factores que afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas

2.2.5.1 Efecto del pH

La actividad de las enzimas depende de la concentración de iones de hidrogeno del medio, ya que esto afecta el grado de ionización de los aminoácidos de la proteína ya que influye su en la estructura tridimensional. El rango de pH es estrecho para que se presente una actividad óptima (Badui, 2006).

2.2.5.2 Efecto de la temperatura

La velocidad de las reacciones se incrementa con la temperatura, al aumentar la energía cinética de las moléculas, donde la enzima es estable y retiene una capacidad catalítica. Cada enzima tiene un intervalo óptimo de temperatura en el cual se logra la mayor actividad, la mayoría está entre 30 ° C y 45 ° C y se inactivan a más de 60 ° C (Badui, 2006).

2.2.5.3 Efecto de la concentración del sustrato

Las enzimas son más eficientes cuando las concentraciones de sustrato son excesivas en relación con las concentraciones de las enzimas. Donde el producto se obtiene a la máxima velocidad para la cantidad de enzima presente (Badui, 2006).

2.2.5.4 Efecto de la actividad del agua

La actividad acuosa de las enzimas depende del tipo de enzimas, en función sus necesidades (Badui, 2006).

2.2.6 Nomenclatura y Clasificación

En general se ha nombrado a las enzimas de manera empírica y poco sistemática, ya que en algunos casos se han tomado como raíz del nombre el del sustrato que reconoce o actúa la enzima y se le agrega el sufijo "asa". Sin embargo, no todos los nombres dados a las enzimas siguen esta regla. Es por esto que se les asignaron un nombre sistemático, donde cada enzima se le asigna una serie de cuatro dígitos, al que se ha llamado número de la EC (Enzyme Commission):

- Primer dígito: tipo de reacción química que cataliza (con valores del 1-6).
- Segundo dígito: subclase de enzima (tipo de sustrato o enlace que rompe).
- Tercer dígito: sustrato que utiliza la enzima.
- Cuarto dígito: número serial de la enzima en el grupo correspondiente.

Cabe señalar que el sistema de nomenclatura y clasificación de enzimas se basa solo en la reacción catalizada y no toma en cuenta el origen de la enzima (Badui, 2006).

Los principales grupos de enzimas son seis:

1. Oxidorreductasas: catalizan reacciones de oxidorreducción (deshidrogenasas, oxidasas, oxigenasas y peroxidasas).

2. Transferasas: promueven la transferencia de distintos grupos químicos entre una molécula donadora y una aceptora (glicosil Transferasas, amino Transferasas y fosfo Transferasas).

3. Hidrolasas: rompen los enlaces covalentes con la introducción de una molécula de agua. Las enzimas hidrolíticas (amilasas, esterasas, glicosidasas, lipasas y proteasas).

4. Liasas: rompen enlaces para eliminar un determinado grupo químico del sustrato y forman dobles ligaduras sin la introducción de moléculas de agua (aldolasas, descarboxilasas, deshidratasas y pectina liasa).

5. Isomerasas: catalizan el arreglo espacial de grupos del sustrato sin modificar su composición química (epimerasas, racemasas).

6. Ligasas: promueve la unión covalente de dos moléculas acopladas con la ruptura de un enlace pirofosfato proveniente de ATP, UTP o CTP, como fuente de energía.

Los seis grupos de enzimas indicados corresponden a reacciones importantes en el metabolismo celular.

Dentro de la estructura y características de las proteínas son imprescindibles para una correcta utilización y manipulación de los alimentos. A partir de los veinte aminoácidos naturales, se podrían sintetizar un número infinito de proteínas.

2.2.7 Uso industrial de las enzimas

Hoy en día las aplicaciones comerciales de las enzimas ya están en todo el planeta (Viniestra 1999). El uso de enzimas para la producción de alimentos se remota a muchos siglos atrás. En la antigüedad muchos pueblos utilizaban las hojas de ciertas plantas para envolver carne, lo que facilitaba la acción de proteasas vegetales (papaína, bromelina y ficina) sobre las proteínas del tejido animal, provocando su ablandamiento. Muchos otros utilizaban el estómago de corderos y becerros como recipiente, causando la coagulación de la leche con enzimas asociadas a este órgano (proteasas principalmente quimosina), debido a que actúa sobre la caseína de la leche (Badui, 2006).

En el sector alimentario, el interés actual de la aplicación de enzimas en procesos de tecnología enzimática la cual se enfoca (Badui, 2006):

- ✓ Conservación de alimentos o de sus componentes (ej: vitaminas).
- ✓ Uso más eficiente de materias primas.
- ✓ Mejoramiento de la calidad sensorial de los alimentos (textura y sabor).
- ✓ El uso de enzimas en medios acuosos para la producción de compuestos quirales y síntesis de polímeros especiales.
- ✓ Síntesis de edulcorantes (aspartano), empleando la reacción inversa de una proteasa.
- ✓ El diseño de enzimas “a la medida” de acuerdo a los requerimientos del proceso ingeniería de proteínas y evolución dirigida, logrando modificar su estabilidad genética.
- ✓ Producción de ciclodextrinas a partir de almidón.
- ✓ Aplicación de enzimas o de células inmovilizadas en la producción de materias primas de aplicación en alimentos, como la producción de jarabes fructosados, trehalosa, isomaltulosa, ácido fumarico, ácido aspártico o alanina.
- ✓ En la producción de malta a partir de la cebada.
- ✓ Producción de edulcorantes utilizando enzimas amilolíticas en la fabricación de diferentes derivados del almidón.

- ✓ En la extracción de aceites esenciales.
- ✓ Ablandar los tejidos celulolíticos de verduras y frutas y ayudar la rehidratación de diversos productos.
- ✓ Utilización de inulina para la producción de fructosa.
- ✓ El ablandamiento de carne (proteasas).
- ✓ Evitar la cristalización de la lactosa para evitar la textura arenosa (enzima lactasa).
- ✓ Aumentar la extensibilidad de la masa, mejorar la textura, miga y volumen del pan (enzima proteasa).
- ✓ Producción de sabores (lipasas).
- ✓ Evitar oxidación y oscurecimiento en una gran variedad de productos al utilizar enzimas como glucosa oxidasa y catalasa.

El empleo de las enzimas tienen muchas ventajas ya que son muy específicas en su manera de actuar, por lo que no propician reacciones secundarias indeseables, también funcionan en condiciones moderadas de temperatura, de pH y no requieren de condiciones de procesamiento drásticas que puedan alterar la naturaleza del alimento, ni de equipo muy costoso, estas actúan en muy bajas concentraciones, entre 10^{-8} y 10^{-6} , y aspectos como su velocidad puede ser controlada al ajustar el pH, la temperatura y la concentración de enzima. Finalmente también son fácilmente activadas una vez alcanzando el grado de transformación deseado (Badui, 2006).

2.3 Celulosa

La celulosa es una fibra vegetal extraída principalmente de los árboles y formando parte de sus paredes celulares; debido a esto es un material fibroso insoluble, formando por residuos lineales de glucosa unidos mediante enlaces glucosídicos β - (1 \rightarrow 4) (figura 4). La cadena polimérica de celulosa, debido a los enlaces ecuatoriales, es recta y por tanto tiende a formar cristales. Sus moléculas se mantienen unidas por puentes de hidrogeno y otras fuerzas no

covalentes pueden contener hasta 10.000 residuos de glucosa (Robinson, 1991).

La celulosa es un homopolisacarido lineal ya que se encuentra formado por unidades de β - glucopiranosas. Su peso moléculas llega hacer de hasta varios millones, tiene una alta resistencia mecánica y química debido a sus cadenas paralelas las cuales se alinian sobre un eje longitudinal y estableciendo con ello un gran número de puentes (H_2) intermoleculares dando origen a las fibrillas altamente estructurales figura 3 (Badui, 2006).

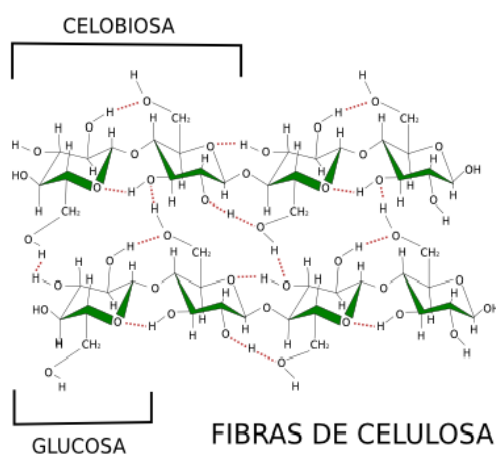


Figura 3. Microfibrillas estructurales de celulosa

2.3.1 Estructura de la celulosa

La celulosa se forma por la unión de moléculas de por unidades de β - glucopiranosas, unidos mediante enlaces glucosídicos β - (1 \rightarrow 4) (figura 4).

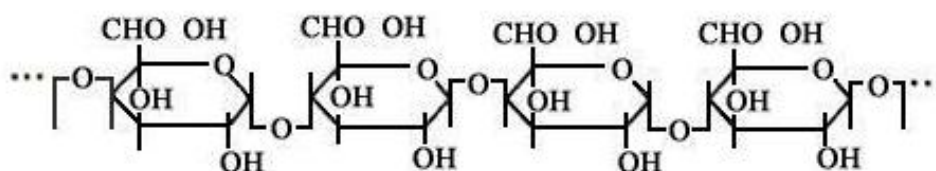


Figura 4. Estructura de la celulosa unidos por enlaces glucosídicos

La configuración β le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, la cuales no se presentan aisladas si no unidas mediante enlaces de hidrogeno intermolecular formado por una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis (Mata-cruz, 2011). Donde las cristalinas se producen cuando las moléculas se enlazan con un alto grado de ordenación, y reaccionan más lentamente con los ácidos, mientras que las amorfas no tienen un orden (figura 5) (Badui, 2006).

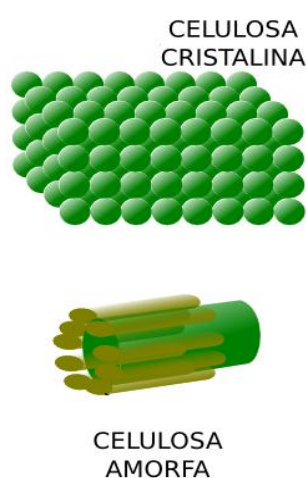


Figura 5. Celulosa amorfa y cristalina

2.3.2 Función de la celulosa

La celulosa es un polisacárido estructural en las plantas ya que forma parte de los tejidos de sostén (Valdez-Sepúlveda, 2010). En las plantas está formado por fibrillas lineales de 3.5 nm de diámetro que contienen aproximadamente treinta y seis cadenas de β -D-glucano.

La celulosa no puede ser hidrolizada por el hombre ya que no cuenta con las enzimas necesarias para su digestión al romper los enlaces β -1,4-glucosídicos., pero para el organismo humano, la celulosa es parte de la fibra cruda, por lo que se elimina en las heces sin a ver sido aprovechada, es por

esto que le sirven al hombre a facilitar su digestión y prevenir malos gases (Badui, 2006).

Mientras que los herbívoros son los únicos capaces de aprovechar la celulosa en su metabolismo, ya que cuenta con las correspondientes enzimas capaces de aprovechar la celulosa en el tracto gastrointestinal (Badui, 2006).

2.3.3 Hidrólisis de la celulosa

La hidrólisis de la celulosa a residuos de D-glucosa la cual puede ser por vía química donde se utilizan ácidos como el sulfúrico y el clorhídrico a una temperatura de más de 125 ° C (Badui, 2006). Más sin embargo la hidrólisis química está limitada por el bajo rendimiento de glucosa y se obtienen muchos productos de degradación del monosacárido no deseados, teniendo una necesidad de energía elevada (Robinson, 1991).

Para la hidrólisis por método físico se necesita mucha energía, donde se incluye la molienda con molinos de bolas, la molienda húmeda y el proceso con vapor (Badui, 2006).

También se han desarrollado métodos enzimáticos aprovechando las células extracelulares que sintetizan ciertos microorganismos (Badui, 2006). Donde la hidrólisis puede ser catalizada por celulasas donde se incrementa la susceptibilidad del sustrato y la mayoría de estas celulasas catalizan la hidrólisis de derivados químicos de la celulosa (carboximetilcelulosa) (Badui, 2006).

Primero se hidrolizan las regiones amorfas y posteriormente a un que de forma más lenta se hidrolizan las regiones cristalinas (Robinson, 1991), donde se liberan pequeños paquetes de fibras de microcelulosa, haciendo que el producto resultante no sea fibroso y con una alta capacidad de absorción de agua. Cuando se da el rompimiento de los enlaces covalentes de la cadena de

celulosa en las superficies cristalinas se dejan las fibrillas de celulosa más accesibles a las celulasas, esto ocurre principalmente cuando la hidrólisis se da por métodos enzimáticos (Badui, 2006).

2.3.4 Enzimas utilizadas en la degradación de celulosa

Para la degradación total de la celulosa se necesita varias enzimas que actúan secuencialmente o de manera sinérgica (Robinson, 1991). Que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa (Mata-cruz, 2011). Donde las más conocidas son la endo- y exoglucanasas, que producen el disacárido celobiosa y glucosa.

La endoglucanasa (1, 4- β - D-glucan-glucanohidrolasa (EC 3. 2. 1. 4)) actúa al azar en las cadenas β -glucano de la celulosa (Robinson, 1991). Estas son relativamente inactivas frente a regiones cristalinas del algodón y del avicel, pero hidrolizan las regiones amorfas de estos sustratos, incluyendo al papel filtro, y los sustratos solubles, como la carboximetilcelulosa y la hidroximetilcelulosa (Velásquez-Luna, 2011).

Las exoglucanasas (β - 1, 4-glucancelobiohidrolasa) producen celobiosa y glucosa al catalizar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos terminales no reductores (Robinson, 1991). Degradan la celulosa amorfa por eliminación cuantitativa de celobiosa de los extremos no reductores de la celulosa.

Cuando son puros son poco activos sobre el algodón pero si hidrolizan al avicel (celulosa microcristalina). La velocidad de disminución de la viscosidad con relación al aumento en grupos reductores es mucho menor que en las endoglucanasas y las celobiohidrolasas muestran sinérgico en la hidrólisis de la celulosa cristalina, por razones no muy claras (Velásquez-Luna, 2011).

β - 1, 4-glucangluco-hidrolasa, estas hidrolizan consecutivamente las unidades de glucosa del extremo no reductor de las celodextrinas. Su velocidad

de hidrólisis disminuye a medida que disminuye la longitud de la cadena de sustrato (Velásquez-Luna, 2011).

β - glucosidasa (β - D-glucosido-glucohidrolasas (EC 3. 2.1. 21)). Hidrolizan la celobiosa a glucosa eliminándola del extremo no reductor de celodextrinas pequeñas. La velocidad de la hidrólisis de la β - glucosidasa aumenta a medida que el tamaño del sustrato disminuye, siendo la celobiosa el sustrato que más rápidamente se hidroliza (Velásquez-Luna, 2011).

Sin embargo se obtiene una eficiencia máxima cuando el extracto contiene las enzimas trabajando de manera conjunta o cuando se recombinan las enzimas separados (Robinson, 1991). Los sistemas enzimáticos son divididos en agregativos y no agregativos.

2.3.5 Sistemas agregativos

Dentro de las bacterias que degradan la celulosa, la literatura menciona a las *Cellulomonas thermocellum* y *C. cellulovorans*, las enzimas que participan en la degradación se encuentran localizadas en la superficie de estas bacterias formando complejos multienzimáticos de alto peso molecular, conocido como "celulosoma", los cuales contienen al menos 14 polipeptidos distintos incluyendo varias celulasas y xilasas y al menos una β -glucosidasa, unidos a una proteína sin actividad enzimática, con participación en el reconocimiento de las fibras de celulosa a la superficie de la célula. La proteína de unión a celulosa (CbpA: cellulose binding protein A), es necesaria, ya que junto con las enzimas hidrolíticas, puedan romper las estructuras amorfas de la celulosa pero no las formas cristalinas del polímero (Martínez-Huerta, 2011).

2.3.6 Sistemas no agregativos

Estos sistemas están compuestos por tres tipos de enzimas endoglucanasas, las cuales descomponen los enlaces β - 1,4 y así altera la

estructura cristalina de la celulosa, exponiendo las cadenas pilosacáridas de celulosa individual. Las exoglucanasas parten de 2 o 4 unidades de glucosa desde los extremos de las cadenas expuestas producidas por la endoglucanasas, produciendo tetrasacáridos o disacáridos como celobiosa. Finalmente la celobiosa hidroliza estos productos, obteniendo los monosacáridos individuales de glucosa.

2.3.7 Microorganismos que degradan la celulosa

Los microorganismos celulolíticos (degradan la celulosa), son importantes ya que tienen un papel importante en la biosfera reciclando dicho polímero. Hay una diversidad de estos microorganismos, bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos, que producen las enzimas celulasas.

Las bacterias celulolíticas son del género *bacillus* las cuales presentan actividad endo- β -1,4-glucanasa y exo- β -1,4-glucanasa, una característica particular de la *bacillus subtilis* es la resistencia a ser inhibida por la propia glucosa o celobiosa que producen.

Los microorganismos como los termófilos, producen enzimas celulolíticas termoestables porque son estables en condiciones severas de temperatura (90 ° C), en pH ácidos o alcalinos.

Dentro del grupo de los hongos fimentosos, el *Trichoderma reesei*, tiene una efectividad en la degradación de la celulosa nativa y cristalina, mediante su complejo celulolítico donde presentan las actividades necesarias para la hidrólisis de la celulosa (endo y exoglucanasas y β -glucosidasa) (Martínez-Huerta, 2011).

2.3.8 Usos de celulosa en interés la industria alimentaria

La celulosa presenta propiedades funcionales de interés en la industria de los alimentos, actúa como aglutinante, espesante y estabilizante, también forma películas resistentes. Se utiliza en tortillas de maíz por su habilidad de retener agua, en la elaboración de jugos y néctares, rellenos de pie, productos de panificación, como sustituto de grasa, en productos lácteos (helados), salsas, aderezos y productos elaborados a base de jitomate (Badui, 2006).

2.4 Enzima Celulasa

Las celulasas son un sistema complejo de enzimas que hidrolizan las uniones β -(1,4) de los glucanos y se encuentra en la naturaleza en microorganismos que atacan a las plantas, así como en el sistema digestivo de animales herbívoros.

Las Preparaciones comerciales provienen principalmente de *Trichoderma reesei* y de *A. niger* (Badui, 2006). Siendo una mezcla de diferentes componentes enzimáticos, forma un complejo enzimático (formado por tres enzimas: endo y exoglucanasas, y β -glucosidasa) (figura 6), la cual actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa (Velázquez-Luna, 2011).

Es una enzima compleja, la cual su función es degradar la celulosa y consta de dos unidades importantes como mínimo: C-1, que rompen los enlaces de hidrógeno, liberando cadenas de glucosa susceptibles a una posterior hidrólisis, y C-X, que hidroliza estas cadenas hasta celobiosa y glucosa. Las células parecen diferir en su capacidad para abstrer el factor hidrolítico (Velázquez-Luna, 2011).

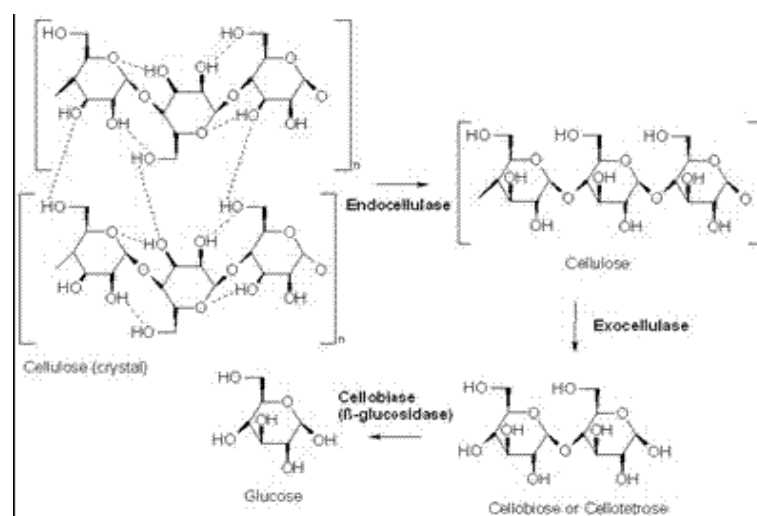


Figura 6. Complejo enzimático que forma a las celulasas

2.4.1 Usos industriales

Este grupo de enzimas se usan en forma limitada para mejorar la extracción de aceites esenciales, ablandar los tejidos celulósicos de verduras, frutas y para ayudar a la rehidratación de diversos productos. Facilitan el proceso de descascarillado en los granos del café y en la producción del mosto en la cerveza también en la vinificación, donde la eliminación de los β -glucanos facilitan los procesos de filtración o clarificación (Badui, 2006).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización del área de estudio

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio del Departamento de Producción Animal de la UAAAN, específicamente en el laboratorio de Microbiología agropecuaria. El cual se dividió en IV etapas, mismas que a continuación se describen:

3.1.1 Material biológico

Se utilizaron cepas de microorganismos (de las vacas del establo de la UAAAN) tomados de cultivos puros aislados e identificados por Herrera-Palacios, Martínez-Huerta y Velázquez-Luna (2011).

ETAPA I: Aislamiento de microorganismos bacterianos en medio de cultivo para anaerobios agar-Schaedler (AS).

3.2 Preparación del medio

Se diluyeron 41.9 g de agar, en 100 ml de agua destilada, agitando de forma uniforme para homogeneizar la solución, para luego ser solubilizado (se hierve a flama de mechero hasta alcanzar el color adecuado (cristalino)) y se Esterilizo en una auto clave (121 °C-15 lb-15 min). Se vaciaron 15-20 ml de AS en las cajas Petri y se guardaron a 4° C hasta su uso posterior.

La preparación del medio se realizó según lo establecido en base a la demanda de la investigación, de esta manera también se realizaron los cálculos para cada vez que se fuera a preparar el medio.

3.2.1 Siembra en medio sólido

Posteriormente se realizaron siembras en cajas Petri estériles, con la ayuda de una asa Bacteriológica, por el método de estría abierta cruzada sobre el AS cerca del mechero como se muestra en la figura 7, posteriormente se

incubaron de 37°C-40°C en condiciones anaerobias (en frascos con inyección de CO₂). El tiempo de incubación dependió del tiempo en que se fue observando crecimiento uniforme de los microorganismos, la revisión se llevó acabo cada 24 horas.



Figura 7. Siembra del microorganismo en estría abierta cruzada

3.2.2 Caracterización macroscópica

Una vez que se obtuvo el cultivo puro con crecimiento homogéneo se caracterizó mediante forma, color, tamaño, bordes, elevación, etc.

3.2.3 Caracterización microscópica

La identificación microscópica se llevó a cabo mediante la tinción de Gram, la cual es una técnica de coloración de contraste o diferencial, que se desarrolló en 1844 y se utiliza en microbiología para la observación de las bacterias, las cuales, con base en la reacción que tengan las paredes de los microorganismos a los colorantes usados con esta técnica, se les califica en Gram positivos y Gram negativos; considerándose bacterias Gram positivas a las bacterias que se aprecian en color violeta y en color rosa bacterias a las Gram negativas, otra ventaja es que se puede efectuar una percepción primordial a las diferencias entre bacterias, por su morfología (cocos, bacilos y espirilos).

Esta técnica de coloración de contraste fue descubierta por Hans Christian Gram en 1884. Es de considerarse que la reacción de Gram no es infalible ni constante; puede variar con el tiempo del cultivo y el pH del medio, y quizá por otras causas.

El fundamento de la técnica se hace con base en las diferencias entre las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

De acuerdo a esto se realizaron los frotis necesarios de las cepas en estudio (obtenidas del líquido ruminal de los bovinos de la UAAAN), dejando secar al aire cerca del mechero. Posteriormente se fijó el frotis al calor del mechero y siguiendo las instrucciones de la tinción de Gram se cubrió la muestra con cristal violeta, se dejó actuar durante 1 minuto, después del tiempo se enjuagó con agua destilada para escurrir el colorante. Se cubrió el frotis con lugol y se dejó actuar durante 1 minuto, se cubrió el colorante y se lavó con agua. Posteriormente se decoloró con alcohol aproximadamente por unos 5 segundos siguiendo las instrucciones hasta que el colorante se quitó, se cubrió el frotis con safranina dejándolo actuar por 1 minuto dejándolo que se cubriera todo el frotis para luego enjuagarlo con agua destilada, dejándolo secar al aire cerca del mechero, y para finalizar se llevaron los frotis a ser observados en el microscopio a 100 X con la utilización del aceite de inmersión (figura 8).



Figura 8. Frotis de la tinción de Gram

ETAPA II: Purificación y mantenimiento de las cepas obtenidas.

3.3 Purificación de los microorganismos aislados

Aislar es separar un tipo de microorganismo a partir de una población que los contiene de varios tipos. De esta forma se tomó la colonia seleccionada con el asa Bacteriológica calibrada (calentada al rojo vivo y enfriada antes de tomar la muestra, cada vez que se estrío) para lograr la separación de las colonias de manera más segura y efectiva, se realizaron resiembras por el método de estría abierta cruzada sobre el AS, posteriormente se incubó a una temperatura de 37°C – 40°C, en condiciones anaerobias por 96 h o hasta observar crecimiento homogéneo (revisando crecimiento cada 24 horas).

Las colonias que se obtuvieron una vez que el microorganismo se adaptó, se purificaron y se mantuvieron en tubos para cultivo en AS con pico de flauta y mantenidas a 4°C bajo condiciones anaeróbicas. Con cada colonia pura obtenida fue identificada con un código de la muestra de la que fue aislada, el medio en el que se desarrolla y un número de secuencia.

ETAPA III: Empleo de un microorganismo bacteriano para la producción de una enzima de interés industrial en alimentos, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor.

3.4. Ensayo (Screening)

Se eligieron 6 cultivos puros en cajas Petri y se sometieron a un screening para verificar la degradación de celulosa empleándola como única fuente de carbono papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa (figura 9).



Figura 9. Cajas Petri conteniendo cultivos puros para el Screening

3.4.1 Medio específico sólido

Se prepararon tres medios diferentes específicos para la degradación de celulosa (cuadro 2) empleando tres fuentes de carbono; las cuales fueron solubilizadas junto con el medio mineral (agar bacteriológico, NaCl, NaNO₃, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄ en 100 mL de agua destilada). Los componentes del medio mineral (cuadro 2) fueron homogeneizados y esterilizados a 121° C por 15 minutos a 1 atm de presión. Posteriormente el medio fue vaciado en cajas Petri (figura 10) y se sembró cada uno de los cultivos puros por el método de estría abierta cruzada y se incubó de 37°C- 40°C en condiciones anaerobiosis.

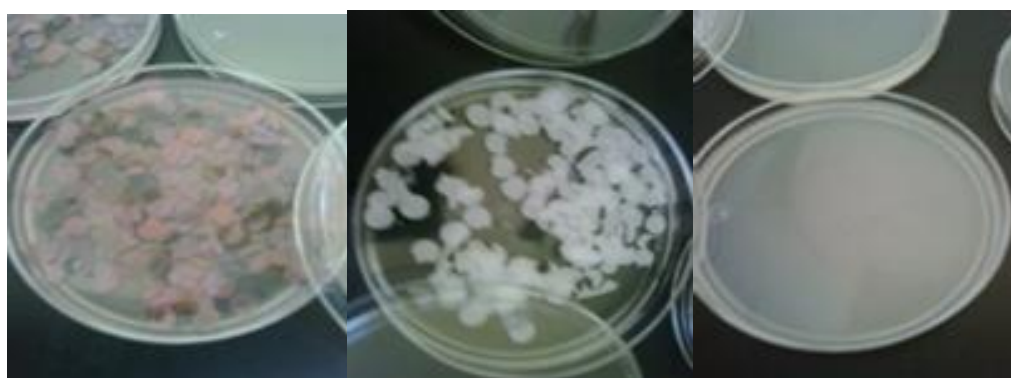


Figura 10. Medios sólidos seleccionados y vaciados en cajas Petri

Cuadro 2. Componentes del medio de cultivo sólido para la producción de la enzima celulasa.

Componente	Cantidad %
Agar Bacteriológico	2
NaCl	0.5
NaNO₃	0.3
KCl	0.5
Fuente de C:	
1. Papel Periódico.	
2. Papel Filtro	1
(comercial de laboratorio)	
3. Carboximetil celulasa de Sodio (Golden Bell).	
KH₂PO₄	0.2
MgSO₄	0.01

3.4.2 Caracterización macroscópica

Una vez identificadas todas las características del cultivo se llevó a cabo la descripción de cada una de las colonias puras obtenidas (figura 11), tomando en cuenta su forma, tamaño, color, borde, etc.



Figura 11. Representación de una colonia pura obtenida del líquido ruminal

3.4.3 Caracterización microscópica

Para llevar a cabo la descripción microscópica de la colonia pura obtenida se recurrió al método de la tinción de Gram (figura 8) y Para posteriormente realizar la descripción microscópica de manera detallada.

3.4.4 Curva de crecimiento

Se llevó a cabo mediante la técnica de turbidimetría a tiempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 horas. Tomando alícuotas de cada tiempo las cuales fueron leídas a 590 nm, en el espectrofotómetro (GENESYS 20) para poder medir la absorbancia y determinar la curva de crecimiento de los microorganismos.

3.4.5 Producción de la enzima celulasa

3.4.6 Inducción de la actividad celulasa en medio líquido específico

Se seleccionó y tomó el cultivo puro (cepa cuatro) en base a su crecimiento homogéneo en un tiempo corto (48 h).

Una vez identificado el cultivo se realizó una inducción en tres medios específicos empleando como única fuente de carbono papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa, para la producción de la enzima celulasa.

Preparación del medio líquido inductor 1: en un matraz Erlenmeyer se disolvieron 100 mL de agua destilada (cuadro 3), adicionada con la fuente de carbono seleccionado (**papel periódico**); posteriormente se solubilizaron y esterilizaron, cuando el medio se encontraba a temperatura ambiente se sembró el cultivo puro seleccionado, con la ayuda del asa bacteriológica tomando un volumen pequeño de la cepa. Posteriormente se realizó anaerobiosis, y se monitoreó la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 horas. Cada muestra se corrió por duplicado, tomándose alícuotas de 1.5 mililitros en tubos eppendorf.

Preparación del medio líquido inductor 2: en un matraz Erlenmeyer se disolvió 100 mL de agua destilada (cuadro 3), adicionada con la fuente de carbono seleccionado (**papel filtro**) posteriormente se solubilizaron y esterilizaron, ya que este se encontraba a temperatura ambiente se sembró el cultivo puro seleccionado, con la ayuda del asa bacteriológica tomando un volumen pequeño de la cepa. Posteriormente se realizó anaerobiosis, y se monitoreó la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 horas. Cada muestra se corrió por duplicado, tomándose el inculo de 1.5 micro litros en tubos eppendorf. Cada muestra se corrió por duplicado, tomándose alícuotas de 1.5 mililitros en tubos eppendorf.

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

Preparación del medio líquido inductor 3: en un matraz Erlenmeyer se disolvió 100 mL de agua destilada (cuadro 3), adicionada con la fuente de carbono seleccionado (**carboximetil celulasa de sodio**) posteriormente se solubilizaron y esterilizaron, ya que este se encontraba a temperatura ambiente se sembró el cultivo puro seleccionado, con la ayuda del asa bacteriológica tomando un volumen pequeño de la cepa. Posteriormente se realizó anaerobiosis, y se monitoreó la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 horas. Cada muestra se corrió por duplicado, tomándose el inóculo de 1.5 micro litros en tubos eppendorf.

Cuadro 3. Componentes del medio líquido específico para la producción de celulasa.

Componente	Cantidad
NaCl	0.5 %
NaNO ₃	0.3 %
KCl	0.5 %
Fuente de C:	
1. Papel Periódico.	
2. Papel Filtro (comercial de laboratorio)	1 %
3. Carboximetil celulasa de Sodio (Golden Bell).	
KH ₂ PO ₄	0.2 %
MgSO ₄	0.01 %

3.4.7 Curva de crecimiento en medio específico

Se tomaron las alícuotas de 1.5 micro litros, obtenidas cada tiempo (0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 horas) con su respectiva repetición. Cada una de las alícuotas tomadas fueron centrifugadas a 10000 rpm para poder separar la biomasa (células) y así obtener el extracto enzimático, las cuales fueron leídas mediante la técnica de turbidez empleando un espectrofotómetro (GENESYS 20) a una longitud de onda de 590 nm.

ETAPA IV: Cinéticas enzimáticas del microorganismo seleccionado empleando el extracto enzimático producido por la cepa.

3.5 Preparación del sustrato específico para la producción de la enzima celulasa.

Se preparó el medio líquido específico para inducir al microorganismo a la producción de celulasa como se menciona en la metodología del punto 3.4.6 (cuadro 4).

Cuadro 4. Componentes del sustrato líquido específico para la producción de celulasa

Componente	Cantidad
NaCl	0.5 %
NaNO ₃	0.3 %
KCl	0.5 %
Fuente de C:	
1. Papel Periódico.	
2. Papel Filtro (comercial de laboratorio)	1 %
3. Carboximetil celulasa de Sodio (Golden Bell).	
KH ₂ PO ₄	0.2 %
MgSO ₄	0.01 %

3.5.1 Cinética enzimática

Se agregaron 200 μ L de los diferentes sustrato: papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa en tubos de ensaye (duplicado) y se colocaron en baño María (Napco Model 210A) a 40° C. Se añadieron 50 μ L de extracto enzimático obtenido a los diferentes tiempos de fermentación, monitoreando a tiempos de reacción de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos (figura 12).



Figura 12. Montaje del equipo para la realización de la cinética enzimática.

3.5.2 Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret.

El producto obtenido de la cinética enzimática se cuantificó mediante la técnica de proteínas totales. Las muestras obtenidas de los diferentes tiempos de fermentación, fueron centrifugadas a 10000 rpm (2 ciclos). El sobrenadante fue separado y empleado como extracto enzimático a diferentes tiempos de fermentación para la determinación de proteína extracelular mediante el método de Biuret.

La técnica consiste en agregar 500 μ L de reactivo Biuret y 25 μ L de extracto enzimático de los diferentes tiempos de fermentación en tubos de ensaye (duplicado), en un baño a una temperatura de 37°C por 30 minutos

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

(incluyendo un blanco y un patrón) posteriormente se agitaron y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm.

Para conocer el efecto de las condiciones de reacción sobre la enzima y el sustrato, se preparó una muestra patrón y una muestra blanco. Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera (cuadro 5):

Blanco:

25 µL de agua destilada + 500 µL de Biuret

Patrón:

25 µL de solución patrón + 500 µL de Biuret

Muestra:

25 µL de extracto enzimático + 500 µL de Biuret

Cuadro 5. Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	150 µL	-----	-----
Sustrato	-----	-----	145 µL
Extracto enzimático	-----	-----	5 µL
Reactivo Biuret	500 µL	500 µL	500 µL
TP	-----	10 µL	-----

Para el análisis de datos se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. de Prot. Tot.} = \frac{A_{\text{muestra}} \times \text{Conc. Patrón}}{A_{\text{patrón}}}$$

A = Absorbancia

3.5.3 Determinación de azúcares reductores (Somogy-Nelson)

3.5.4 Cuantificación de la actividad enzimática:

La cuantificación de los azúcares reductores se siguió mediante la técnica de azúcares reductores se siguió mediante el método propuesto por Somogy 1952, Nelson 1944, la cual sirve para cuantificar azúcares reductores y por esta razón se prepararon los siguientes reactivos:

3.5.5 Reactivo 1 (Somogy):

Solución A: 25 g de carbonato de sodio anhídrido (Na_2CO_3), 25 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ($\text{KNa}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 20 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 200 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) se disolvieron en agua destilada y se aforo a 1 litro.

Solución B: en 200 ml de agua destilada se agregaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) disolver 30 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

El reactivo 1 se preparó mezclando 1 mL de solución en 25 mL de solución A.

3.5.6 Reactivo 2 (Nelson):

Solución A: en 450 ml de agua destilada se disolvió 21 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y 25 g de molibdato de amonio ($(\text{CNH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Solución B: 3 g de arsenito de sodio heptahidratado ($\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se disolvieron en 25 mL de agua destilada.

El reactivo 2 se preparó mezclando lentamente la solución 1 y 2 en agitación y se aforaron a 500 mL. Posteriormente se calentó a 55° C durante 30 min.

Las muestras obtenidas de los diferentes tiempos, fueron centrifugadas a 1,000 rpm, por 10 minutos (2 ciclos). El sobrenadante fue separado y empleado como extracto enzimático a diferentes tiempos de fermentación para la determinación de azúcares reductores.

3.5.7 Cinética Enzimática

El producto obtenido de la cinética enzimática se cuantificó mediante la técnica de azúcares reductores. La metodología empleada para la medición de azúcares reductores fue la siguiente: Se colocaron 250 μ L del reactivo 1 Somogy, para que se incubara en baño de agua hirviendo a 100°C durante 10 minutos, posteriormente se retiró del agua hirviendo y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 250 μ L de reactivo 2 Nelson y se agitó vigorosamente. Se agregaron 4 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente y finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm (figura 13).



Figura 13. Cuantificación de los azúcares reductores desde la cinética hasta la lectura en el espectrofotómetro.

Una unidad de actividad celulosa se define como: la cantidad de azúcares reductores liberados en mg/ml por cada ml de proteína en 1 hora, empleando celulosa al 1%(U).

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

El presente trabajo de investigación realizado en la UAAAN se llevó a cabo en tres etapas para así poder aislar, purificar e inducir a un microorganismo presente en el líquido ruminal de bovino a producir la enzima celulasa de interés industrial. Dichas etapas se describen a continuación.

ETAPA I: Aislamiento preliminar de microorganismos ruminales bacterianos en Agar Schaedler.

4.1 Caracterización macroscópica de las especies bacterianas aisladas en AS

La ingestión de alimento en forma casi continua y las contracciones de las paredes junto con la absorción o pasaje de los metabolitos bacterianos constituyen un continuo reabastecimiento de sustratos que permite el crecimiento de una densa y variada población microbiológica. La mayoría de los microorganismos son bacterias y protozoos ciliados. Hay además levaduras y flagelados. Por lo tanto se trabajó con bacterias del rumen debido a su alto crecimiento poblacional de procariotas. De las que se obtuvieron seis colonias puras las cuales presentaron características como coloración blanca, forma circular, consistencia suave y seca, dichas cajas sembradas en estría abierta cruzada (al realizarse la tinción de Gram mostraron que las colonias identificadas son cocos Gram positivos, dichos resultados coinciden con lo descrito por Mata en el 2010 y se demostró que el microorganismo VML-2 es capaz de producir la enzima celulasa degradadora de nopal (*Opuntia lindheimeri* y *Opuntia robusta*). Esta cepa fue caracterizada de manera macroscópica mediante resiembras en cajas Petri que contenían AS durante 24 hrs. observando que dichas colonias presentan una coloración blanca, forma

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

irregular, elevación convexa, consistencia suave, bacilos cortos Gram negativos, no agrupados. Sin embargo, dicha información obtenida de las características macroscópicas no es suficiente para poder afirmar que microorganismo representa, debido a que existen muchas colonias bacterianas que son pertenecientes a distintos géneros y especies y pueden presentar morfologías macroscópicas similares.

Se observaron las cajas Petri (figura 14) en la que algunas de ellas (Caja # 1, Caja # 2 una la colonia 2) tuvieron un solo crecimiento de una sola colonia, mientras que las demás cajas (Caja # 5, Caja # 2 colonia 1, Caja # 7, Caja # 3) mostraron un crecimiento muy estriado. Esto nos indicó que el crecimiento poblacional fue mucho más grande debido a diferentes condiciones de temperatura ya que la primera colonia se incubó a 37 ° C y las demás a 40° C.



Figura 14. Crecimiento del microorganismo incubado a 40 ° C, la cepa VML-2 obtenida del líquido ruminal.

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulosa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

Cuadro 6. Morfología macroscópica de los microorganismos aislados en Agar Schaedler

Caja # 1 VML-2											
# Colonia	Tamaño	Color	Forma	Elevación	Superficie	Aspecto	Bordes	Luz reflejada	Luz transmitida	Consistencia	# de Repeticiones
1	Grande	Blanco	Circular	Plana	convexa	Seca	Entero	Mate	Opaca	Suave	2
2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Caja # 2 VML-2											
1	Chico	Blanco	Circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	Suave	3
2	Chico	Blanco	Circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	Suave	3
Caja # 3 VML-2											
1	No determinado	Beige	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Liso	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1
2	Chico	Blanco	Circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	suave	4
Caja # 5 VML-2											
1	Chico	Beige	Circular	Plana	Lisa	Seca	Enteros	Mate	Opaca	suave	2
2	No determinado	Rojo claro	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1
3	No determinado	Rojo claro	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1
Caja # 6 VML-2											
1	Chico	Beige	circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	Suave	3
2	Chico	Blanco	Circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	Suave	1
3	No determinado	Rojo claro	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Liso	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1
Caja # 7 VML-2											
1	Chico	Blanco	Circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	Suave	3
2	No determinado	Rojo Claro	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Liso	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1
3	No determinado	Rojo Claro	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Liso	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1
4	Chico	Beige	Circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	Suave	1

En el cuadro 6 se muestra la morfología macroscópica de las células aisladas en AS, donde se consiguió definir morfológicamente 16 colonias y de las cuales se aislaron 6 colonias semejantes; en donde las formas más predominantes de las colonias fueron las circulares. Estos resultados coinciden con lo que Valdez-Sepúlveda y Reyes-Arreozola reportaron en el 2010, ya que fueron registradas seis apariencias posibles para las colonias de cepas para la producción de la celulasa: presentando una morfología macroscópica cocoide con perfecta definición en sus bordes (enteros), en su morfología colonial (macroscópica), con aspecto seco y suave.

En el cuadro 6 también se puede apreciar que 6 cepas presentaron la misma morfología colonial (color blanco, convexas). Comparando las colonias macroscópicamente (cuadro 6 y figura 15) se puede observar que la colonia 1 de la caja # 1, colonias 1 y 2 de la caja # 2, colonia 2 de la caja # 3, colonia 1 de la caja # 5, colonias 1 y 2 de la caja # 6, y las colonias 1 y 4 de la caja # 7, coinciden en todas sus características morfológicas. Esto no nos determina que se trate de la misma cepa. Sin embargo la colonia 1 de la caja # 3, colonias 2 y 3 de la caja # 5, colonia 3 de la caja # 6, y las colonias 2 y 3 de la caja # 7, también presentaron una morfología muy semejante.

En general la mayoría de las colonias sembradas en agar nutritivo son de color blanco, forma circular, aspecto seco, bordes enteros y consistencia suave, lo cual nos habla de una predominancia de ciertas cepas en el contenido ruminal. Esto concuerda con lo descrito por Valdez-Sepúlveda reportado en el 2010.

4.1.1 Caracterización microscópica de las especies bacterianas aisladas en AS

La mayoría de las bacterias aisladas en AS fueron analizadas con la tinción de Gram por medio del microscopio óptico y observadas bajo el objetivo de 100 X (Figura 15); las cuales presentaron forma cocoide o de bacilos cortos; es por esto que se consiguieron definir morfológicamente 16 colonias diferentes, obtenidas de la purificación de todas las cajas Petri que se tenían en el inicio de la presente investigación (cuadro 7 y figura 15).

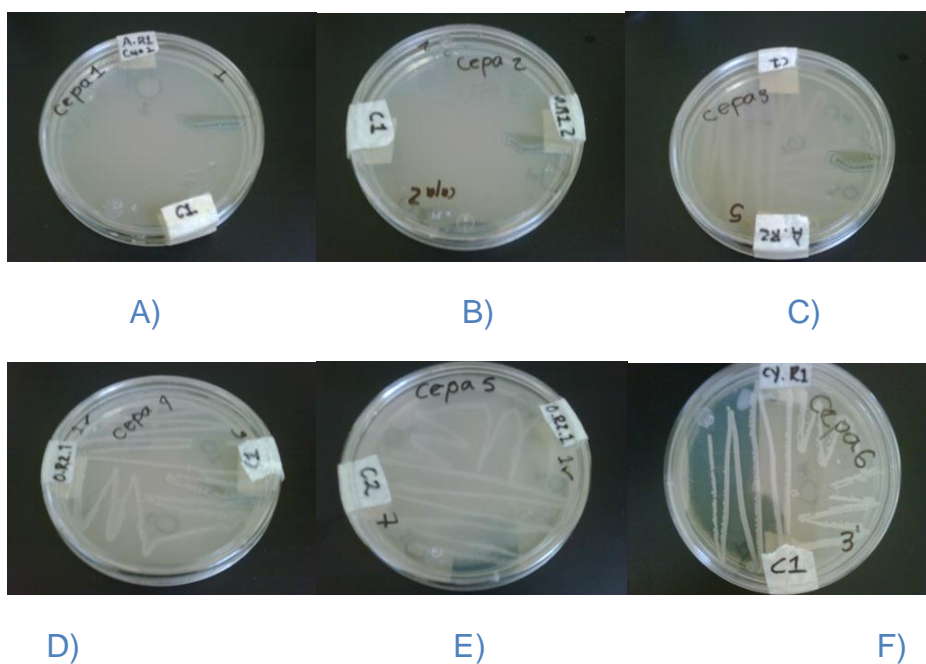


Figura 15. Cajas Petri con las 6 cepas puras obtenidas de la purificación.

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulosa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

Cuadro 7. Morfología microscópica de los microorganismos aislados en Agar Schaedler

Caja # 1 VML-2												
# Colonia	Tamaño	Color	Forma	Elevación	Superficie	Aspecto	Bordes	Luz reflejada	Luz transmitida	Consistencia	# de Repeticiones	Gram
1	Grande	Blanco	Circular	Plana	convexa	Seca	Entero	Mate	Opaca	Suave	2	Cocos Gram (+)
2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Caja # 2 VML-2												
1	Chico	Blanco	Circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	Suave	3	Cocos (+)
2	Chico	Blanco	Circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	Suave	3	Cocos (+)
Caja # 3 VML-2												
1	No determinado	Beige	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Liso	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1	Bacilos largos (+,-) Bacilos cortos (+,-)
2	Chico	Blanco	Circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	suave	4	Cocos (+)
Caja # 5 VML-2												
1	Chico	Beige	Circular	Plana	Lisa	Seca	Enteros	Mate	Opaca	suave	2	Cocos Gram (+)
2	No determinado	Rojo claro	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1	Bacilos largos (+,-)
3	No determinado	Rojo claro	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1	Bacilos largos(+) Bacilos cortos(-)
Caja # 6 VML-2												
1	Chico	Beige	circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	Suave	3	Cocos (+)
2	Chico	Blanco	Circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	Suave	1	Cocos (+) Bacilos (-)
3	No determinado	Rojo claro	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Liso	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1	Bacilos largos (+,-) Bacilos cortos (+,-)
Caja # 7 VML-2												
1	Chico	Blanco	Circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	Suave	3	Cocos (+)
2	No determinado	Rojo Claro	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Liso	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1	Bacilos largos (-) Bacilos cortos (-)
3	No determinado	Rojo Claro	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Liso	Brillante	Traslucida	Suave y viscosa	1	Cocos (+,-)) Bacilos (+)
4	Chico	Beige	Circular	Plana	Convexa	Seco	Liso	Mate	Opaca	Suave	1	Bacilos cortos (+,-) Bacilos largos (+,-)

De las colonias estudiadas se obtuvieron 6 cepas puras donde la morfología colonial puede ser observada en las figura 16, 17 y 18; además se puede observar que todas presentaron un crecimiento uniforme y de acuerdo a los resultados del cuadro 7 se indica que se puede tratar de los mismos microorganismos; sin embargo, proporcionó información más contundentes de los tipos de microorganismos que se encontraron en las diferentes resiembras, observando que en las 6 cepas aisladas los microorganismos identificados fueron cocos Gram positivos como se muestra en la figura 16, ya que esto se debe a que las paredes celulares de estas bacterias son más gruesas (tienen más peptidoglicano y menos lípidos), no son permeables al disolvente empleado en la decoloración (alcohol-acetona) ya que éste deshidrata la pared celular y cierra los poros, disminuyendo de esta manera los espacios entre las moléculas, y provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular (Valdéz-Sepúlveda, 2010).

La morfología microscópica indica que las 6 cepas aisladas presentaron morfología en forma de cocos pequeños como se muestra en la figura y de acuerdo a los resultados obtenidos del cuadro 7, la caja # 1-1, caja # 2-1, caja # 2-2, caja # 3-2, caja # 5-1, caja # 6-1, caja # 6-2, caja # 7-1, caja # 7-4, la morfología microscópica indica que se tratan de cocos Gram positivos lo cual concuerda con lo descrito por Valdez-Sepúlveda (2010).

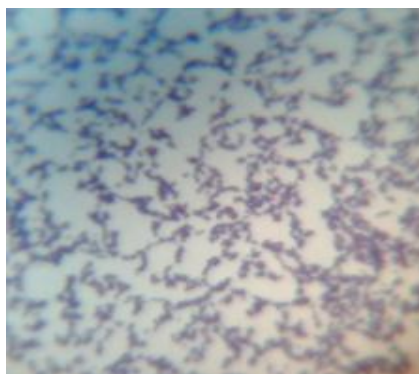


Figura 16. Morfología microscópica de los microorganismos Gram positivo aislados del líquido ruminal

Al analizar las colonias 2 y 3 de la caja # 5, colonia 3 de la caja # 6, fueron caracterizados como microorganismos Gram negativos y la morfología microscópica demuestra que tienen forma de bacilos pequeños, ovalados, algunos largos y otros cortos como se muestra en la figura 17.

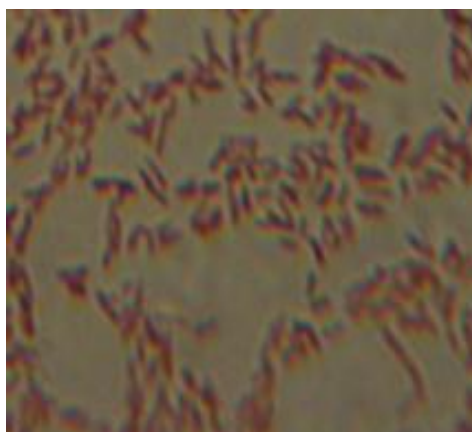


Figura 17. Morfología microscópica de los microorganismos Gram negativo aislados del líquido ruminal. Caja # 5 y caja # 6

La colonia 1 de la caja # 3 y las colonias 2 y 3 de la caja # 7 mostraron que fueron más pequeños en cuanto a tamaño y macroscópicamente son de elevación plana, forma irregular, como se muestra en la figura 18.

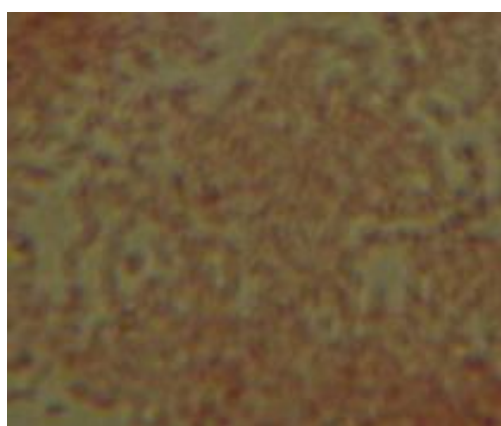


Figura 18. Morfología microscópica de los microorganismos Gram negativo aislados del líquido ruminal, caja # 3 y caja # 7.

Una vez conociendo las características macro y microscópicas de todas las colonias se seleccionaron solo las colonias puras de las cajas: Caja # 1 VML-2, Caja # 2 VML-2, Caja # 5 VML-2, Caja # 2 VML-2, Caja # 7 VML-2, Caja # 3 VML-2 debido a que coincidían en todas sus características macroscópicas, siendo predominantes los cocos Gram positivos, los cuales fueron empleados para la siguiente etapa (obtención de la enzima celulasa).

ETAPA II: Purificación y mantenimiento de las cepas obtenidas.

4.2 Purificación de los microorganismos aislados

Las seis cepas seleccionadas se mantuvieron en AS bajo anaerobiosis y conservadas en tubos de cultivo bajo las mismas condiciones. La purificación de cada una de las cepas se logró mediante la técnica de estría abierta cruzada, la cual es una técnica adecuada donde se siembra por cuadrantes y es útil para obtener colonias puras.

ETAPA III: Empleo de un microorganismo bacteriano para la producción de una enzima de interés industrial en alimentos, mediante el diseño de un medio sólido de cultivo inductor.

Una vez seleccionadas las 6 cepas puras en base a su crecimiento homogéneo en 24 horas, se llevó a cabo la siembra de cada una de ellos en sustratos específicos para observar su crecimiento, tomando en cuenta los factores de temperatura (40°C) y tiempo (72 h).

El papel empleado como fuente de carbono en el medio inductor es un elemento hecho de fibras vegetales de celulosa, éstas se aglomeran originando una hoja resistente y a su vez flexible. Los que contengan fibras largas serán más rígidos, mientras que los que contengan fibras cortas serán más flexibles; pero la longitud de éstas no son lo único que les brindan las características al papel; el tipo de pulpa de celulosa también afecta a condiciones tales como la rigidez. La pulpa química hace que este elemento sea

menos rígido, mientras que la pulpa mecánica aumenta su rigidez. Es por ello que para la obtención de la enzima celulasa se utilizó papel debido a su alto contenido en celulosa. Cabe mencionar que a la carboximetil celulosa se utilizó como fuente directa de celulosa. La celulosa se emplea en la industria alimentaria en forma microcristalina y en forma de derivados químicos como estabilizante y material de relleno. La celulosa microcristalina comercial se obtiene mediante hidrólisis parcial de la celulosa amorfa con ácido clorhídrico diluido, ya que el material insoluble en ácido es esencialmente el componente cristalino natural, cuyo tamaño de partícula es de unas 0.2 μm . generalmente el producto se utiliza asociado a otros derivados solubles en agua (Robinson, 1991).

Para la hidrólisis completa de celulosa a unidades de D-glucosa se requiere primero transformarla a estado amorfo con endoglucanasas (EC 3. 2. 1. 4), posteriormente hidrolizarla a unidades de celobiosa con celobiohidrolasas (EC 3. 2. 1. 91) y por último convertir esta última a unidades de D-glucosa con la intervención de β -glucosidasas (EC 3. 2. 1. 21) (Badui, 2006).

4.3. Producción de la enzima celulasa empleando papel periódico como fuente de carbono en medio sólido

El papel periódico es el resultado del reciclado de los papeles usados ya que sus fibras son una alternativa muy significativa por que poseen gran cantidad de celulosa. Estos son considerados como fibras secundarias ya que contribuye una gran porción de material fibroso recuperado. En la cuadro 7 se muestra el crecimiento obtenido empleando un medio sólido mineral y papel periódico como fuente de carbono, en donde se puede observar un crecimiento de las 6 cepas en estudio a partir de las 48 horas después de su incubación a una temperatura de 40 ° C.

En la figura 19 se muestra el crecimiento en las cajas Petri con el papel periódico en el medio sólido, lo que nos indica que el microorganismo (cocos Gram positivo) fue capaz de emplear al papel periódico como única fuente de carbono; además la morfología coincidía a su caracterización inicial

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

(cocos Gram positivos mostraron un crecimiento de una o dos colonias color blancas, elevadas, circulares, secas y muy grandes).

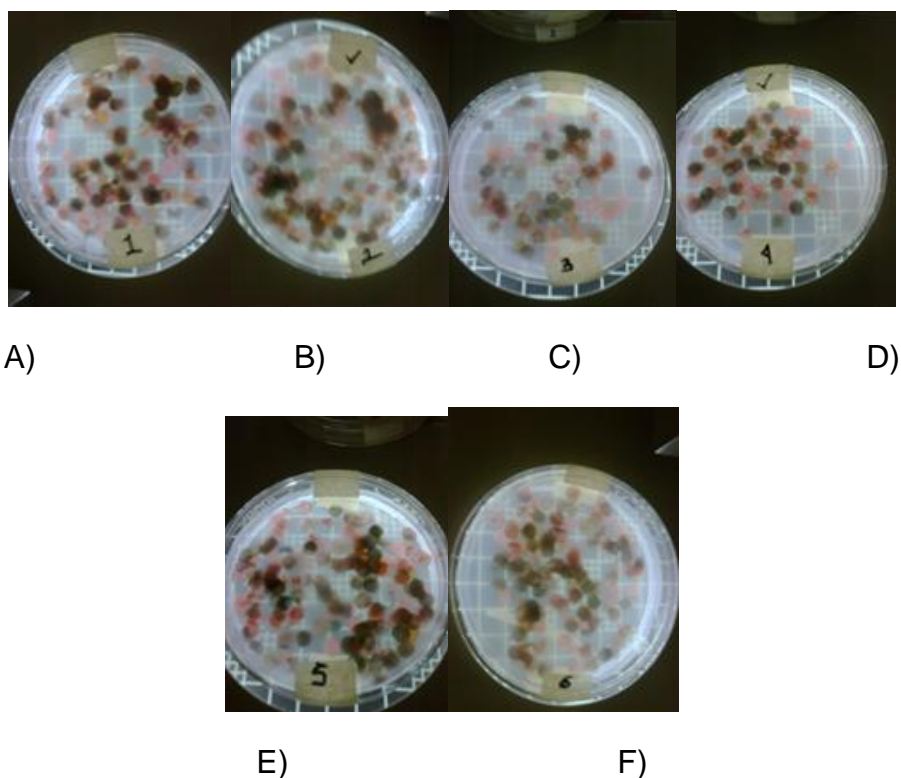


Figura 19. Cajas Petri empleando papel periódico como fuente de carbono

El crecimiento de las cepas (figura 19) fue monitoreado cada 24 horas como se observa en el cuadro 8, dando como resultado que en la cepa 1-A si hubo crecimiento a las 48 horas obteniendo una colonia con morfología circular, color traslucida, plana, seca, considerándola como caja con crecimiento positivo (en la repetición la caja fue con crecimiento negativo). En la cepa 2-B si hubo crecimiento a las 48 horas de su incubación donde creció una colonia pequeña con morfología circular, traslucida, plana, filamentosa y de consistencia seca, considerando la caja con crecimiento positivo (en la repetición la caja fue con crecimiento negativo). En la cepa 3-C si mostró crecimiento a las 48 horas, dando una colonia grande la cual cubrió toda la caja

con morfología de color blanco y traslucido, elevado, liso, circular, considerando la caja con crecimiento positivo (en la repetición la caja fue con crecimiento negativo).

Mientras que en la caja 4-D si se obtuvo crecimiento a las 72 horas donde creció una colonia con morfología pequeña, circular, traslucida, plana y filamentosa, considerándola como caja con crecimiento positivo (también se mostró crecimiento positivo en la caja que se tomó como repetición). Posteriormente se observó la cepa 5-E donde se si mostró crecimiento en la caja hasta las 144 horas dando una colonia con una morfología chica, traslucida, circular, seca, la cual se consideró la caja con crecimiento positivo (en la repetición la caja fue con crecimiento negativo). Finalmente se observó la cepa 6-F la cual no mostró ningún crecimiento en la caja por lo que se consideró la caja con crecimiento negativo (en la repetición la caja fue con crecimiento negativo).

Teniendo los resultados de todas la cajas sembradas con papel periódico como única fuente de carbono se demostró que las cepas 1-A, 2-B, 3-C, 5-E y 6-F (repetición) no mostraron un crecimiento homogéneo del microorganismo considerando las cajas con crecimiento negativo , mientras que la demás cepas 4-D (repetición) si tuvieron crecimiento, esto nos indica que si fueron adaptables al medio sólido que contenía papel periódico como única fuente de carbono y por lo cual se consideró como caja con crecimiento positivo.

Tomando encuesta todos los resultados antes mencionados se demostró que el papel periódico es una muy buena fuente de carbono para la obtención de la celulasa, ya que en su mayoría fue degradada por los microorganismos.

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

Cuadro 8. Crecimiento de los seis microorganismos en diferentes tiempos (papel periódico como fuente de carbono).

CRECIMIENTO MICROBIANO EN PAPEL PERIODICO										
CEPA 1 y cajas	30/mayo/11	31/mayo/11	01/junio/11	02/junio/11	03/junio/11	04/junio/11	05/junio/11	06/junio/11	07/junio/11	08/junio/11
	24 Hr.	48 Hr.	76 Hr.	96 Hr.	120 Hr.	144 Hr.	168 Hr.	192 Hr.	216 Hr.	240 Hr.
3	X	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
CEPA 2 y cajas										
3	X	✓	=	X	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	✓	✓	=	=	=	=
CEPA 3 y cajas										
3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CEPA 4 y cajas										
3	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CEPA 5 y cajas										
3	✓	✓	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓
4	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
CEPA 6 y cajas										
3	✓	✓	✓	✓	=	=	=	=	=	=
4	✓	✓	✓	✓	=	=	=	=	=	=

- ✓ : crecimiento poblacional del microorganismo.
- × : no hay crecimiento del microorganismo.
- = : crecimiento estable o detenido.

4.3.1 Producción de la enzima células mediante el empleo de papel filtro como fuente de carbono en medio sólido.

El papel filtro está fabricado con fibras de celulosa pura en un 100 % del grado alfa, están impregnados con resinas especiales y están disponibles en una variedad de grados y dimensiones, permite el manejo de soluciones con pH de 0-12 y temperaturas de hasta 120 ° C.

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

En la figura 20 se muestra el crecimiento en las cajas Petri con el papel filtro como única fuente de carbono en el medio sólido, lo que nos indica que el microorganismo (cocos Gram positivo) fue capaz de emplear al papel filtro con muy poca adaptación; además la morfología coincidía a su caracterización inicial.

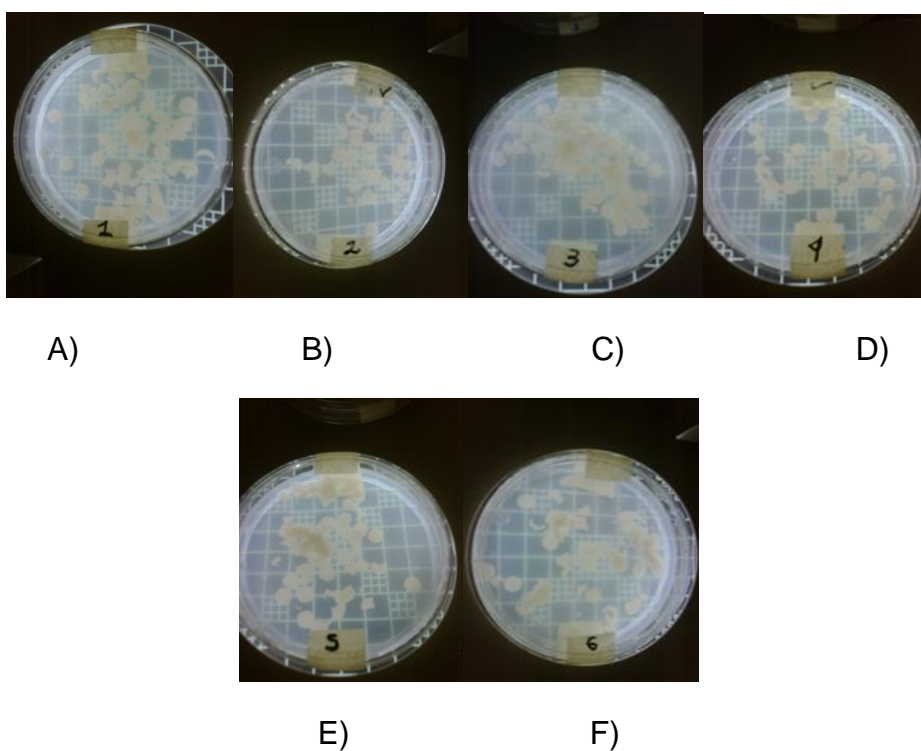


Figura 20. Cajas Petri empleando papel filtro como fuente de carbono

El crecimiento de las cepas (figura 20) fue monitoreado cada 24 horas como se observa en el cuadro 9, dando como resultado que en la cepa 1-A, cepa 2-B, cepa 5-E y la cepa 6-F no presentaron ningún crecimiento de colonias ya que la siembra no creció, por lo que fueron consideradas como cajas con crecimiento positivo (en la repetición la caja fue se consideró con crecimiento negativo). Mientas que en las cepa E-C si se observó crecimiento a las 48 horas obteniendo una colonia con una morfología traslucida, lisa, plana, circular, consistencia seca y filamentosa por lo que se la caja fue considerada con crecimiento positivo, y la cepa 4-D se observó crecimiento una colonia a las 48 horas y una segunda colonia a las 196 horas, con morfologías iguales las dos colonias, planas, filamentosas, circulares, traslucidas y de consistencia seca.

Teniendo los resultados de todas la cajas sembradas con papel filtro como única fuente de carbono se demostró que las cepas 1-A, 2-B, 3-C, 4-D 5-E y 6-F (repetición) no mostraron un crecimiento homogéneo del microorganismo considerando las cajas con crecimiento negativo, en un lapso de tiempo de 240 horas por lo que, esto nos indica que el microorganismo no se adaptó a las condiciones de nutrientes, lo cual puede ser debido a que no tiene la capacidad de producir la enzima celulasa o bien el microorganismo requiere de una inducción para que exprese la enzima (inducción); por lo que fueron consideradas como cajas con crecimiento negativo.

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

Cuadro 9. Crecimiento de los seis microorganismos en diferentes tiempos (papel filtro como fuente de carbono).

CRECIMIENTO MICROBIANO EN PAPEL FILTRO										
CEPA 1 y cajas	30/mayo/11	31/mayo/11	01/junio/11	02/junio/11	03/junio/11	04/junio/11	05/junio/11	06/junio/11	07/junio/11	08/junio/11
	24 Hr.	48 Hr.	76 Hr.	96 Hr.	120 Hr.	144 Hr.	168 Hr.	192 Hr.	216 Hr.	240 Hr.
5	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
6	X	✓	✓	✓	=	X	X	X	X	X
CEPA 2 y cajas										
5	X	✓	=	X	X	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CEPA 3 y cajas										
5	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CEPA 4 y cajas										
5	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	X	✓	=	=	=	=	=	=	=	=
=CEPA 5 y cajas										
5	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
6	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
CEPA 6 y cajas										
5	✓	✓	✓	=	=	X	X	X	X	X
6	✓	✓	✓	=	X	X	X	X	X	X

- ✓ : crecimiento poblacional del microorganismo.
- × : no hay crecimiento del microorganismo.
- = : crecimiento estable o detenido.

4.3.2 Producción de la enzima células mediante el empleo de carboximetil celulosa como fuente de carbono en medio sólido.

La carboximetilcelulosa es la sal parcial de sodio de un éter carboximetílico de celulosa; ésta procede directamente de cepas naturales de vegetales fibrosos, ya que es preparada a partir de la celulosa, la cual es el principal polisacárido constituyente de la madera y de todas las estructuras vegetales, es muy soluble, y puede ser fermentada en el intestino grueso,

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

también contiene no menos de 6.5 por ciento y no más de 9.5 por ciento de sodio (Na).

La figura 21 muestra que las cepas que mostraron un crecimiento homogéneo del microorganismo, mientras que las demás otras cepas no presentaron crecimiento celular, esto nos indica que no fueron capaces de adaptarse a la fuente de carbono (CMC) en el medio de cultivo en un tiempo de 240 horas por lo que se les consideró como cajas con crecimiento negativo.

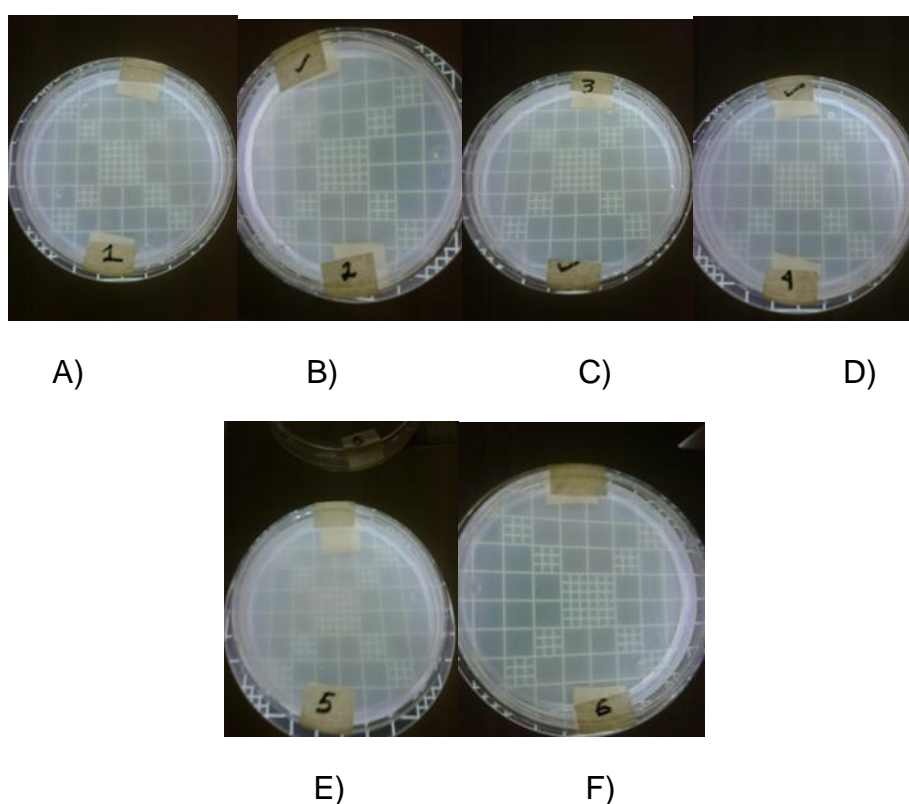


Figura 21. Cajas Petri empleando carboximetil celulosa como fuente de carbono

El crecimiento de las cepas (figura 21) fue monitoreado cada 24 horas como se observa en el cuadro 10, dando como resultado que en la cepa 1-A, cepa 5-E, y la cepa 6-F no presentaron crecimiento celular, por lo que se consideraron las cajas con crecimiento negativo. Mientras que las cepas cepa 2-B si se observó crecimiento a las 48 horas obteniendo una colonia con una

morfología traslucida, lisa, plana, circular, consistencia seca y filamentosa por lo que se la caja fue considerada con crecimiento positivo (en la repetición la caja fue con crecimiento negativo), en la cepa 3-C si se observó crecimiento a las 48 horas obteniendo una colonia con una morfología traslucida, lisa, plana, circular, consistencia seca y filamentosa por lo que se la caja fue considerada con crecimiento positivo (en la repetición la caja fue con crecimiento positivo), cepa 4-D si se observó crecimiento a las 48 horas obteniendo una colonia con una morfología traslucida, lisa, plana, circular, consistencia seca y filamentosa por lo que se la caja fue considerada con crecimiento positivo (en la repetición la caja fue con crecimiento positivo ya que se presentó crecimiento de una colonia a las 96 horas de incubación).

Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulosa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa).

Cuadro 10. Crecimiento de los seis microorganismos en diferentes tiempos (carboximetil celulosa como fuente de carbono).

CRECIMIENTO MICROBIANO EN CARBOXIMEIL CELULASA DESODIO										
CEPA 1 y cajas	30/mayo/11	31/mayo/11	01/junio/11	02/junio/11	03/junio/11	04/junio/11	05/junio/11	06/junio/11	07/junio/11	08/junio/11
	24 Hr.	48 Hr.	76 Hr.	96 Hr.	120 Hr.	144 Hr.	168 Hr.	192 Hr.	216 Hr.	240 Hr.
0	X	✓	✓	=	=	=	=	=	=	=
1	X	✓	=	=	=	=	=	=	=	=
2	X	✓	=	=	=	=	=	=	=	=
CEPA 2 y cajas										
1	X	✓	=	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	X	✓	✓	X	X	X	X	X	X	X
CEPA 3 y cajas										
1	X	✓	=	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CEPA 4 y cajas										
1	X	✓	=	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CEPA 5 y cajas										
1	X	✓	=	X	X	X	X	X	X	X
2	X	✓	=	X	X	X	X	X	X	X
CEPA 6 y cajas										
1	X	✓	=	X	X	X	X	X	X	X
2	X	✓	✓	=	X	X	X	X	X	X

- ✓ : crecimiento poblacional del microorganismo.
 x : no hay crecimiento del microorganismo.
 = : crecimiento estable o detenido.

4.3.3 Inducción de la actividad celulasa en medio líquido específico

De acuerdo a los resultados obtenidos de la proliferación microbiana en medio sólido, y con la finalidad de observar el comportamiento de crecimiento de los microorganismos estudiados, se procedió a determinar el crecimiento empleando las mismas condiciones y nutrientes del medio de cultivo pero proliferando al microorganismo en medio líquido. Únicamente se seleccionó una cepa para el estudio enzimático donde el criterio de selección fue: crecimiento homogéneo, menor tiempo de crecimiento la cual fue a las primeras 48 horas de su incubación, no productora de gas ni de pigmentos. La cepa seleccionada fue la # 4 como se muestra en la figura 22 ya que se puede observar que en su mayoría creció en todas las cajas Petri con las diversas fuentes de carbono.

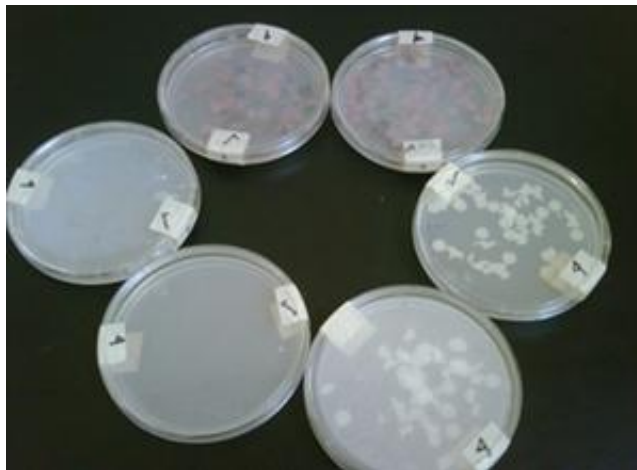


Figura 22.cajas Petri con la cepa cuatro.

4.3.4 Curva de crecimiento en medios específicos

La curva normal de crecimiento bacteriano presenta 4 fases principales: a) fase de latencia o adaptación (log), 2) fase de desarrollo logarítmica o exponencial (log), 3) fase de transición o estacionaria, y 4) fase de declinación o muerte celular (Valdez-Sepúlveda, 2010). Con la finalidad de observar el comportamiento cinético de crecimiento del microorganismo estudiado, se procedió a determinar las curvas de crecimiento empleando los medios adecuados.

4.3.4.1. Curva de crecimiento en medio líquido específico (papel periódico) para la producción de celulasa.

En la figura 23 se muestra el crecimiento de la cepa aislada en papel periódico en medio líquido, observándose que antes de las 24 horas el microorganismo empieza su fase exponencial lo cual representa un crecimiento adecuado, hay los nutrientes suficientes y el microorganismo es capaz de completar el ciclo celular incrementando su número de manera exponencial (2^n , el microorganismo tiene un crecimiento acelerado de forma exponencial ya que las células se dividen a una velocidad constante determinada por la naturaleza intrínseca de la bacteria y por las condiciones del medio, por lo tanto existe un marcado aumento del número total de células viables (Reyes-Arreola, 2010), presentando una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.9729$ DO/h.

Durante esta fase los microorganismos crecen y se multiplican a una velocidad exponencial, gracias al proceso de fisión binaria, ya que en esta etapa del cultivo celular existe abundancia de nutrientes, por lo que los microorganismos son capaces de orientar sus procesos metabólicos principalmente a la multiplicación y crecimiento celular. Su tasa de crecimiento es constante durante este periodo donde el microorganismo dobla su número a intervalos regulares. La población es más uniforme en términos de sus propiedades químicas y fisiológicas

durante esta fase: por lo tanto, los cultivos en fase exponencial son usados en estudios bioquímicos y fisiológicos (Reyes-Arreosola, 2010).

En la curva de crecimiento (figura 23) es posible observar que el microorganismo no tardo en adaptarse a los nutrientes del medio ya que a las primeras 12 horas entra en una fase de latencia y el crecimiento exponencial se da después de las 12 horas de fermentación y se observa una fase de adaptación donde hay un consumo de los nutrientes lo que significa que no hay aumento neto de los microorganismos lo que significa que no se dividan algunos y que la aparición de nuevos microorganismos se compensa por la aparición de otros y como se observa en la curva hubo un nuevo crecimiento y proliferación de los microorganismos.

Este patrón de la fase logarítmica se mantiene incluso cuando el número total de células permanece constante debido a que las células simplemente fallan en lisarse después de morir (Valdez-Sepúlveda, 2010).

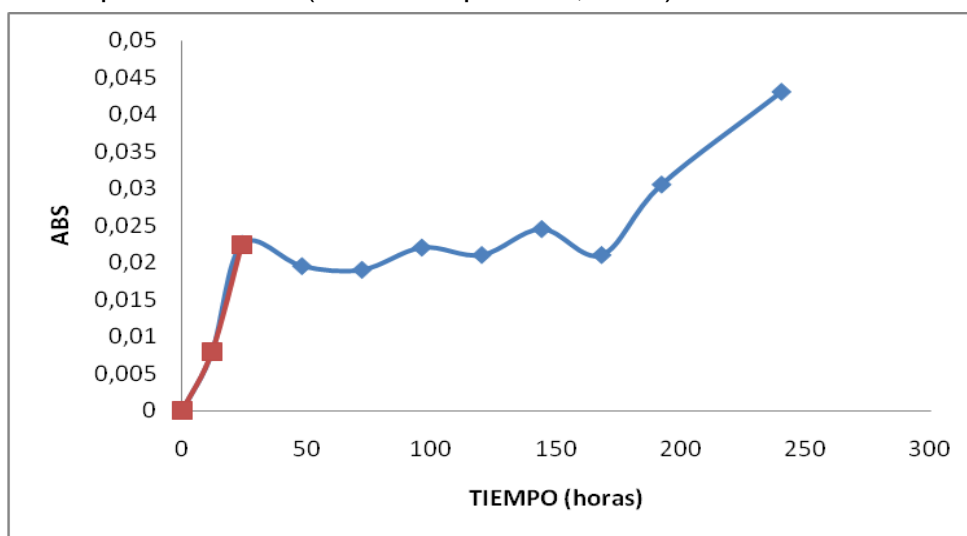


Figura 23. Curva de crecimiento de la cepa 4 en medio líquido específico con papel periódico incubados a 40° C.

4.3.4.2. Curva de crecimiento en medio líquido específico (papel filtro) para la producción de celulasa.

Para esto se diseñó un medio específico para la producción de la enzima celulasa, empleando como única fuente de carbono papel periódico. En la figura 24 se puede observar una fase de adaptación o latencia de 12 horas, posterior a la cual se observa que inicia la fase exponencial o logarítmica que dura hasta las 240 horas, durante esta fase se determinó una velocidad específica de crecimiento de $\mu = 0.9729$ DO/h, se observa en la gráfica que el microorganismo no presentó una fase estacionaria debido a que el crecimiento microbiano no desacelera ya que no hay agotamiento de nutrientes ni presencia de residuos tóxicos, esto se demostró con la lectura que se dio en la absorbancia, sin embargo es necesario seguir la cinética por un periodo de tiempo más largo para ver si se observan más cambios. Lo que nos indica que el microorganismo no tardó en adaptarse a los nutrientes del medio (principalmente a la cmc) lo cual coincide con lo descrito por Valdez-Sepúlveda (2010).

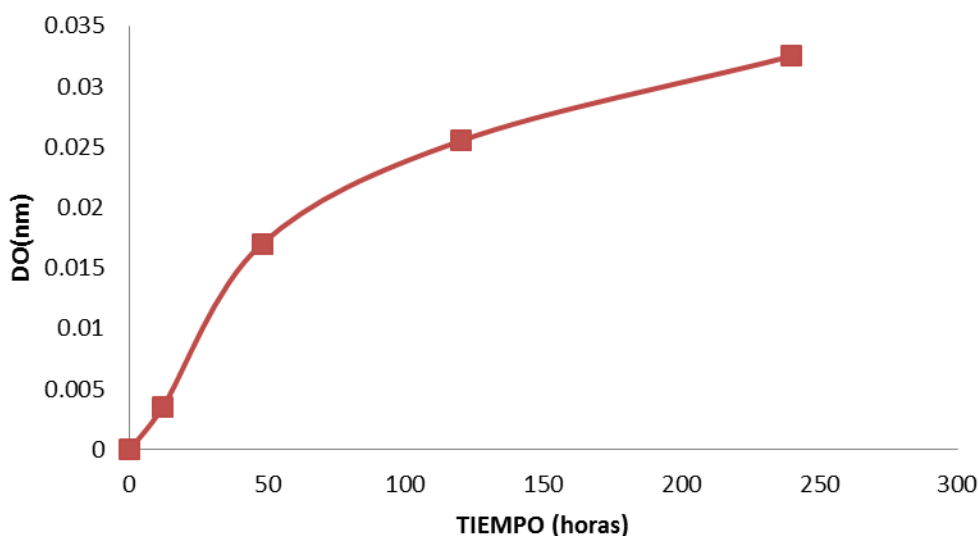


Figura 24. Curva de crecimiento de la cepa 4 en medio líquido específico con papel filtro incubados a 40° C.

4.3.4.3. Curva de crecimiento en medio líquido específico (carboximetil celulosa) para la producción de celulasa.

Para esto se diseñó un medio específico para la producción de la enzima celulasa, empleando como única fuente de carbono carboximetil celulosa. En la figura 25 se muestra el crecimiento de la cepa aislada en el medio líquido específico; en la cual se puede observar que alcanza su fase de crecimiento o exponencial en las primeras horas de fermentación (12 horas) que dura hasta las 72 horas y es ahí su punto máximo de crecimiento de $\mu = 0.9963$ DO/h, después de las 72 horas de cultivo se detecta una disminución drástica en la lectura de absorbancia, posteriormente se observa un descenso inmediato en la gráfica donde el crecimiento microbiano desacelera debido al agotamiento de nutrientes o a la acumulación de residuos tóxicos.

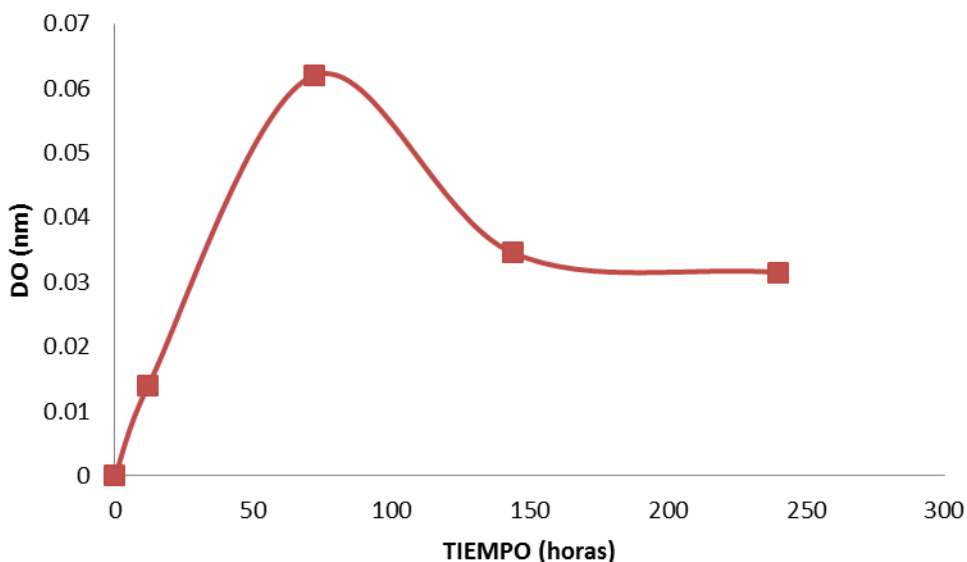


Figura 25. Curva de crecimiento de la cepa 4 en medio líquido específico con carboximetil celulosa incubados a 40° C.

Tomado en cuenta todos los resultados obtenidos se considera que si se detectó el crecimiento de la cepa 4 sobre los sustratos utilizados y que tuvo una mejor adaptación en el medio líquido con Carboximetil celulosa en un tiempo más rápido, debido a que esta es una fuente cien por ciento de celulosa, y estuvo seguido del medio con papel periódico por ser este un medio muy enriquecido de celulosa debido a la presencia de muchas fuentes de papel y por consiguiente en el medio con papel filtro también se dio el crecimiento de la cepa 4 pero con muy poco crecimiento.

4.5. Preparación del sustrato específico líquido para la producción de la celulasa.

Se prepararon nuevamente los tres medios líquidos de cultivo con la fuente de carbono seleccionada (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa), para luego ser utilizado como sustrato específico para poder correr la cinética enzimática y así producir la enzima celulasa. Considerando que se llevó a cabo la separación de la biomasa de mediante la centrifugación donde se tomó al extracto enzimático.

4.5.1 Cinética Enzimática

La cinética enzimática se define como el análisis cuantitativo de cada uno de los factores que intervienen en la tasa de reacción. Debido a esto tanto para la determinación de proteína como de azúcares reductores se llevó a cabo una cinética enzimática.

4.5.2 Cuantificación de proteína Biuret

La celulasa es una enzima compleja que se encarga de la degradación de la celulosa y consta de dos unidades importantes como mínimo: C-1, que rompe los enlaces de hidrogeno, liberando cadenas de glucosa susceptibles a una posterior hidrólisis, que hidroliza estas cadenas hasta celobiosa y glucosa. En realidad, una enzima de celulosa es una mezcla de diferentes componentes enzimáticos formando lo que denomina como un “complejo enzimático” que actúa en forma sinergista en la degradación de la celulosa. Las enzimas que forman al complejo enzimático son las endoglucanasas (1,4 (1,3; 1,4)- β -D-glucan 4-glucanohidrolasas, EC.3.2.1.4), las celobiohidrolasas (1, 4 β -D-glucan celobiohidrolasas, EC. 3. 2. 1. 91), las exoglucohidrolasas (1, 4 β -D-glucan glucobiohidrolasas, EC. 3. 2. 1. 74) y las β -glucosidasas β -D-glucosido glucohidrolasas, EC .3 .2. 1. 21). La celulosa es rápidamente hidrolizada en la naturaleza por organismos del suelo como hongos y los organismos anaerobios del rumen y del intestino donde digieren a la celulosa.

Las celulasas son proteínas derivadas de procesos naturales de fermentación, capaces de degradar a la celulosa (Velázquez-Luna, 2011). Por lo tanto, al microorganismo en estudio se le determinó proteína extracelular, dado que muchas proteínas se unen a otras biomoléculas, las proteínas también se pueden separar en base a sus propiedades ligantes. La fuente de una proteína es generalmente un tejido o células microbianas.

La figura 26 muestra el comportamiento de la máxima producción de la enzima celulasa (extracto enzimático), donde se puede apreciar que la mayor concentración de proteína extracelular se obtiene a las 48 horas de fermentación para el papel periódico (16.4680 g/L), a las 12 horas de fermentación para el papel filtro (14.5531 g/L) y para la carboximetil celulasa fue a las 48 horas de

fermentación (14.5531 g/L). A las 72 horas de fermentación para los tres medios se obtuvo concentraciones de proteína extracelular de: para el periódico de 13.2765 g/L, papel filtro 11.7446 g/L y carboximetil 12.1276 g/L, sin embargo la cantidad de proteína disminuye considerablemente después de las 96 horas de fermentación. Debido a que la microflora ruminal no se adapta rápidamente a la utilización de celulosa, por lo que la producción de la enzima se ve limitada (Valdez-Sepulveda, 2010). La cuantificación de proteína total en la materia prima en las fracciones de purificación fue necesaria para calcular la actividad específica y el factor de purificación (García, 1999).

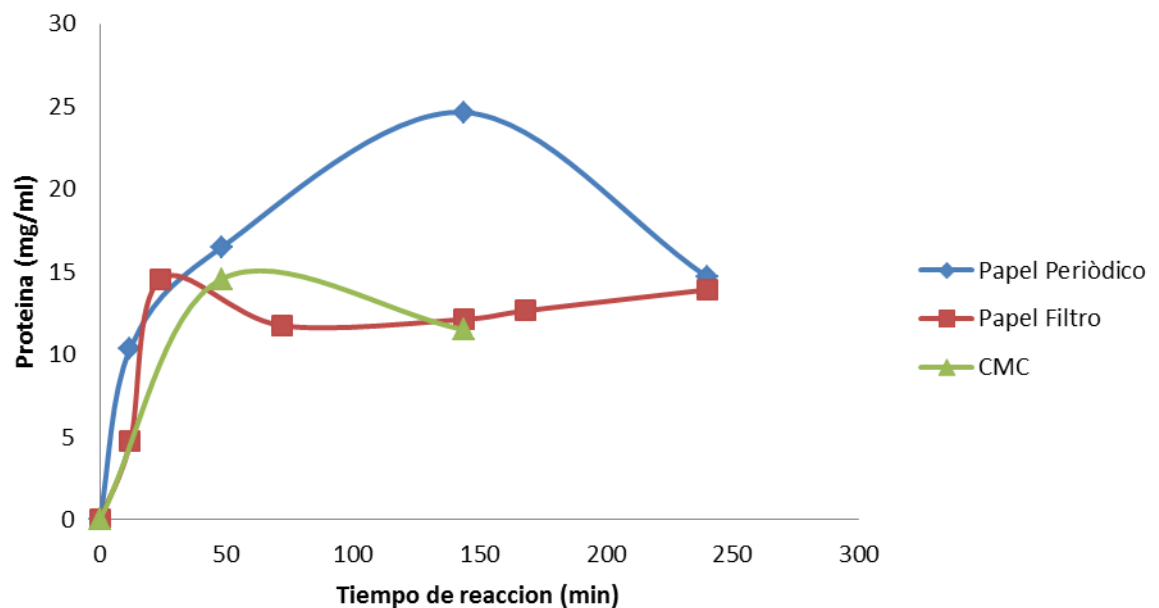


Figura 26. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa # 4 para la cuantificación de proteína

4.5.3 Determinación de actividad enzimática mediante la técnica de azúcares reductores (Somogy-Nelson)

La única forma de saber que una enzima está presente en una materia y en las fracciones durante el proceso de purificación es cuantificando la actividad enzimática: actividad total y específica. El resultado de la evaluación puede ser engañoso si no conocemos la relación sustrato: producto, es por esto que se utilizó la evaluación espectrofotométrica, cuya relación es 1:1 (García, 1999).

Michelis y Menten describen que las reacciones catalizadas por enzimas considerado la reacción sustrato-producto, observando experimentalmente que para concentraciones de sustrato altas, la tasa de reacción es independiente de la concentración de sustrato, para concentraciones de sustrato bajas, la tasa de reacción es de primer orden con respecto a la concentración total de la enzima. El proceso se puede ver afectado en todo momento por la concentración total de la enzima. Es por esto que a cualquier concentración de sustrato, la tasa de reacción es proporcional a la concentración total de la enzima. Una explicación simple que describe este proceso se presenta en la figura 27, es por esto que este modelo aplica a esta investigación considerando que la concentración del sustrato que en este caso sería la celulosa, la tasa de reacción es proporcional a la concentración de la enzima celulasa cuando esta entra en contacto para poder formar un complejo enzima sustrato el cual se establece a través de enlaces débiles, aun que en ocasiones llega a existir enlaces covalentes. Los enlaces por puente de hidrogeno juegan un papel muy importante en la formación del complejo, lo que constituye un punto esencial (Saucedo, 1949).

La capacidad de la glucosa y otros azúcares de reducir iones férricos o cúpricos es llamado como azúcares reductores, lo cual esta propiedad resulta de

utilidad en el análisis de azúcares, para así poder saber la presencia de azúcares reductores en el estudio de la obtención de la enzima celulasa (Nelson, 1949).

En la siguiente figura 27 se observa los resultados obtenidos de la actividad celulasa donde se observa que actúa sobre el sustrato de papel periódico (U) hidrolizándolo, en un tiempo de fermentación de 96 horas de fermentación a los 5, 10, 15 y 45 minutos de haber transcurrido la reacción donde se produce una cantidad de 1 U. esto puede ser debido a que el microorganismo presentó su máximo crecimiento a este mismo tiempo, lo que indica que el metabolismo se encuentra a su máxima expresión produciendo todas las enzimas necesarias para poder aprovechar el sustrato o fuente de carbono disponible que en este caso fue el papel periódico, lo cual concuerda con lo descrito por Valdez-Sepúlveda(2010).

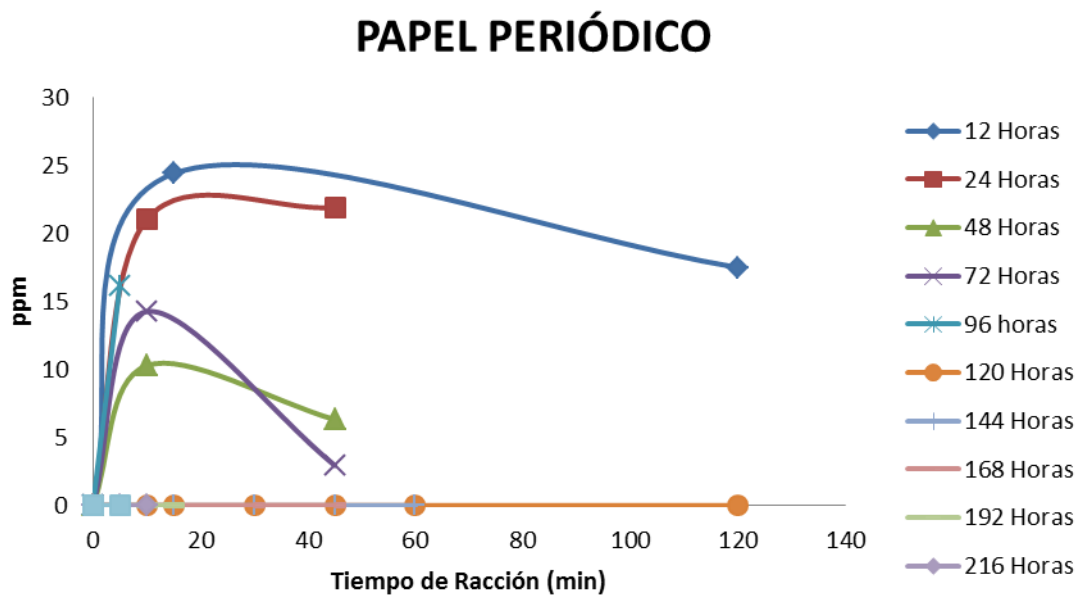


Figura 27. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa # 4, en el medio con papel periódico.

En la siguiente figura 27 se observa la mayor cantidad de enzima celulasa que actúa sobre el sustrato de papel periódico (U) hidrolizándolo, en un tiempo de fermentación de 96 horas de fermentación y a los 10 y 30 minutos de haber transcurrido la reacción donde se produce una cantidad de 10.58 U para las primeras 12 horas en los 10 minutos, 8.97 U en los 30 minutos de las 48 horas, 6.32 U en los 30 minutos de las 72 horas y 3.52 U en los 10 minutos de las 96 horas.

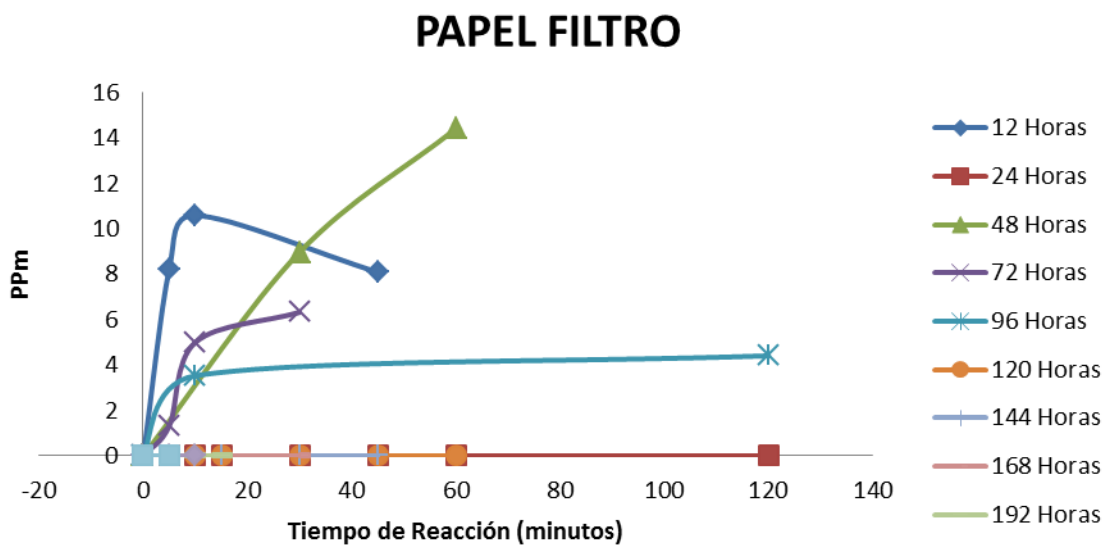


Figura 28. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa # 4, en el medio con papel filtro.

En la siguiente figura 28 se observa la mayor cantidad de enzima celulasa que actúa sobre el sustrato de papel periódico (U) hidrolizándolo, en un tiempo de fermentación de 96 horas de fermentación y a los 10 y 30 minutos de haber transcurrido la reacción donde se produce una cantidad de 33.28 U para las primeras 12 horas en los 15 minutos, 6.17 U en los 5 minutos de las 24 horas, 9.70 U en los 45 minutos de las 48 horas, 6.61 U en los 5 minutos de las 72 horas, 7.79 U en los 5 minutos de las 96 horas y 3.97 U en los 5 minutos de las 120 horas.

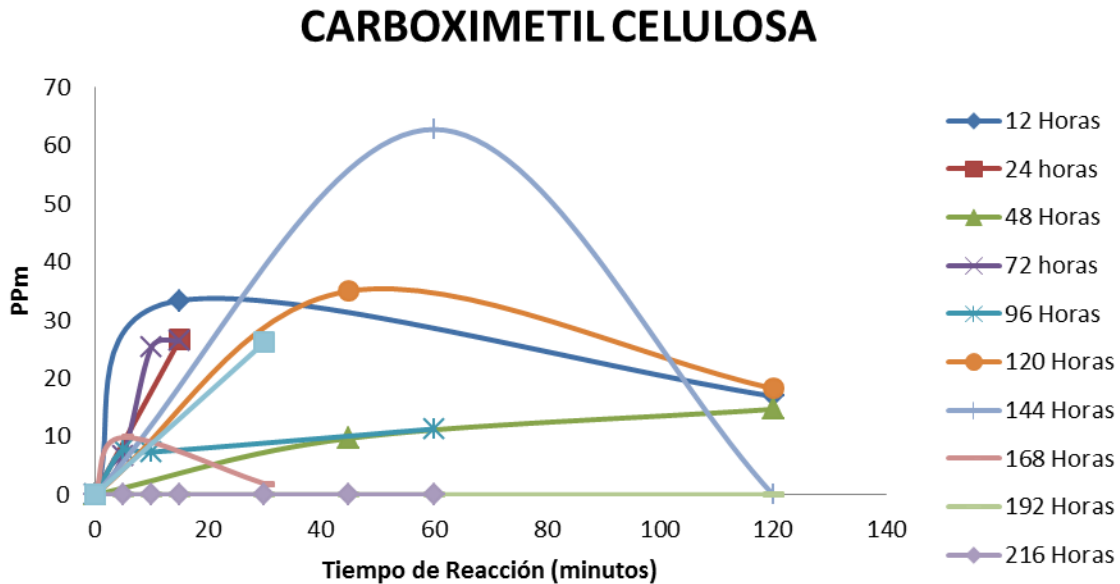


Figura 29. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa # 4, en el medio con carboximetil celulosa.

Todos los resultados obtenidos de los diferentes medios (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa) indican que si se dios el consumo o transformación de la celulosa por la enzima celulasa, implicando la acción de un sistema multienzimático; el complejo celulasas, constituido básicamente por tres enzimas; endoglucanasa, que ataca al azar enlaces 1, 4-glicosídicos de la cadena de celulosa; exoglucosanasa, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, y glucosidasa, que hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a glucosaesto (Valdez-Sepúlveda, 2010). Posteriormente se dedujo que el microorganismo presentó su máximo consumo a las 24 horas de fermentación y el microorganismo sintetizo y exporto a la superficie celular pequeñas cantidades de enzimas (Reyes-Arreozola, 2010).

5.CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos de la presente investigación se concluye que:

Se lograron aislar 6 microorganismos en agar Schaedler (medio específico para anaerobios); se caracterizaron macroscópicamente, y se observó que predominaron las colonias con forma circular, superficie lisa y consistencia suave, color blanco, con bordes enteros, aspecto seco y se identificaron microscópicamente como cocos Gram positivos.

Se demostró que el microorganismo elegido (cepa 4) produce la enzima celulasa, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor empleando como única fuente de carbono: papel periódico, papel filtro y la carboximetil celulosa. Es por esto que se reporta que el comportamiento microbiano de la cepa utilizada es positivo.

El papel periódico es una muy buena fuente de celulosa y además muy económica para la producción de la enzima celulasa.

El papel filtro es una fuente de celulosa pero para la producción de la enzima celulasa fue en un mayor tiempo y hubo poco crecimiento, por lo que se tomaría como una segunda alternativa.

La siguiente alternativa es la carboximetil celulosa dando muy buenos resultados ya que se observó el crecimiento del microorganismo en un corto tiempo, pero este medio tiene un costo más elevado que los otros medios antes mencionados.

La curva de crecimiento en medio líquido específico mostró una fase exponencial a las 12 horas con una velocidad específica de crecimiento de: $\mu=0.9729$ DO/h para el papel periódico, $\mu=0.8646$ DO/h para el papel filtro, $\mu=0.9963$ DO/h para la carboximetil celulosa, demostrando que microorganismo se adaptó al medio.

El microorganismo bacteriano codificado como VML-2 después de haber realizado la inducción enzimática, produce la enzima celulasa empleando como fuente de carbono papel periódico y papel filtro como alternativas, así como la carboximetil celulosa como fuente comercial de celulosa.

Se determinó que la mayor cantidad de enzima celulasa producida se obtuvo en un tiempo de fermentación de 12 horas para el papel periódico, 48 horas para el papel filtro y 144 horas para la carboximetil celulosa, de acuerdo a los resultados de las pruebas espectrofotométricas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aditivos alimentarios.**, Carboximetilcelulosa Sódica. Online. 19 de octubre de 2011. < www.aditivosalimentarios.com/index.../carboximetilcelulosa-sOдика/>
2. **Aguilar rivera, Noé.** “El reciclado de papel y cartón”. Revista Elementos, Ciencia y Cultura. Num. 1, 1995, pp. 35-46. <<http://www.elementos.buap.mx/num53/htm/54.htm> /> .
3. **Arellano Díaz, Oscar.** “Microorganismos del rumen”. Artículo científico. Universidad Autónoma Metropolitana. 13 de febrero de 2009. Online. «<http://thegame-sebastian-elias.blogspot.com/2009/02/articulo-cientifico-microorganismos-del.html>». 21 de septiembre de 2011.
4. **Biología en el sector agropecuario y agroindustrial.** Online. 13 de noviembre de 2010 «<http://bdigital.eafit.edu.co/bdigital/PROYECTO/P660.6CDD949/marcoTeorico.pdf>»
5. **Blanco, María del Rosario., Rivera, Oscar.** “Bacterias ruminales”, 1999. Online. «<http://www.agrarias.unlz.edu.ar/files/anatomia/bacterias%20ruminales.htm>», 21 de septiembre de 2011.
6. **Carboximetilcelulosa sódica.** Online. 19 de octubre de 2011. < www.salutia.com.ar/.../sp_Vademecum_Farmacopea_Drogas_ />

7. **CastañedaSaucedo, Cruz Soto.** “Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología”; fundamentos de cinética enzimática: 2ª edición, 1949. Pág. 28-31.

8. **Celulosa y celulasas.** Online. «<http://www.porquebiotecnologia.com.ar/education/cuaderno/>». 21 de septiembre de 2011.

9. **De la Madrid Cordero, Enrique.** “La situación de la industria de la celulosa y el papel en el mundo”. Online. «<http://www.financierarural.gob.mx>». 21 de septiembre de 2011.

10. **De Corzo, Virginia.** “Microbiología del rumen”. “Características del rumen”. Curso de Microbiología. 2008. <http://avindustrias.com/files/MICROBIOLOGIA_DEL_RUMEN.pp>. 16 de octubre de 2011.

11. **“Enzimas”.** Artículo Adymix Extremadura, S. L. Terra. Online. «<http://www.terra.es/personal2/adymix/articulos/enzimas.htm>». 08 de octubre de 2011.

12. **Enzimas aliadas a la Biotecnología.** Online. 08 de octubre de 2011. <<http://www.porquebiotecnologia.com.ar>>.

13. **Eliecer Carrera, Jorge.** “Producción y aplicación de enzimas industriales”. “production and application of industrial enzymes”. Facultad de ciencias agropecuarias, Vol. No.1 Marzo 2003. 08 de octubre de 2011.

14. Filtros de papel. Mahle. Online. 19 de octubre de 2011. <[www.mahle-aftermarket.com/W26JNMYV266STULES />](http://www.mahle-aftermarket.com/W26JNMYV266STULES/).

15. García Carreño Fernando Luis, Navarrete del toro Ángeles. “Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología”; Manipulación enzimática. 2ª edición, 1949. Pág. 81.

16. Ishler Virginia y Heinrichs Jud. “De la alimentación a la leche: comprendiendo la función del rumen”. Online. 14 de noviembre de 2011. <www.das.psu.edu/research-extension/pdf/feed-to-milk-spanish.pdf>

17. L. Lehninger Albert, L. Nelson David, M. Cox Michael. “Principios de bioquímica”; glúcidos: 2ª edición, 1949. Pág.306.

18. M. Kamande, George. V. Mills, Diamond y Rapids Cesar. “Digestión ruminal y nutrición”. Online. USA. 2006. 31 de octubre de 2011 <http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/96-digestion_ruminal.pdf>

19. Mata Cruz Antonio. “Degradación *in vitro* de dos variedades de *Opuntia* mediante enzimas producidas por la cepa ruminal VML-2”. Tesis de licenciatura, Febrero 2011. UAAAN, Buenavista, Coahuila, México.

20. Martinez Huerta Omar Alejandro. “Degradación *in vitro* de nopal (*Opuntia pheacantha* y *Opuntia ellisae*) a partir de microorganismos aislados de rumen de bovino”. Tesis de licenciatura, Junio 2011. UAAAN, Buenavista, Coahuila, México.

- 21.Nava Cuéllar Cuauhtémoc y Díaz Cruz Antonio.** “Microorganismos”. Online. 16 de junio de 2001. <www.fmvz.unam.mx/fmvz/enlinea/Ruminal/microorganismos.htm/>.14 de noviembre de 2011.
- 22.Navarrete Bolaños, J. L.; Jiménez-Islas, H.; Botello-Álvarez, E.; Rico-Martínez, R.**2003. Mixed culture optimization for marigold flower ensilage via experimental design and response surface methodology. J. Agric Food Chen. 51, 2006-2211. Online. “Optimización de variables en fermentación para la síntesis de celulasa y su efecto en la pared celular vegetal”. 08 de Octubre de 2011. «<http://www.smbb.com.mx/congresos.pdf> ».
- 23.Osmolaridad y osmolalidad. Online. 21 de noviembre de 2011.**<www.elergonomista.com>
- 24.Papel: milenario y actual,** “El papel y el hombre: una relación cotidiana”. 16 de octubre de 2011. <www.abcpedia.com>.
- 25.Ramírez, Pablo., Ochoa Juana María.** “/ Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. Revista peruana de biología. 26 de mayo de 2003:ISSN 1727-9933. Online. «<http://www.scielo.org.pe>». 21 de septiembre de 2011.
- 26.Reyes Arreozola María Isabel;** “Efecto de la adición de masilla de la industria cervecera en dietas balanceadas de ganado Holstein sobre la microbiota bacteriana presente en rumen bovino”. Tesis de licenciatura, Junio 2010, UAAAN, Buenavista, Coahuila, México.

27. Tipos de papel. Online. 16 de octubre de 2011.
<<http://www.slideshare.net/morriscamorris/tipos-de-papel-presentation>>.

28. Van Lier, Elize., Requeiro Mariel. “Digestión en retículo- rumen”. Online. , 2008, departamento de Producción Animal y Pasturas (curso de anatomía y fisiología animal), Montevideo, Uruguay, Universidad de la Republica. 31 de octubre de 2011.
<<http://www.fagro.edu.uy/~prodanim/cursos/AFA/TEORICOS/Repartido-Digestion-en-Reticulo-Rumen.pdf> />.

29. Velázquez Luna, Ana Lilia; “Degradación de *opunta ficus indica* var. ANV1 y *opunta phaeacantha* Mediante una celulasa aislada del rumen bovino. Tesis licenciatura, marzo 2011, UAAAN, Buenavista, Coahuila, México. pág. 19-22.

30. Valdez Sepulveda Lidia Guadalupe; “Estudio microbiológico de líquido ruminal de ganado Holstein alimentado con dietas enriquecidas con productos de la industria cervecera (masilla y levadura)”. Tesis de licenciatura, Marzo 2010, UAAAN, Buenavista, Coahuila, México.

7. ANEXO

Anexo I

Tinción de Gram

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias. Para ello se tomó una asada del cultivo y se suspendió en un portaobjetos que poseía una gota de agua destilada, se homogenizó la suspensión de bacterias y se extendió un poco en el portaobjetos; posteriormente se fijó la muestra con calor. Una vez fijada y seca la preparación, se cubrió por completo la superficie, donde se encontraba la muestra, con cristal violeta durante 1 minuto y se enjuagó suavemente al chorro del agua. Todas las células se tiñen de color azul-violeta. Se añadió la solución de lugol (I2IK) y se dejó reaccionar por 1 minuto; se enjuagó suavemente y se decoloró con una solución de alcohol-acetona (50/50 v/v) por unos cuantos segundos para después enjuagarse de inmediato. Las células

Gram positivas siguen de color azul-violeta, mientras que las Gram negativas se decoloran. Finalmente se cubrió la superficie de la preparación con una solución de safranina y se dejó actuar por 1 minuto para finalmente enjuagar con agua destilada. Las células Gram positivas (G+) se vuelven azul-violeta y las Gram negativas (G-) rosas o rojas.

Se dejó secar la preparación por completo para después observar los microorganismos teñidos, empleando un microscopio óptico (WESTOVER) a 100X con aceite de inmersión.