

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE  
ALIMENTOS**



**Estudio para la producción de la enzima celulasa mediante FMS  
con guishe como soporte empleando columnas de PVC.**

**POR:**

**JULIO SALVADOR GARCÍA CÁRDENAS**

**TESIS**

**Presentada como requisito parcial para**

**Obtener el título de:**

**Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Saltillo, Coahuila, México**

**Noviembre 2017**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

ESTUDIO PARA LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA CELULASA MEDIANTE FMS CON GUISE  
COMO SOPORTE EMPLEANDO COLUMNAS DE PVC.

POR:

JULIO SALVADOR GARCÍA CÁRDENAS

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado examinador como requisito

Parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

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

Director

  
Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Asesor

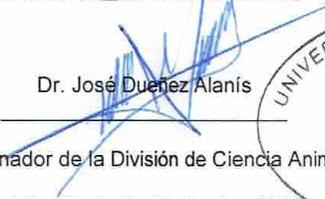
  
Dr. Armando Robledo Olivo

Asesor

  
M.C. Gustavo López Guarín

Asesor

  
Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

  
Dr. José Dueñez Alanís

Coordinador de la División de Ciencia Animal

Saltillo, Coahuila, Noviembre 2017



## **Agradecimiento**

A mi madre **Alicia Cárdenas Larios**. No tengo palabras para agradecer todo lo que me has brindado; Para la superación de mis ideales todo me ha permitido comprender día a día La difícil posición de ser madre y padre. Le agradezco por sus sacrificios y desvelos.

Estoy agradecido eternamente por darme la herencia más valiosa que pudiera recibir Fruto del inmenso apoyo y confianza. Gracias por todo.

A mi **Alma Terra Mater UAAAN**: Gracias por ser mi casa durante 5 años la cual he considerado como mi hogar, durante este tiempo viví tantos momentos inolvidables, gracias por formarme como profesionalista

## Índice

Capitulo 1.....	1
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Hipótesis.....	3
1.4 Objetivo.....	3
1.5 Objetivos específicos.....	3
Capitulo 2.....	5
2. Revisión de literatura.....	5
2.1 Biomasa.....	5
2.2 Guishe.....	6
2.3 Enzimas celulolíticas.....	6
2.4 Fermentación en medio solido y fermentación en medio liquido.....	6
2.4.1 Biorreactores para fermentación en medio solido.....	9
2.4.1.1 Biorreactores en columna.....	10
2.5 Microorganismos que degradan la celulosa.....	11
2.5.1 Aspergillus sp.....	12
Capitulo 3.....	13
3. Metodología.....	13
3.1 Localización del área de estudio.....	13
3.2 Guishe.....	13
3.3 Caracterización química.....	13
3.4 Microorganismo.....	14
3.5 Producción de enzima celulosa en fermentación en medio solido.....	14
3.5.1 Medio de cultivo czapeck.....	14
3.5.2 Recuento de esporas.....	14
3.5.3 Condiciones de la fermentación.....	15

3.5.3.1 Empaque.....	15
3.5.3.2 Fuente de nitrógeno.....	15
3.5.3.3 Tamaño de partícula.....	15
3.5.3.4 inóculo.....	15
3.5.3.5 Aireación.....	16
3.5.4 montaje de las columnas.....	16
3.5.5 Fermentación.....	17
3.5.5.1 buffer de extracción.....	18
3.5.5.2 Determinación de biomasa.....	19
3.6 Determinación de actividad endo-glucanasa.....	19
3.7 Determinación de actividad exo-glucanasa.....	20
Capitulo 4.....	22
4. Resultados y Discusión.....	22
Capitulo 5.....	27
5. Conclusión.....	27
Capitulo 6.....	28
6. Literatura citada.....	28

## INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Estructura de la celulosa; a la izquierda, $\beta$ -glucosa; a la derecha, varias $\beta$ -glucosa unidas (Lynd, <i>et al.</i> , 2007).....	5
Cuadro 1. Contenido del medio de cultivo Czapeck.....	14
Figura 2. Conteo de esporas.....	15
Cuadro 2. Humedad para crecimiento del microorganismo en columna.....	17
Figura 3. Montaje y preparado de las columnas de PVC para FMS.....	17
Figura 4. Proceso de montaje de la fermentación.....	18
Cuadro 3. Relación de buffer extracción y soporte fermentado.....	19
Cuadro 4. Análisis proximal de la materia prima empleada como soporte para la FMS.....	22
Figura 5. Morfología microscópica de la cepa M4 ( <i>Aspergillus</i> sp).....	23
Figura 6. Sistema batch de fermentación en columnas de PVC.....	24
Figura 7. Producción de la enzima endo-glucanasa empleando guishe como sustrato.....	25
Figura 8. Producción de la enzima exo-glucanasa en columnas de PVC.....	26
Figura 9. Formación de biomasa fúngica en FMS empleando guishe como sustrato.....	26

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2017

### MANIFIESTO DE HONESTIDAD ACADEMICA

El suscrito **Julio Salvador García Cárdenas** estudiante de la carrera de Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos, con matrícula **41127143** y autor de la presente Tesis manifiesto que:

1. Reconozco que el Plagio académico constituye un delito que está penado en nuestro país.
2. Las ideas, opiniones datos e información publicadas por otros autores y utilizadas en la presente Tesis han sido debidamente citadas reconociendo la autoría de la fuente original.
3. Toda la información consultada ha sido analizada e interpretada por la suscrita y redactada según su criterio y apreciación, de tal manera que no se ha incurrido en el "copiado y pegado" de dicha información.
4. Reconozco la responsabilidad sobre los derechos de autor de los materiales bibliográficos consultados por cualquier vía y manifiesto no haber hecho mal uso de ninguno de ellos.
5. Entiendo que la función y alcance de mi Comité de Asesoría, está circunscrito a la orientación y guía respecto a la metodología de la investigación realizada para la presente Tesis, así como del análisis e interpretación de los resultados obtenidos, y por lo tanto eximo de toda responsabilidad relacionado al plagio académico a mi comité de Asesoría y acepto que cualquier responsabilidad al respecto es únicamente por parte mía.

Julio Salvador García Cárdenas

Atentamente

Nombre y Firma

Tesista de Licenciatura UAAAN

## RESUMEN

El aprovechamiento de productos de desecho agroindustrial como el guishe podrían reducir considerablemente la contaminación ambiental; aproximadamente el tallado del *Agave lechuguilla* deja como residuo el 85% de la hoja, representando una alternativa para la producción de enzimas celulolíticas por su alto contenido de fibra.

El objetivo de este proyecto fue aprovechar el desecho agroindustrial “guishe” utilizándolo como soporte en una fermentación sólida empleando la cepa identificada como *Aspergillus* sp. Del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UAAAN como una alternativa para reducir considerablemente la contaminación por el exceso de este residuo en los ejidos de los talladores de ixtle, además de proveer un biocatalizador que pueda ser empleado para hidrolizar la celulosa.

Se elaboraron cinéticas de producción y cuantificación de la enzima celulasa mediante FMS (fermentación en medio sólido) empleando guishe como soporte, y utilizando columnas de plástico (PVC), obteniendo valores de 342 mg/L y 250 mg/L para endo-glucanasa y exo-glucanasa, respectivamente.

# CAPITULO 1

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Antecedentes

La celulosa es uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal que es degradada por una serie de microorganismos mediante la acción de varias enzimas no asociadas en complejos, como en los hongos filamentosos y en algunos actinomicetos o formando un complejo denominado "celulosoma", como en los clostridios y en bacterias del rumen (Murashima *et al.*, 2002; Lynd *et al.*, 2002). Cada parte de la planta, tales como hojas, paja, tallos, tallos, mazorcas de maíz, los cereales, el salvado de trigo, etc., está bajo la biomasa vegetal. Una gran cantidad de estos materiales se dejan en tierras agrícolas que han de ser descompuesto por microorganismos tales como bacterias y hongos (Jadhav *et al.*, 2013).

Una de las principales actividades económicas de los pobladores de las zonas áridas y semiáridas de México es la recolección de lechuguilla (*Agave lechuguilla*) para la obtención de su fibra llamada ixtle. Una vez que se obtiene el ixtle mediante el tallado manual o mecánico se obtiene el guishe que es el residuo de esta actividad económica (85% del peso fresco del cogollo). El *Agave lechuguilla* es una planta que forma rosetas pequeñas, muy surculosa (con renuevos de una planta, generalmente de origen subterráneo), de color verde amarillento, espigas de 2-3 m de alto; flores dispuestas en racimos, de 1 a 3, 2.5-4 cm de largo (base del ovario a extremo del tépalo); ovario amarillo verdoso, fusiforme. Aproximadamente el tallado del *Agave lechuguilla* deja como residuo el 85% de la hoja (Blando y Baca, 2001); partiendo de esto, solamente en Coahuila se producen cerca de 6732 toneladas por año de ixtle, se requieren 44789 toneladas de hojas de lechuguilla para obtener la cantidad de ixtle antes mencionada, por consecuencia el sobrante son 38147 toneladas de residuo "guishe" los cuales se encuentran localizados en los ejidos de las cercanía en el estado de Coahuila y Zacatecas, estos son incinerados

provocando contaminación otros llegan a ríos, invaden ecosistemas, propician plagas entre otros efectos (Suarez, 2012).

Para la degradación de la celulosa es necesaria la acción sinérgica de tres tipos de enzimas que hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 de la celulosa: (i) las endo-glucanasas, que actúan al azar sobre enlaces internos, (ii) las celobiohidrolasas, que operan progresivamente por los extremos reductores y no reductores de la cadena, y (iii) las  $\beta$ -glucosidasas (BGL), que hidrolizan celobiosa y los oligosacáridos más pequeños hasta glucosa (Martínez Hernández, 2016).

Las enzimas de importancia industrial tradicionalmente se han producido en fermentación sumergida (SMF) debido a la facilidad de manejo y buen control de los factores ambientales tales como la temperatura, aireación, agitación y pH (Singh *et al.*, 2007). En este proceso se proporcionan las condiciones necesarias para que el microorganismo de interés se desarrolle adecuadamente y alterar sus rutas metabólicas para que produzca el compuesto de interés. Las celulasas están ganando más interés debido a sus amplias aplicaciones en alimentos y piensos, fábrica de cerveza, textiles, la extracción de zumo, etc.

## 1.2 Justificación

En la actualidad el tallado del *Agave lechuguilla* genera toneladas de guishe al año, el cual no es aprovechado; con este estudio se busca el aprovechamiento de este residuo agroindustrial.

El aprovechamiento de productos de desecho agroindustrial como el guishe podrían reducir considerablemente la contaminación ambiental; aproximadamente el tallado del *Agave lechuguilla* deja como residuo el 85% de la hoja (Blando y Baca, 2001); partiendo de esto, solamente en Coahuila se producen cerca de 6732 toneladas por año de ixtle, se requieren 44789 toneladas de hojas de *Agave lechuguilla* para obtener la cantidad de ixtle antes mencionada, por consecuencia el sobrante son

38147 toneladas de residuo “guishe”, representando así una alternativa para ser aprovechado para la producción de enzimas celulolíticas

Diversos estudios locales revelan que se paga al productor entre \$12.00 y 13.00 M.N. por un kilo de fibra, la cual es tratada, teñida y exportada para su venta a industrias europeas y estadounidenses, llegando a un precio aproximado de \$41.00 M.N. por 300-400g aumentando aproximadamente un 1000% su valor, de los cuales el productor o tallador no recibe ninguna remuneración, siendo el quien realiza todo el trabajo.

Con este proyecto se planea aprovechar el desecho agroindustrial “guishe” utilizándolo como soporte en una fermentación solida empleando la cepa identificada como *Aspergillus* sp. Del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UAAAN como una alternativa para reducir considerablemente la contaminación por el exceso de este residuo en los ejidos de los talladores de ixtle.

### 1.3 Hipótesis

Es posible la producción de la enzima celulasa mediante FMS empleando guishe como sustrato.

### 1.4 Objetivo general

Producir mediante fermentación en medio sólido la enzima celulasa empleando guishe como soporte.

### 1.5 Objetivos específicos

- Caracterizar químicamente el soporte empleado como materia prima (guishe).
- Producir mediante FMS la enzima celulasa empleando guishe como sustrato.

- Cuantificar el crecimiento microbiano empleando guishe como soporte.
- Cuantificar la actividad enzimática producida por FMS empleando *Aspergillus sp* (cepa M4) aislada del semi desierto de Coahuila.

## **CAPITULO 2**

### **REVISION DE LITERATURA**

## 2.1 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina que están fuertemente entrelazados y unidos químicamente por interacciones no covalentes y por reticulaciones covalentes (Margeot *et al.*, 2009). La entrada y salida de biomasa lignocelulósica resultante de algunos procesos es una de las principales causas de la contaminación del medio ambiente.

La celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza y el principal constituyente de la pared celular vegetal, está formada por unidades de  $\beta$ -glucosa unidas por enlaces  $\beta$  1-4 glicosídicos formando moléculas de celobiosa, que a su vez forman cadenas lineales de aproximadamente 8000-12000 unidades de glucosa (Lynd, *et al.*, 2007).

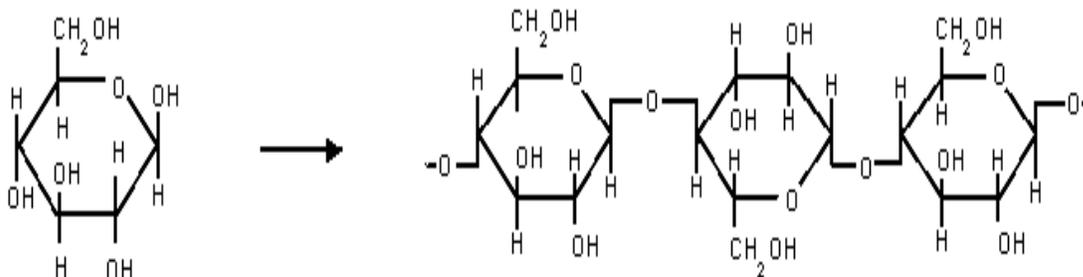


Figura 1. Estructura de la celulosa; a la izquierda,  $\beta$ -glucosa; a la derecha, varias  $\beta$ -glucosa unidas (Lynd, *et al.*, 2007).

Como se dijo anteriormente, constituye el principal componente de las paredes celulares de la planta, y representan el 50% del peso seco de la materia vegetal. Su grado de polimerización varía en función de su origen (Levy, *et al.*, 2002). La celulosa es un sustrato resistente que es, a su vez, estrechamente asociado con hemicelulosas y lignina, las cuales forman una estructura que es poco accesible a la degradación (Hildén y Johansson, 2004).

## 2.2 Guishe

La pulpa residual del tallado del *Agave lechuguilla* Torrey se denomina guishe, y representa aproximadamente el 83.4 % de su volumen (tejido y agua de las hojas) (Orozco *et al.*, 1977). Sobre las propiedades del guishe, o sus aplicaciones industriales ha habido pocos estudios. El guishe tiene características físicas y químicas favorables, como poder abrasivo, pero hasta el momento ha sido poco aprovechado, pues el guishe podría tener otros usos como la elaboración de laminas, maderas aglomeradas, cartón, papel filtro y en la obtención de esteroides (Berlangua *et al.*, 1992a). Del tallo y del guishe se obtienen saponinas para la elaboración industrial de jabones y champús (Flores y Perales, 1989; Zapién, 1981), también en algunos casos se ha utilizado como mejorador de suelo esparciéndolo en campos agrícolas. Sin embargo, la mayor cantidad de este producto no es utilizado y se acumula en grandes cantidades, por lo cual es un factor de contaminación y de riesgo en las localidades donde se realiza el tallado de ixtle, ya que en algunas de ellas lo destruyen incinerándolo generando contaminación ambiental, ya que en la época de sequia el ganado menor lo consume provocándole intoxicación y en algunos caso la muerte.

### 2.3 Enzimas celulolíticas

Para la degradación de celulosa es necesaria la acción sinérgica de tres tipos de enzimas que hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 de la celulosa: (i) las endo-glucanasas, que actúan al azar sobre enlaces internos, (ii) las celobiohidrolasas, que operan progresivamente por los extremos reductores y no reductores de la cadena, y (iii) las  $\beta$ -glucosidasas (BGL), que hidrolizan celobiosa y los celooligosacáridos más pequeños hasta glucosa (Martínez Hernández, 2016).

### 2.4 Fermentación en medio sólido (FMS) y fermentación en medio líquido (FML)

La fermentación en medio sólido es una tecnología que tuvo sus orígenes como un arte ancestral. Originalmente, estos procesos fueron aquellos en los que hongos

filamentosos invadían ciertos materiales sólidos que luego eran consumidos por las personas, por ejemplo, el Koji y el Tempeh que son alimentos tradicionales asiáticos, los quesos camembert y roquefort en Europa (Viniegra González, 1995). La característica esencial de la fermentación sólida es el crecimiento del microorganismo sobre un sustrato insoluble sin una fase libre, variando el nivel de humedad del 30 a 80% (Laukevics *et al.*, 1984). La fermentación en medio sólido ofrece una serie de ventajas económicas sobre los procesos convencionales de fermentación sumergida para la obtención de productos de alto valor agregado (Castilho *et al.*, 2000), como etanol, enzimas, antibióticos, hongos comestibles, ácidos orgánicos, aminoácidos, pigmentos, metabolitos secundarios, etc. (Holker *et al.*, 2004; Pandey, 1994; Pandey *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 1988; Vandenberghe *et al.*, 2000), debido a los bajos niveles de humedad y a la disminución del volumen del medio por unidad de peso de sustrato, además de que se obtiene una alta productividad, los volúmenes de fermentación son menores a los sistemas sumergidos y el tratamiento del efluente es reducido (Aguilar *et al.*, 2001). En todo proceso hay un equipo crítico donde se forman los productos a obtener, en este caso el equipo donde se lleva a cabo la fermentación es llamado “biorreactor” el cual proporciona las condiciones de operación adecuadas para que el microorganismo produzca el compuesto bioactivo deseado. El diseño de biorreactores para la fermentación en medio sólido ha avanzado lentamente en la última década debido a problemas de operación, fenómenos de transporte y escalamiento, por lo que es un área de la biotecnología que se encuentra en un estado de intenso desarrollo.

Los biorreactores son los equipos donde se realiza el proceso de cultivo (también comúnmente denominado “fermentador”), sea en estado sólido o líquido. Su diseño debe ser tal que asegure homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado. Es importante tomar en cuenta los problemas de transferencia de calor y oxígeno sobre la cama de sustrato, los cuales dependen de las características de la matriz que se esté utilizando para la fermentación, siendo éste, uno de los principales factores que afectan el diseño y las estrategias de control.

Los criterios más importantes para el diseño de un biorreactor pueden resumirse del siguiente modo dependiendo del tipo de biorreactor y la fermentación a utilizar (Mitchell *et al.*, 1992):

- El tanque debe diseñarse para que funcione asépticamente durante numerosos días, para evitar la aparición de contaminantes en las operaciones de bioprocesos de larga duración.
- Debe permitir una mayor área de contacto entre las fases biótica y abiótica del sistema, es decir, se debe proporcionar un sistema adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.
- El consumo de energía debe de ser el mínimo posible.
- Entradas para la adición de nutrientes y el control de pH.
- El crecimiento microbiano es generalmente exotérmico, por lo que, el biorreactor debe facilitar la transferencia de calor, del medio hacia las células y viceversa, a medida que se produce el crecimiento celular, además de mantener estable la temperatura deseada.
- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo.
- Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo.

- El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente inoculado con el microorganismo deseado.
- Los biorreactores más utilizados a nivel industrial están provistos de mecanismos de agitación, dispersión y aireación así como de sistemas para el control de la temperatura, pH. Los biorreactores deben ser optimizados para obtener la máxima concentración de productos de la fermentación, como lo son la biomasa microbiana y/o metabolitos en un tiempo mínimo y a menor costo de producción (Izasa, 2007).

#### 2.4.1 Biorreactores para FMS

La última década ha sido una de las más importantes para el desarrollo en el diseño, operación y escalamiento de biorreactores para la fermentación en medio sólido. Los tipos de biorreactores más estudiados han sido los de bandeja y los de tambor rotatorio y desde hace pocos años se han introducido un nuevo tipo de biorreactores en fermentación en medio sólido denominados de *cama empacada* o *columna de lecho fijo*. Algunos de los biorreactores utilizados a escala laboratorio son cajas Petri y matraces Erlenmeyer. Estos son utilizados por su simplicidad, los cuales no operan con aeración ni agitación forzada, en ellos solamente es controlada la temperatura del cuarto de incubación.

Dentro de los procesos de fermentación en medio sólido existen actualmente dos categorías: a escala laboratorio en las cuales se utilizan pequeñas cantidades de medio sólido hasta pocos kilogramos, y el otro que es a escala piloto y escala

industrial en donde se utilizan desde kilogramos hasta toneladas. En la primera categoría existen muchos diseños de biorreactores, los cuales llegan a ser muy sofisticados, mientras que en la segunda categoría es poca la variedad de biorreactores utilizados, solo algunos de los biorreactores a nivel industrial pueden operar en condiciones estériles (Izasa, 2007).

#### 2.4.1.1 Biorreactor en Columna

Uno de los más interesantes sistemas para fermentación en medio sólido a nivel laboratorio fue el desarrollado y patentado por el grupo del Instituto para la Investigación y Desarrollo (IRD) en Francia (antes ORSTOM), entre 1975 y 1980, compuesto por pequeñas columnas de cuatro centímetros de diámetro y veinte centímetros de altura, el cual es llenado con un medio previamente inoculado y puesto en un termostato de agua. El equipo está conectado a una columna de cromatografía de gases para monitorear la producción de CO<sub>2</sub>, resultado de la respiración del microorganismo y de sus reacciones metabólicas. La demanda de oxígeno se cubre por medio de aeración forzada utilizando compresores con sistemas de regulación de presión para evitar la compactación excesiva del lecho. La geometría y diseño de las columnas permite que sea un equipo barato, debido a que son elaboradas a base de vidrio, por lo que la remoción del calor exotérmico de la fermentación se lleva a cabo de manera eficiente. Requiere de poca cantidad de medio de cultivo y la fácil adaptación del equipo a sistemas más rudimentarios en cuanto a equipamiento y cuantificación de productos, le confiere practicidad de uso. Sin embargo, para llevar a cabo las lecturas de los parámetros cinéticos durante la fermentación es necesario sacrificar una columna completa, ya que el diseño de la misma no permite tomar muestras (Durand *et al.*, 1993; Iliuta *et al.*, 2005). Este equipo es conveniente en las primeras etapas del desarrollo de un bioproceso ya que es adecuado para estudios de caracterización y optimización de la composición del medio de cultivo, y para cuantificar los datos necesarios para llevar a cabo el cálculo de parámetros cinéticos (Izasa, 2007)

## 2.5 Microorganismos que degradan celulosa

Los microorganismos que degradan la celulosa o microorganismos celulolíticos desempeñan un papel importante en la biosfera ya que contribuyen reciclando este polímero; la hidrólisis enzimática de la celulosa ha sido intensamente investigada ya que ofrece las ventajas de su alta especificidad y actividad catalítica bajo condiciones ambientales moderadas, por lo que se requiere de organismos altamente productores de celulasas, entre los que se encuentran una gran variedad de bacterias y hongos, pudiendo ser estos microorganismos tanto aerobios como anaerobios, mesófilos o termófilos; aunque solo algunos de ellos producen la enzima celulasa extracelular capaz de degradar la celulosa (Vilches, 2002; Santos, 2014)

Entre los hongos celulolíticos destacan: *Trichoderma reesei*, *Phanerochate chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma koningii*, *Sporotrix spp*, *Altenaria spp*, *Geotrichum spp*, *Rhizoctonia spp*, *Trametes spp*, *Paecilomyces spp*, *Mucor spp*, *Cladosporium spp*, *Bulgaria spp*, *Chaetomium spp*, *Helotium spp*, *Aspergillus spp*. Las bacterias degradadores de celulosa más abundantes y conocidas son las aerobias entre las cuales se pueden citar: *Cellulomonas spp*, *Microbispora bispora*, *Thermomonospora spp*, *Cytopaga spp*, *Corynebacterium spp*, *Vibrio spp*, *Bcillus spp*, *Pseudomonas spp*, *Cytophaga spp*, *Corynebacterium spp*, *Vibrio spp*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp*, *Thermobifida spp*, además de algunos anaerobios como : *Acetiviro Cellulolyticus*, *Butivibrio spp*, *Bacteroides Cellulosolvens*, *Bacteriodes succinogenes*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium Thermocellum*, *Ruminococus albus*, *Ruminococos flavefaciens* (Gaitán *et al.*, 2005).

Los preparados celulíticos son obtenidos de microorganismos de origen fúngico y bacteriano, los cuales se obtienen principalmente de *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis* (Bhat 2000).

### 2.5.1 *Aspergillus* sp

Los hongos son los responsables de la mayor proporción de degradación de la celulosa en la naturaleza y esto no es solamente consecuencia de la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos, sino que también tienen ventajas adaptativas que son: la rápida colonización de los sustratos y una eficiente remoción de los productos de la hidrólisis; estas características los distinguen de los demás organismos como los principales degradadores de materiales celulósicos (Vilches 2002, González 2008).

Estudios han demostrado que *Aspergillus* es un organismo ampliamente utilizado en la producción de una gran variedad de glucanasas, con un espectro tal que puede lograr la completa degradación de la celulosa, además muestra algunas ventajas para la producción industrial de enzimas ya que tiene un alto nivel de producción, presenta buenas propiedades para el cultivo, lo que posibilita la producción a gran escala, y aunado a esto sus productos son generalmente reconocidos como seguros lo que posibilita el uso de sus productos en la industria de alimentos tanto para el hombre como para animales (Villena *et al.*, 2003).

La principal característica morfológica de este género de hongos es su color, posee distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grades suelen parecer diminutos alfileres sobre el sustrato (González, 2008).

Se han desarrollado diversos estudios empleando la mazorca de maíz y salvado de trigo para la producción de la enzima celulasa, obteniendo 0.38 y 0.26 U de actividad exo-glucanasa (Kumaresan, 2015).

## **CAPITULO 3**

### **METODOLOGIA**

La presente investigación se dividió en 3 etapas las cuales se describen a continuación:

### 3.1 Localización del área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Bioprocesos del Departamento del Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UAAAN , con ubicación geográfica de 25°26´ 00´´ latitud norte y 101° 00´ 00´´ longitud oeste.

## **ETAPA I: Caracterización química de la materia prima (guishe)**

### 3.2 Guishe:

La materia prima fue obtenido del ejido el Porvenir, ubicado a 146.9 km en el estado de Coahuila, Mex. Se llevó al laboratorio y se secó a una temperatura de 60°C hasta peso constante, posteriormente se almacenó bajo condiciones adecuadas hasta su uso.

### 3.3 Caracterización química:

Se realizó un análisis proximal para la obtención de proteína cruda (PC), fibra cruda (FC), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), grasa, carbohidratos, y minerales por el método de la AOAC (1994).

## **ETAPA II: Producción de la enzima celulasa mediante FMS empleando guishe como sustrato**

### 3.4 Microorganismo

Se empleó el microorganismo M4 caracterizado como *Aspergillus* sp. Perteneciente al cepario del laboratorio de Genética del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

### 3.5 Producción de la enzima celulasa mediante FMS:

Una vez seleccionada la cepa que mejor consumo de sustrato y mayor crecimiento radial se realizó la producción de la enzima celulasa mediante la siguiente metodología:

#### 3.5.1 Medio de cultivo Czapeck:

El medio Czapeck es un medio mínimo en sales para crecimiento de hongos y su contenido se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1. Contenido del medio de cultivo Czapeck

<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD (g/L)</b>
Urea	7.65
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.04
MgSO <sub>4</sub>	1.52
KCl	1.52

#### 3.5.2 Recuento de esporas:

Se basa en el recuento directo del número de células en un volumen determinado, prefijado en la cámara de recuento, mediante su observación al microscopio. El método no permite distinguir entre células viables y no viables. Se cuentan las conidias (esporas) presentes en los cuadros elegidos (generalmente se encuentran en los cuadros de la línea superior e inferior y en diagonal uniendo ambas líneas, formando una "Z"). También

se deben contar las conidias que están ubicadas tocando la primera de las tres líneas que se encuentran circundando el cuadro, las que se encuentran en la parte superior y la derecha del cuadro (Figura 2). Se cuentan en total 13 cuadros, cinco en cada línea (cinco arriba y cinco abajo) y tres de la diagonal que cruza el centro uniendo las líneas. Finalmente se saca el promedio (media aritmética).

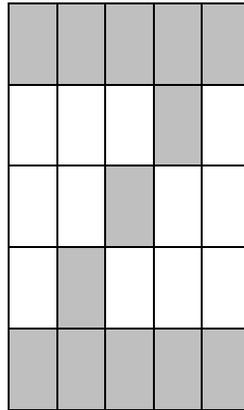


Figura 2. Conteo de esporas

El número de conidias se determina empleando la siguiente fórmula:

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

### 3.5.3 Condiciones de la fermentación:

Se emplearon columnas de PVC de 25 cm de largo X 8 cm de diámetro en las fermentaciones empleando las condiciones que se enlistan a continuación:

#### 3.5.3.1 Empaque:

Se evaluó únicamente el nivel de 80 g/L que equivale a 3.1 g de soporte que fueron las mejores condiciones obtenidas de las fermentaciones realizadas por López Guarín, 2017 en columnas de vidrio. 3 niveles 60, 80 y 100 g/L. El soporte debe ocupar del 70-80% del volumen de la columna.

#### 3.5.3.2 Fuente de nitrógeno:

La fuente de nitrógeno comúnmente empleada en el crecimiento de hongos filamentosos ( $\text{NaNO}_3$ ) fue sustituida por urea ( $\text{CH}_4\text{NO}_2$ ) empleando una concentración de 0.143 g/L según lo reportado por López-Guarín en 2017.

#### 3.5.3.3 Tamaño de partícula:

Se analizó un tamaño de partícula de 10 cm de la materia prima, evitando incluir una operación unitaria que genere costos extras para los productores.

#### 3.5.3.4 Inoculo:

Para la fermentación se inocularon  $1 \times 10^7$  esporas/mL por cada gramo de soporte empleado.

#### 3.5.3.5 Aireación:

Se evaluó un flujo de 1.2 L/min el cual fue controlado con un flujómetro y un compresor PRUTUL modelo COMP-30L-P.

### 3.5.4 Montaje de columnas:

Los hongos filamentosos requieren una humedad del 70%, la cual se suministrará a través del medio de cultivo, es decir, que por cada 3 g de soporte se requieren 7 mL de medio Czapeck (30:70), (cuadro 2).

Cuadro 2. Humedad para crecimiento del microorganismo en columna

Soporte (g)	Medio Czapeck (mL)	Humedad (%)
3.0	7.0	70
3.1	7.23	70
2.5	5.83	70
1.9	4.43	70

La figura 3 muestra la forma de llenado de las columnas.

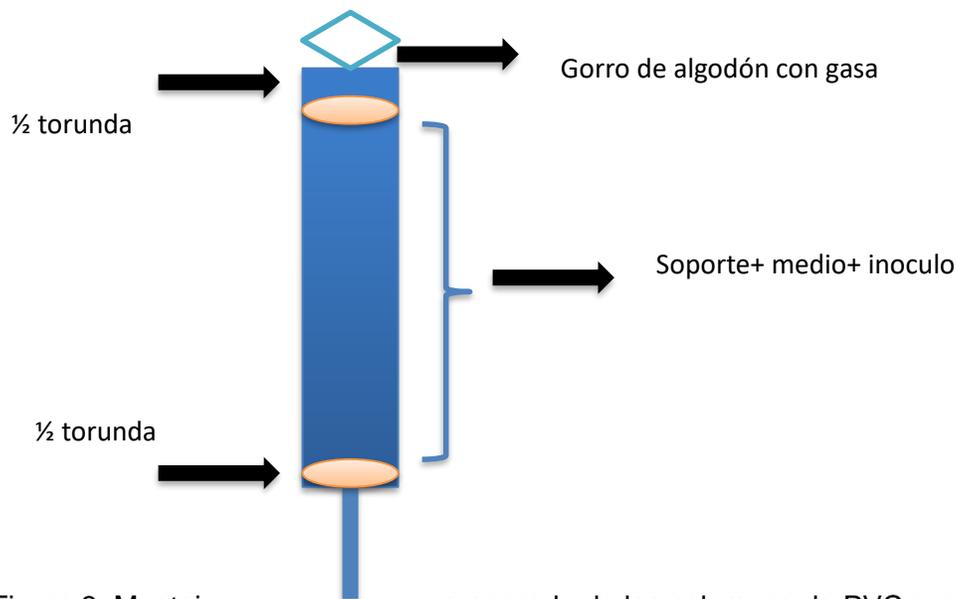


Figura 3. Montaje y preparado de las columnas de PVC para FMS

### 3.5.5 Fermentación

Se realizó una cinética de fermentación a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 196 horas. Una vez transcurrido el tiempo de fermentación se vació el empaque de la columna en un vaso de precipitado y se agregó el buffer de extracción de celulasas (ver 3.3.5.1), después de

agitar constantemente por 15 minutos. El sobrenadante se separó (extracto enzimático) y se filtró con filtros de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$ , posteriormente se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El soporte fermentado ya lavado con el buffer de extracción de celulasas se secó en una estufa a  $50^{\circ}\text{C}$  y se determinó biomasa por diferencia de peso (ver 3.3.5.2).

La figura 4 muestra el montaje de la fermentación



Figura 4. Proceso de montaje de la fermentación.

#### 3.5.5.1 Buffer de extracción de celulasas:

Se basa en la extracción de proteínas empleando un surfactante y un solvente iónico. El surfactante (en este caso el Tween-80) sirve para incrementar la permeabilidad de la célula facilitando la extracción de varias moléculas a través de la membrana celular (Silva y col, 2005). Mientras que el solvente iónico (en este caso NaCl) logra liberar la enzima unida a la superficie micelar mediante enlaces iónicos (Fadel, 2001). Se prepararon 100 mL de solución "A" (0.9 g de NaCl) y 100 mL de solución "B" (0.1 mL de Tween 80), posteriormente se juntaron la solución A y la solución B para dar un volumen final de 200 mL.

El cuadro 3 muestra el contenido de buffer a emplear por cada 3 g de soporte.

Cuadro 3. Relación de buffer extracción y soporte fermentado

<b>Soporte (g)</b>	<b>Buffer de extracción (mL)</b>
3.1	41.33
2.5	33.33
1.19	15.86

### 3.5.5.2 Determinación de biomasa:

La determinación de biomasa es una de las variables más importantes de un bioprocesos, ya que su determinación nos lleva a la comprensión de la eficiencia del mismo. Se trata de una variable clave para establecer las tasas de producción, de consumo de nutrientes y el cálculo de los balances de masa de cualquier proceso biológico (Arnaíz, 2000).

La cantidad total de biomasa presente en el material fermentado se midió en términos de peso seco por unidad de volumen, como sólidos solubles totales por diferencia de peso.

## **ETAPA III: Cuantificación de la enzima celulasa mediante FMS empleando guishe como sustrato**

### 3.6 Determinación de actividad endo-glucanasa:

En este caso se detecta la actividad de las enzimas responsable del hidrolisis de los enlaces  $\beta$ -1,4 localizados en las regiones internas de la molécula de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización.

Para esta determinación se prepararon los siguientes blancos

Blanco general.- En un tubo de ensaye se colocó 250  $\mu$ l de buffer de acetatos 0.1 M.

Blanco enzima.- En un tubo de ensaye se colocó 200  $\mu$ l de buffer más 50  $\mu$ l de extracto enzimático.

Blanco sustrato.- En un tubo de ensaye se colocó 200  $\mu$ l de sustrato (carboximetil celulosa a 1000 ppm) más 50  $\mu$ l de buffer.

Mezcla reacción.- En un tubo de ensaye se colocó 200  $\mu$ l de sustrato más 50  $\mu$ l de extracto enzimático.

Cada tubo se incubo en baño maría a 50°C durante 10 minutos y se detuvo la reacción mediante ebullición durante 5 minutos. Se determino azucares reductores mediante Miller-DNS. A cada tubo se le coloco 250 µl de muestra previamente incubada más 1000µl del reactivo DNS, y se puso en baño maría a 90°C durante 10 minutos, posteriormente se colocaron en baño con hielo para enfriar y agregar 5 ml de agua destilada a cada tubo, se agitaron para finalmente leer absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

### 3.7 Determinación de actividad exo-gluconasa:

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

Para esta determinación se prepararon los siguientes blancos

Blanco general.- En un tubo de ensaye se coloco 1 ml de buffer de acetato sódico 0.1 M.

Blanco enzima.-En un tubo de ensaye se coloco 1 ml de buffer más 50 µl de extracto enzimático.

Blanco sustrato.- En un tubo de ensaye se coloco 1 ml de buffer y una tira de papel filtro

Mezcla reacción.- En un tubo de ensaye se coloco 1 ml de buffer y una tira de papel. Se adicionan 50 µl de extracto enzimático.

Cada tubo se incubo en baño maría a 50°C durante 1 hora y se detuvo la reacción mediante ebullición durante 5 minutos. Se determino azucares reductores Miller-DNS. A cada tubo se le agrego la muestra previamente incubada más 1000µl del reactivo DNS, y se puso en baño maría a 90°C durante 10 minutos, posteriormente se colocaron los tubos en baño con hielo y se agregaron 5 ml de agua destilada a

cada tubo y se agitaron para finalmente leer absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

Posteriormente las lecturas obtenidas de las determinaciones de endo-glucanasa y de exo-glucanasa de cada repetición se transformaron en concentración de azúcares reductores mediante la ecuación obtenida de la curva de calibración

## **CAPITULO 4**

### **RESULTADOS Y DISCUSION**

#### **ETAPA I: Caracterización química de la materia prima (guishe)**

En el cuadro 4 se presentan el análisis proximal de los sustratos empleados en este estudio para ser usados como soporte en la fermentación en medio sólido (FMS); en el que se puede observar que en el caso del guishe presenta una alto contenido de fibra cruda (36%); este residuo representa el 85% del volumen total de producción de desechos a partir de *Agave lechuguilla*, por lo se podría posicionar como una innovadora alternativa de recurso para la generación de enzimas, aportando al aprovechamiento de residuos agrícolas que conforman del 30-42% de celulosa de la biomasa existente en la biosfera (Wang, 2002).

Cuadro 4. Análisis proximal de la materia prima empleada como soporte para la FMS

COMPONENTE	GUISHE
MS (%)	21.58
Humedad (%)	78.42
Cenizas (%)	3.93
Fibra cruda (%)	36.7
Extracto etéreo (%)	0.5
Proteínas (%)	0.57
Azúcares totales (g/L)	248.82
Azúcares reductores (g/L)	102.05

## **ETAPA II: Producción de la enzima celulasa mediante FMS empleando guishe como sustrato**

### 3.4 Microorganismo

El microorganismo presentó las siguientes características microscópicas: conidiales de tono negro-café, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidos. Los conidióforos son de color hialino a café típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas y quebradizas (Figura 5).

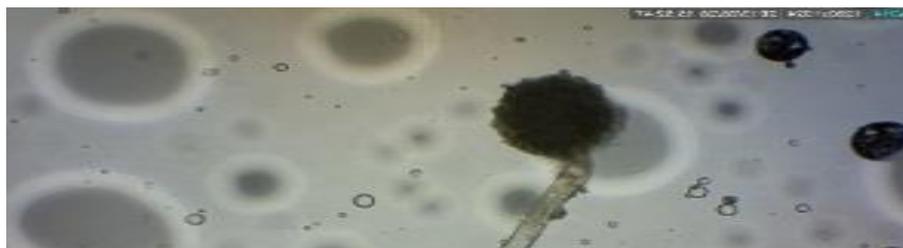


Figura 5. Morfología microscópica de la cepa M4 (*Aspergillus* sp)

### 3.5 Fermentación

Las columnas de PVC una vez esterilizadas fueron acondicionadas bajo las condiciones de estudio y fue primordial el flujo de aire para el crecimiento homogéneo del microorganismo sobre el sustrato. Para evitar contaminación de aire se emplearon filtros de 0.45  $\mu\text{m}$ . LA cinética se siguió bajo las condiciones establecidas de estudio en un sistema batch de fermentación (figura 6)



Figura 6. Sistema batch de fermentación en columnas de PVC

**ETAPA III: Cuantificación de la enzima celulasa mediante FMS empleando quishe como sustrato**

### 3.4 Determinación de actividad endo-glucanasa:

Esta enzima es la responsable de a hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4 localizados en las regiones internas de las moléculas de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización de la celulosa. La figura 7 muestra la producción de la enzima endo-glucanasa en función del tiempo, donde se observa que la máxima producción de la endo-glucanasa se presentó en la fermentación con un valor de 342 mg/L de AR a las 144 horas.

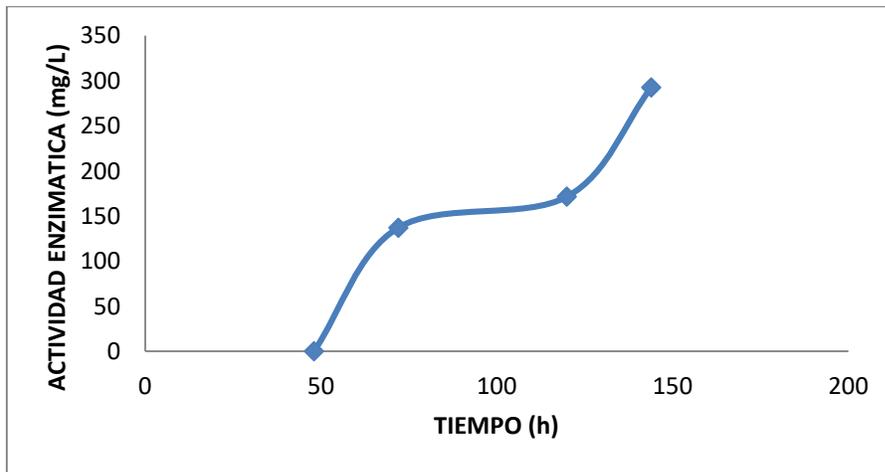


Figura 7. Producción de la enzima endo-glucanasa empleando guishe como sustrato

### 3.5 Determinación de actividad exo-glucanasa:

Esta enzima es la responsable de a hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4 localizados en las regiones externas de las moléculas de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización de la celulosa. En la figura 8 se muestra la producción de la enzima exo-glucanasa en función del tiempo, donde se observa que la máxima

producción de la endo-glucanasa se presentó en la fermentación con un valor de 250 mg/L a las 144 horas; si comparamos los resultados obtenidos con la producción de la enzima empleando columnas de vidrio de las mismas dimensiones, la producción fue menor lo cual puede ser debido a que en las columnas de vidrio existe mayor transferencia de calor y por lo tanto el acondicionamiento del hongo fue mayor para su crecimiento.

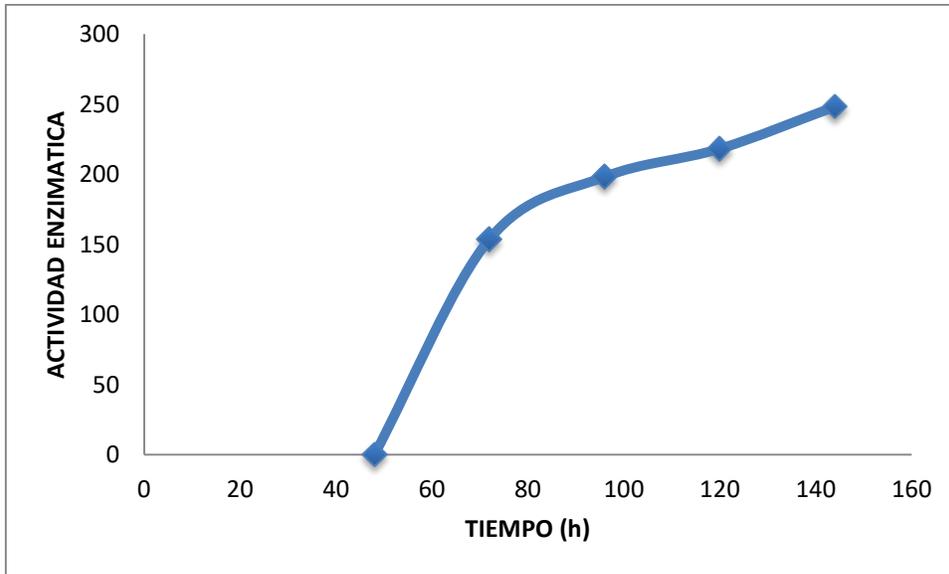


Figura 8. Producción de la enzima exo-glucanasa en columnas de PVC

### 3.6 Biomasa

La figura 9 muestra el crecimiento fúngico sobre el guishe, donde se observa que el máximo crecimiento lo presenta a las 96 h con una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.0015 g/h.

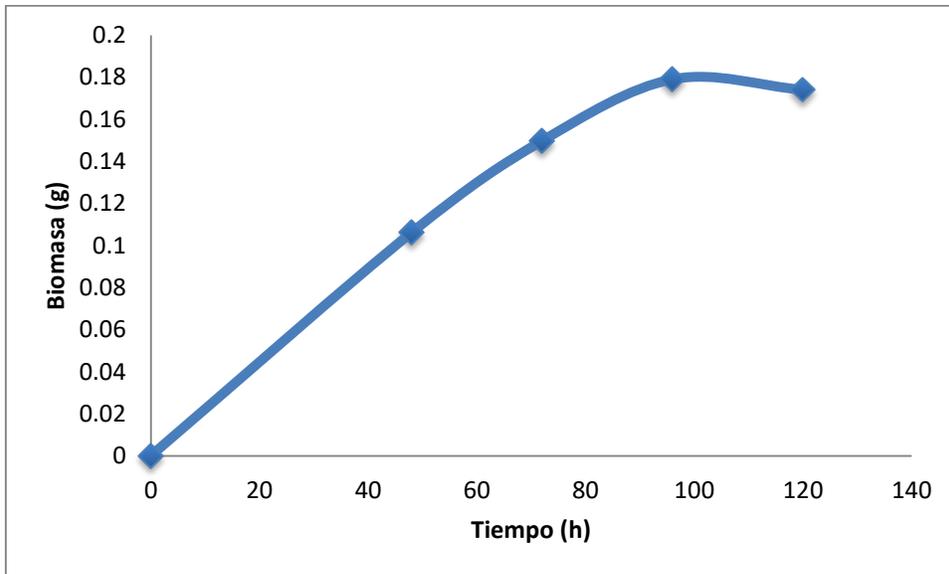


Figura 9. Formación de biomasa fúngica en FMS empleando guishe como sustrato.

## CAPITULO 5

### Conclusión

Se caracterizo químicamente el soporte empleado como materia prima (guishe). Se logro producir mediante Fermentación en medio solido la enzima celulasa empleando guishe como sustrato y un sistema batch de columnas de PVC.

Se Cuantifico el crecimiento microbiano empleando guishe como soporte el cual tubo un comportamiento semejante tanto en columnas de vidrio como de PVC.

La cepa *Aspergillus sp* (cepa M4) aislada del semi desierto de Coahuila es apta para la producción de la enzima celulasa mediante FMS empleando guishe como sustrato en columnas de PVC.

## CAPITULO 6

### Literatura citada

- J., A. N. (2015 ). Cellulase production by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* using fruit wastes as substrates . *international journal of applied microbiology and biotechnology research*.
- Kumaresan, S. H. (2015). Production Of Cellulase From Corn Cobs By *Aspergillus niger* Under Submerged Fermentation. *International Journal of ChemTech Research*.
- Ieza, r. (2007). DISEÑO DE BIORREACTORES PARA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO. *REVISTA MEXICANA DE INGENIERÍA QUÍMICA Vol. 6, 33-34*.
- Martínez Hernández, L. I. (2016). Estudio de las  $\beta$ -glucosidasas del complejo celulítico de "*Talaromyces amestolkiae*": caracterización y aplicaciones biotecnológicas.
- Raddy, G. P. (2015 ). Cellulase production by *Aspergillus niger* on different natural lignocellulosic substrates . *international journal or current microbiology and applied sciences*.
- Suarez, P. C. (2012). *caracterizacion y aprovechamiento del residuo del tallado de agave lechuguilla torrey (guishe)*. Saltillo Coahuila .

