

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

División De Ciencia Animal

Departamento Ciencia Y Tecnología De Alimentos



Optimización de temperatura para la producción de la enzima celulasa a partir de la cepa VML-2

Por:

GLORIA DINORAH ESPINOZA CUEVAS

T E S I S

Presentada como Requisito Parcial para obtener el Título de:
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenavista, saltillo, Coahuila

Abril, 2014

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

Optimización de temperatura para la producción de la enzima celulasa a partir de la cepa
VML-2

Presentado por:

GLORIA DINORAH ESPINOZA CUEVAS

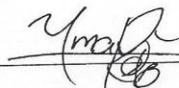
TESIS

Que Se Somete A Consideración Del H. Jurados Examinador Como Requisito Parcial
Para Obtener El Título de:

INGENIERO EN CINENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El presente trabajo ha sido dirigido por el siguiente comité:

Director



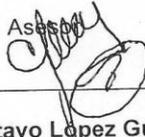
Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Asesor

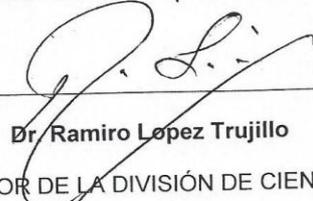


Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Asesor



M.C. Gustavo López Guarán



Dr. Ramiro Lopez Trujillo

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Buenavista, saltillo Coahuila

Mayo 2014



La emoción más hermosa y más profunda que podemos experimentar es la sensación de lo místico. Es el legado de toda ciencia verdadera. Aquel al que su emoción le es desconocida, que ya no se pregunta ni está en estática reverencia, vale tanto como si estuviera muerto. Tener el conocimiento y el sentimiento de que lo que es impenetrable para nosotros realmente existe, que se manifiesta en la suprema sabiduría y en la más radiante belleza que nuestras torpes facultades sólo pueden comprender en sus formas más primitivas, está en el centro de toda verdadera religiosidad.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A **dios**, gracias por la vida, la salud y la familia que me has dado. Gracias por permitirme concluir una etapa más en mi vida. Pero sobre todo porque me llenas de dicha y bendiciones.

A mi universidad, mi **ALMA TERRA MATER**, por abrirme sus puertas del conocimiento durante estos años, darme la oportunidad de formarme como profesionalista. Y darme la oportunidad de conocer tanta diversidad cultural.

A mi asesor de tesis, y una de las personas que más admiro, a la **Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**, por su valioso tiempo que me dedico para concluir este proyecto. Muchísimas gracias Dra., por la paciencia, confianza y disposición que me brindo y sobre todo por su admirable conocimiento, ya que sin él no hubiera sido posible concluir satisfactoriamente esta investigación.

Al **Dr. Mario Alberto Cruz Hernández**, por su atención, su tiempo y apoyo a lo largo de la realización de esta tesis.

Al **MC. Gustavo López Guarín**, por su apreciable tempo y enseñanzas ofrecidas para la elaboración de este trabajo.

A los maestros del departamento de Tecnología De Alimentos que compartieron conmigo sus conocimientos y contribuyeron en mi formación académica.

A mis grandes y mejores amigos que son como mis hermanos, por la amistad que me brindaron si pedir nada a cambio, por escucharme, apoyarme incondicionalmente, y dejarme compartir con ustedes los mejores momentos de mi vida. Gracias por todos esos años más los que faltan de sincera amistad.

DEDICATORIAS

Con amor y cariño a mis padres:

Sr. Gilberto Espinoza Montejano

Sra. Gloria Cuevas Morán

Quienes han sido la guía y el camino para poder llegar a este punto de mi carrera. Que con su ejemplo, dedicación y palabras de aliento nunca bajaron los brazos para que yo tampoco lo haga aún cuando todo se complicaba, y sobre todo perdón ante mis constantes errores. Papi,

Mami, la meta y el objetivo se cumplieron y es para ustedes.

A mi hermana B. Lizeth Espinoza Cuevas, a quien agradezco infinitamente su apoyo, y compañía en los momentos difíciles, y pero sobre todo por estar hay siempre en todo lugar.

A mis dos grandes tesoros, a los que les dedico cada segundo y esfuerzo realizado en este trabajo para poder darles sus sueños del mañana, esto es por y para ustedes mis niños

Nicolás y Gilberto.

INDICE GENERAL

Página

Resumen.....	¡Error! Marcador no definido.
1. INTRODUCCIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
1.1 Antecedentes	¡Error! Marcador no definido.
1.2 Justificación	¡Error! Marcador no definido.
1.3 Hipótesis	¡Error! Marcador no definido.
1.4 Objetivo general.....	¡Error! Marcador no definido.
1.5 Objetivos específicos	¡Error! Marcador no definido.
2. REVISION DE LITERATURA	¡Error! Marcador no definido.
2.1 Enzimas.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1.1 Nomenclatura y clasificación de las enzimas.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1.2 Estructura de las enzimas	¡Error! Marcador no definido.
2.1.3 Tipos de enzimas.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2 Celulosa	¡Error! Marcador no definido.
2.2.1 La celulosa: el polisacárido natural más abundante en la naturaleza¡Error!	Marcador no definido.
2.2.2 Enzimas implicadas en la degradación de celulosa.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3 Celulasa	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3.1 Características de la Enzima Celulasa. ...	¡Error! Marcador no definido.
2.2.4 Microorganismos que degradan celulosa.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.5 Modo de acción.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.6 Aplicaciones Industriales de celulasas.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3 Caracterización físico-química de la celulasa ...	¡Error! Marcador no definido.
2.3.1 pH y peso molecular	¡Error! Marcador no definido.
2.3.2 Sustrato	¡Error! Marcador no definido.
2.3.3 Inoculo.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.4 Temperatura	¡Error! Marcador no definido.
2.4 Cinética enzimática.....	¡Error! Marcador no definido.
2.4.1 Enzima-sustrato	¡Error! Marcador no definido.
3. Materiales y métodos	¡Error! Marcador no definido.
3.1 Material biológico.....	¡Error! Marcador no definido.

- 3.2 Preparación de medio solido. **¡Error! Marcador no definido.**
- 3.3 Siembra en medio solido..... **¡Error! Marcador no definido.**
- 3.4 Morfología microscópica y macroscópica del la cepa VML-2.... **¡Error! Marcador no definido.**
 - 3.4.1 Morfología microscópica: Tinción de Gram..... **¡Error! Marcador no definido.**
 - 3.4.2 Morfología macroscópica: **¡Error! Marcador no definido.**
- 3.5 Fermentación para la producción del extracto enzimático.... **¡Error! Marcador no definido.**
 - 3.5.1 Preparación del medio liquido específico para la producción de celulasa **¡Error! Marcador no definido.**
 - 3.5.2 Curva de crecimiento **¡Error! Marcador no definido.**
 - 3.5.3 Producción de celulasa..... **¡Error! Marcador no definido.**
 - 3.5.4 Cuantificación de proteína extracelular y celular **¡Error! Marcador no definido.**
 - 3.5.5 Cinética enzimática: **¡Error! Marcador no definido.**
 - 3.5.6 Determinación de azúcares reductores (Somogy-Nelson) **¡Error! Marcador no definido.**
- 4. **RESULTADOS Y DISCUSION** **¡Error! Marcador no definido.**
 - 4.1 Morfología microscópica y macroscópica del la cepa VML-2.... **¡Error! Marcador no definido.**
 - 4.2 Curva de crecimiento en medio específico..... **¡Error! Marcador no definido.**
 - 4.3 Curva de crecimiento en medio liquido específico (carboximetil celulosa) para la producción de celulasa..... **¡Error! Marcador no definido.**
 - 4.4 Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret. **¡Error! Marcador no definido.**
 - 4.5 Curva de crecimiento en medio liquido específico (carboximetil celulosa) para la producción de células con temperatura de 37°C y 41°C. **¡Error! Marcador no definido.**
- 5. **CONCLUSIONES**..... **¡Error! Marcador no definido.**
- 6. **REFERENCIA BIBLIOGRAFICA**..... **¡Error! Marcador no definido.**

INDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Ejemplo de nombre según la Comision Enzimatica. **¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 2. Hongos celuloliticos **¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 3. Bacterias celuloliticas mas abundantes **¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 4. Bacterias aerobias **¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 5. Acetomicetes

Cuadro 6. Bacterias con alta Actividad Especifica de celulasas..... **¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 7. Hongos con alta Actividad Especifica de celulasas. **¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 8. Peso moleculares de enzimas **¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 9. Morfología micro y macroscópica de la cepa VML-2 **¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 10. Tinción de Gram. **¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 11. Composición del medio líquido específico para la producción de celulasa **¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 12. Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret. **¡Error! Marcador no definido.**

Cuadro 13. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa..... **¡Error! Marcador no definido.**

INDICE DE FIGURES

Página

- Figura 1. Estructura primaria de una enzima..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 2. Estructura secundaria de una enzima .. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 3. Estructura secundaria de una enzima .. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4. Estructura secundaria de una enzima .. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 5. Estructura química de la celulosa..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 6. Sistema enzimático de la degradación de celulosa... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 7. Degradación enzimática de la celulosa **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 8. Saturación del enzima por el sustrato. . **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 9. Ecuación enzima-sustrato. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 10. Complejo enzima-sustrato..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 11. Cepa VML-2 cultivos puros y liofilizados. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 12. Siembra por medio de estría abierta cruzada. ...**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 13. Condiciones de anaerobiosis para el crecimiento de las enzimas.
.....**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 14. Muestra seca para ser observada bajo microscopio. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 15. Muestra observada bajo microscopio a 100X**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 16. Producción de celulasa.**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 17. Cuantificación de proteína extracelular y celular..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 18. Cinética enzimática**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 19. Determinación de azúcares reductores mediante la técnica de Somogy Nelson.**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 20. Cepa MVL-2, purificada.....**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 21. tincion de gram lista para ser obrevada bajo microscopio..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 22. Bacilos G(-)**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 23. Placa con Cepa VML-2**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 24. Curva de crecimiento de la cepa VML-2 en medio liquido específico con carboximetil celulosa a 39°C**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 25. Cuantificación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa MVL-2**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 26. Curva de crecimiento de la cepa VML-2 en medio liquido específico con carboximetil celulosa a 37°C, 41°C**¡Error! Marcador no definido.**

Resumen.

En la actualidad y con los grandes avances de la ciencia, las enzimas están siendo utilizadas en diferentes aéreas de la industria, en donde se requiere el uso de catalizadores muy especializados. Sin embargo, las enzimas están limitadas tanto por el número de reacciones que pueden llevar acabo como por su ausencia de estabilidad, altas temperaturas y solventes orgánicos.

Por otro lado, el rumen que es un ecosistema único donde los microorganismos anaerobios (bacterias, protistas y hongos) digieren alimentos insolubles como celulosa y almidón produciendo así ácidos grasos volátiles que utilizan los rumiantes, requieren un ambiente tibio, húmedo, neutro o cercano a la

neutralidad (pH) y libre de oxígeno para poder crecer de manera adecuada, este tipo de ambiente se conserva natural en el rumen con un rango de temperatura entre 38 y 42° C. Si el ganado se alimenta de modo apropiado, el pH debe variar entre 5.8 y 6.4, lo cual permite el crecimiento de muchas especies de bacterias.

Dado que la economía de la alimentación humana depende en gran manera de estos animales, la flora microbiana del rumen tiene un significado económico considerable e indudablemente, una gran importancia por los beneficios nutricionales que aporta a los rumiantes.

En la presente investigación se evaluarán los microorganismos de la cepa ruminal VML-2 a tres diferentes temperatura para determinar cuál es la óptima para la estandarización del proceso y así obtener un extracto enzimático llevando a cabo una fermentación.

La investigación se dividió en dos etapas donde la cepa VML-2 fue tomada de cultivos puros y liofilizados pertenecientes al cepario del Departamento de Producción Animal.

Se prepararon cajas petri con agar Schaedler, se realizaron siembras por estría abierta cruzada sobre el medio de cultivo, incubando a 37°C \pm 2 por un periodo de 5 semanas bajo condiciones de anaerobiosis utilizando botes de plástico con tapa y colocando una vela prendida, creando así las condiciones ideales para el crecimiento de las enzimas.

Se realizó la técnica de tinción de Gram para observar las características morfológicas de los microorganismos empleados.

Se preparó medio líquido específico para inducir el crecimiento de la producción de celulasa, en 9 matraces Erlenmeyer de 250mL, se hizo una suspensión celular, de cada matraz se dejaron incubando a 37°C, 39°C y 41°C, realizando anaerobiosis. Se tomaron muestras cada 24 horas, por un tiempo de 360 horas. Los experimentos se realizaron por triplicado, se leyó curva de crecimiento a 590nm, posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm por 30min, con la finalidad de separar el extracto enzimático de la biomasa.

Se diseño un medio especifico para la producción de la enzima celulasa, empleando como única fuente de carbono carboximetil celulosa. Se realizo una curva de crecimiento en medio liquido especifico, en donde la fase exponencial se observo en las primeras horas de fermentación (24 horas), con una $\mu=0.9047\text{DO/h}$.

Se determino el contenido de proteína extracelular por el método de biuret, donde se aprecio que la mayor concentración de proteína se obtiene a las 120 horas de fermentación.

La curva de crecimiento de la enzima celulasa con temperatura de de 37°C alcanza su fase exponencial en las primeras 12 horas de fermentación, siendo esta su punto máximo de crecimiento, mientras que con temperatura de 41°C, alcanza su fase exponencial 120 horas, siendo este su punto máximo de crecimiento.

Palabras clave: *optimización de temperatura, aislamiento, actividad y producción celulasa.*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

A mediados del siglo XIX el viejo fenómeno de la fermentación comenzó a ser interpretado como el resultado de la actividad celular.

Büchner y Pasteur sostuvieron una famosa polémica sobre la naturaleza de la fermentación alcohólica. El centro de la polémica concernía en si la fermentación requería necesariamente que existiesen células vivientes mientras se llevaba a cabo, o si por el contrario, era posible realizarla a partir de sustancias extraídas de las células. Los experimentos mostraron que si era posible y le dieron la razón a Büchner. Para lograr fermentaciones en ausencia de células era necesario extraer de estas ciertas sustancias desconocidas, que

promuevan las etapas de la fermentación. Estas sustancias desconocidas fueron llamadas “fermentos” o “diastaseas”, y luego enzimas, nombre que finalmente persistió.

Un hallazgo fundamental fue que las enzimas eran catalizadores, esto es, sustancias que aceleran la velocidad de una reacción química, y que luego de la reacción resultan inalteradas y pueden ser reutilizadas. Otro hallazgo fue que estos catalizadores eran afectados (y eventualmente inactivados) por el pH y la temperatura. Un tercer hallazgo fue que eran refinadamente específicos respecto a las sustancias sobre las que actuaban: podrían, por ejemplo, reconocer a sólo uno de un par de isómeros ópticos (Mizraji 1999).

Por otro lado, los rumiantes son animales que tienen un órgano digestivo especial, el rumen que es un ecosistema único donde los microorganismos anaerobios digieren alimentos insolubles como celulosa y almidón. Las bacterias, protistas y hongos del rumen producen ácidos grasos volátiles que utilizan los rumiantes, así como sintetizan vitaminas y aminoácidos. Dado que la economía de la alimentación humana depende en gran manera de estos animales, la flora microbiana del rumen tiene un significado económico considerable e indudablemente, una gran importancia por los beneficios nutricionales que aporta a los rumiantes (Hobson 1999).

El rumen es un tanque de fermentación que puede contener entre 160 a 240 litros de material y es el sitio donde actúan los microorganismos. Se estima que una cucharada de contenido ruminal tiene hasta 150 millones de microorganismo presentes: bacterias, protozoarios y hongos. Las bacterias rúmiales requieren un ambiente tibio, húmedo, neutro o cercano a la neutralidad (pH) y libre de oxígeno para poder crecer de manera adecuada, este tipo de ambiente se conserva natural en el rumen con un rango de temperatura entre 38 y 42° C. si el ganado se alimenta de modo apropiado, el pH debe variar entre 5.8 y 6.4, lo cual permite el crecimiento de muchas especies de bacterias (Arreaza 1999).

1.2 Justificación

Los microorganismos ruminales capaces de producir enzimas de interés biotecnológico son blanco de estudio debido a que a nivel industrial el empleo de enzimas en la alimentación animal es escasa, por lo que su producción y uso representan un área de oportunidad para la producción de las mismas a nivel semi-preparativo y piloto, así como su empleo para el aprovechamiento efectivo del alimento en las dietas suministradas a los animales.

1.3 Hipótesis

Es posible que los microorganismos de la cepa VML-2 tienen una mejor producción de la enzima celulasa a una temperatura de 39°C.

1.4 Objetivo general

Evaluar los microorganismos de la cepa ruminal VML-2 a tres diferentes temperatura y determinar cuál es la optima para la estandarización del proceso.

1.5 Objetivos específicos

- a) Caracterización micro y macroscópica de la cepa VML-2.
- b) Producir un extracto celolítico a partir de la cepa VML-2 extraída del rumen bovino.
- c) Realizar una cinética enzimática a tres temperaturas: 37, 39 y 41°C.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Enzimas

Las enzimas son catalizadores de origen proteico producidas por los organismos vivos. Cada reacción que se lleva a cabo en la célula es catalizada por una enzima en particular, por lo tanto, en una célula se encuentran un gran número de enzimas. Estas funcionan como catalizadores de las reacciones químicas vitales que, sin su presencia no se desarrollarían sino en un periodo de años y por lo que la vida no podría existir. Por lo tanto, 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. En contraste, los catalizadores industriales (sustancias

inorgánicas) están dotados de inferior eficacia que las enzimas. (Barragán 1999)

2.1.1 Nomenclatura y clasificación de las enzimas

Antiguamente, las enzimas recibían nombres particulares, asignados por su descubridor. Al ir aumentando el número de enzimas conocidas, se hizo necesaria una nomenclatura sistemática que informara sobre la acción específica de cada enzima y los sustratos sobre los que actuaba. Sin embargo, no todos los nombres dados a las enzimas siguen esta regla:

El Sustrato Preferente + Acción Típica + Terminación "Asa".

Ante la necesidad de establecer una nomenclatura inequívoca para las enzimas, se creó una Comisión Enzimática para establecer unas normas que permitan nombrar las enzimas. Así, el nombre de cada enzima consiste en un código alfanumérico, encabezado por las letras EC (de Enzyme Commission), seguido de cuatro números separados por puntos.

- El **primer número** corresponde a cada una de las seis grandes clases o grupos en que se han dividido las enzimas, en función de su acción catalítica específica.
- El **segundo número** hace referencia a las distintas subclases dentro de cada clase, y
- El **tercero** y el **cuarto** se refieren a los grupos químicos específicos que intervienen en la reacción. Un ejemplo se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1. Ejemplo de nombre según la Comisión Enzimática.

ATP: glucosa fosfotransferasa se define como:	
EC 2.7.1.1	<ul style="list-style-type: none">• El número 2 nos indica que es una transferasa• el 7 que es una fosfotransferasa• primer 1 indica que el aceptor es un grupo OH• y el segundo 1 indica que es la D-glucosa la que acepta el grupo fosfato.

2.1.2 Estructura de las enzimas

El conocimiento de la estructura y característica de las proteínas son imprescindibles para una correcta utilización y manipulación de los alimentos

que las contienen. En teoría, a partir de los veinte aminoácidos naturales, se podrían sintetizar un número infinito de proteínas. Sin embargo, se estima que en la naturaleza existen unas dos mil, aunque esta cifra es algo inferior si se consideran las pequeñas variaciones de una misma proteína según sea la especie considerada

- Estructura **primaria**: secuencia o cadena de aminoácidos que determina la proteína, si varía el orden, el número, o el tipo de aminoácidos, cambia la proteína.



Figura 1. Estructura primaria de una enzima

- Estructura **secundaria**: la cadena de aminoácidos se dobla o pliega adquiriendo una forma de lámina plegada o de hélice.



Figura 2. Estructura secundaria de una enzima

- Estructura **terciaria**: la proteína adquiere una forma tridimensional



Figura 3. Estructura secundaria de una enzima

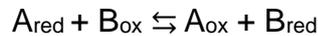
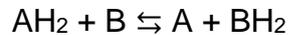
- Estructura **cuaternaria**: está constituida por dos o más cadenas de aminoácidos replegadas.



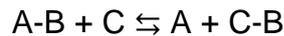
Figura 4. Estructura secundaria de una enzima

2.1.3 Tipos de enzimas

- Clase 1: **OXIDORREDUCTASAS**. Catalizan las reacciones de oxidorreducción, es decir, de transferencia de hidrógeno (H) o de electrones (e-) de un sustrato a otro, según la reacción general:



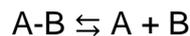
- Clase 2: **TRANSFERASAS**. Catalizan la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) de un sustrato a otro, según la reacción:



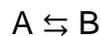
- Clase 3: **HIDROLASAS**. Catalizan las reacciones de hidrólisis:



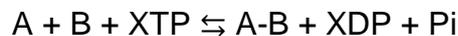
- Clase 4: **LIASAS**. Catalizan reacciones de ruptura o unión química de sustratos:



- Clase 5: **ISOMERASAS**. Catalizan la interconversión de isómeros:



- Clase 6: **LIGASAS**. Catalizan la unión de dos sustratos con hidrólisis simultánea de un nucleótido trifosfato (ATP, GTP, etc.):



2.2 Celulosa

2.2.1 La celulosa: el polisacárido natural más abundante en la naturaleza

La celulosa es el principal componente de la membrana celular de la mayor parte de las plantas. Una célula vegetal joven contiene aproximadamente un 40% de celulosa y la madera un 50 %. El ejemplo más representativo lo constituye el algodón que contiene más de 90% de celulosa.

Teniendo en cuenta su estructura química, se define como un polisacárido lineal formado por residuos de glucosa unidos por enlaces beta 1-4 (β -1,4). La configuración β , le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales se presentan unidas entre sí por medio de enlaces de puentes de hidrógeno dando lugar a la formación de microfibrillas. Estas regiones, conocidas como regiones cristalinas, son altamente ordenadas y le dan las

características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático. (<http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=102>)

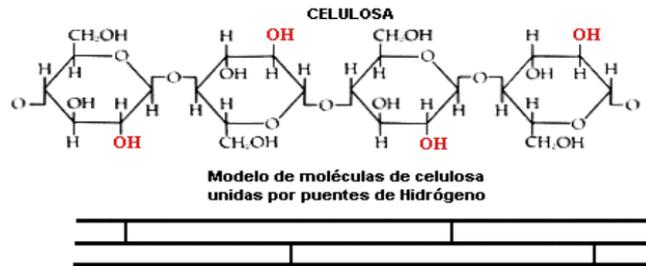


Figura 5. Estructura química de la celulosa

Los animales superiores son incapaces de desdoblar esos enlaces y por lo tanto no pueden utilizar la celulosa; sin embargo, los rumiantes pueden digerir grandes cantidades de forraje, gracias a la acción de microorganismos simbiotes presentes en el rumen.

2.2.2 Enzimas implicadas en la degradación de celulosa

Los microorganismos capaces de degradar celulosa secretan un sistema complejo de enzimas extracelulares, **celulasas** y **xilanasas**, que actúan en forma conjunta en la degradación de celulosa y hemicelulosa (los dos componentes principales de la madera).

Las fibras de celulosa son degradadas esencialmente por dos tipos de sistemas enzimáticos llamados agregativos y no agregativos, como se muestra en la siguiente figura:



Figura 6. Sistema enzimático de la degradación de celulosa

- Sistemas agregativos:

En algunas bacterias anaerobias que degradan celulosa y hemicelulosa, como *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”. Este complejo comprende al menos 14 polipéptidos distintos, incluyendo varias celulasas y xilanasas y al menos una β -glucosidasa, unidos a una proteína sin actividad enzimática, pero que participa en el reconocimiento de las fibras de celulosa a la superficie de la célula. Esta proteína, llamada proteína de unión a celulosa (CbpA: *cellulose binding protein A*), es necesaria para, junto con las enzimas hidrolíticas, romper las estructuras amorfas de celulosa pero no las formas cristalinas del polímero.

- Sistemas no agregativos:

Estos sistemas están compuestos principalmente por tres tipos de enzimas que actúan en forma sinérgica (juntas, en forma cooperativa) en la degradación de celulosa.

- Endoglucanasas E.C.3.2.1.4

La *endoglucanasa* descompone los enlaces internos β -1,4 y así altera la estructura cristalina de la celulosa y expone las cadenas polisacáridas de celulosa individual.

- Exoglucanasas E.C.3.2.1.91

La *exoglucanasa* parte de a 2 o 4 unidades de glucosa desde los extremos de las cadenas expuestas producidas por la endoglucanasa, produciendo tetrasacáridos o disacáridos como la celobiosa.

- Celobiasas E.C.3.2.1.21

La *celobiasa* hidroliza estos productos, obteniendo los monosacáridos individuales de glucosa.

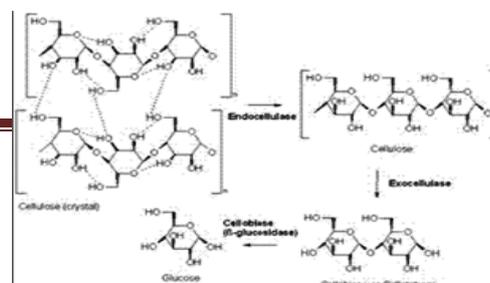


Figura 7. Degradación enzimática de la celulosa

2.2.3 Celulasa

2.2.3.1 Características de la Enzima Celulasa.

La celulasa es una glicosil hidrolasa, producida por hongos, bacterias y protozoos que catalizan celulolisis, así como también algunos animales. Esta enzima posee un rol muy importante en la biosfera, ya que es responsable de la degradación de la celulosa, la que comprende la fuente de carbono más abundante en la tierra. Este polímero es un homopolisacárido (compuesto por un solo tipo de monómero) rígido e insoluble, que contiene hasta cientos de miles de unidades de glucosa, unidas mediante enlaces del tipo β -1,4-glucosídico.

Estas enzimas han sido clasificadas según su actividad en:

- Endoglucanasas, las cuales hidrolizan los enlaces 1,4- β –glucosidicos en forma aleatoria en el interior de la cadena;
- Celobiohidrolasas o exoglucanasas, encargadas de hidrolizar los enlaces 1,4- β - glucosidicos, liberando celobiosa desde los extremos no reducidos de la cadena; y
- β -glucosidasas, que catalizan la hidrólisis de la celobiosa liberando β -D-glucosa.

En el caso más familiar de la actividad celulasa, los saltos de complejos enzima descompone la celulosa a beta-glucosa. Este tipo de celulasa se produce principalmente por bacterias simbióticas en las cámaras de los herbívoros rumiantes. Aparte de los rumiantes, la mayoría de los animales no producen celulasas en sus cuerpos y pueden romperse parcialmente la celulosa a través de la fermentación, lo que limita su capacidad para utilizar la energía de material vegetal fibroso. Las enzimas que hidrolizan la hemicelulosa se refieren

generalmente como hemicelulosa y por lo general se clasifican en celulosa en general. Las enzimas que escinden lignina son en ocasiones clasificadas como celulasa, pero esto generalmente se considera erróneo.

Dentro de la celulasas se encuentran dos tipos:

- Celulasa Progresivos: continuará para interactuar con un solo filamento de polisacáridos,
- Celulasa no progresiva va a interactuar a continuación, una vez que desenganchar y enganchar otra cadena de polisacárido.

La mayoría de las celulasas fúngicas tienen una estructura de dos dominios, con un dominio catalítico y un dominio de unión a celulosa, que están conectados por un enlazador flexible. Esta estructura está adaptada para trabajar en un sustrato insoluble, y permite que la enzima se difunda en dos dimensiones sobre una superficie en una oruga-como la moda. Sin embargo, también son las celulasas que carecen de dominios de unión a celulosa. Estas enzimas pueden tener una función de hinchazón.

En muchas bacterias, celulasas en vivo son estructuras enzimáticas complejas organizadas en complejos supramoleculares, los celulosomas, contienen aproximadamente cinco diferentes subunidades enzimáticas que representan a saber endocelulasas, exocelulasas, celobiasas, celulasas oxidativo y fosforilasas celulosa en los que sólo endocelulasas y celobiasas participan en la hidrólisis real de la vinculación. (Marín. Romelia. 2007. Caracterización y exprecion recombinante de una celulasa de origen antártico. Universidad de Chile. Tesis de licenciatura)

2.2.4 Microorganismos que degradan celulosa.

Los microorganismo degradadores de celulosa incluyen hongos y bacterias, aerobios y anaerobios, mesofílicos y termofílicos que ocupan una variedad de hábitats (Aubert, 1988).

Entre los hongos celulolíticos se destacan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Hongos celulolíticos

<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Trichoderma koningii</i>	<i>Sporotrix sp</i>
<i>Mucor sp</i>	<i>Cladosporium sp</i>	<i>Bulgaria sp</i>
<i>Chaetomium sp</i>	<i>Helotium sp</i>	<i>Asprgillus sp</i>

Las bacterias celulolíticas más abundantes y conocidas son las aerobias entre las cuales se puede citar en el siguiente cuadro:

Cuadro 2. Bacterias celulolíticas mas abundantes

<i>Cellulomonas sp</i>	<i>Microbispora</i>	<i>Bispora</i>
<i>Thermomonospora sp</i>	<i>Thermobifida sp</i>	

Además se encuentran algunos anaerobios como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 3. Bacterias aerobias

<i>Acetivibrio</i>	<i>Cellulolyticus</i>	<i>Butirivibrio sp</i>
<i>Baceteroides</i>	<i>Cellulosolvens</i>	<i>Bacteroides succinogenes</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Cellulovorans</i>	<i>Clostridium thermocellum</i>
<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	

Entre los actinomicetes se destacan en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Acetomicetes

<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	<i>Streptomyces cellulolyticus</i>	<i>Thermonospora curvata</i>
<i>Thermonospora chromogena</i>	<i>Thermonospora alba</i>	<i>Thermomobifida fusca</i>

(Gaitan. Diana. 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Pontifica Universidad Javeriana. Tesis de licenciatura)

2.2.5 Modo de acción

Para el modo de acción de cada enzima en la hidrólisis de la celulosa, es necesario el fraccionamiento y aislamiento de los componentes individuales de la celulasaa en sus formas purificadas. Las técnicas electroforéticas representan en el momento las herramientas adecuadas para tales fines dado que permiten trazar perfiles moleculares de los mutantes y permiten también hacer un seguimiento de la cantidad y tipo de isoenzimas que se secretará durante el curso de una fermentación. (Revista de ciencia biológicas, Biota Vol XVII.)

2.2.6 Aplicaciones Industriales de celulasas.

Las celulasas y enzimas relacionadas son utilizadas en industrias alimenticias, de cervecería, de vino, alimentación animal, textil, de detergentes, del papel, así como también en la agricultura y en investigaciones. Esta gran gama de aplicaciones hacen a estas enzimas muy atractivas y demuestran su enorme valor comercial en la industria biotecnológica. (Marín. Romelia. 2007. Caracterización Y Expresión Recombinante De Una Celulasaa De Origen Antártico. Universidad De Chile. Tesis De Licenciatura.)

2.3 Caracterización físico-química de la celulosa

2.3.1 pH y peso molecular

Se considera que un pH ruminal superior a 6.2 es el óptimo para obtener una buena digestión de celulosa (Rodríguez y Llamas 1990). La importancia de la amortiguación del pH a nivel ruminal tiene la finalidad de mantener el metabolismo de los microorganismos ruminales en un rango óptimo para su crecimiento. La modulación del pH ruminal es uno de los efectos de *S. cerevisiae*, no obstante, en los estudios de Andrig-hetto *et al* (1993), Aveldaño *et al* (1995) y Ángeles *et al.* (1995) el pH ruminal no se modulo y se observo disminución, lo que sugiere que la actividad de las bacterias celulolíticas también pudo disminuir. De acuerdo con Gedek *et al.* (1993), Zeleñak *et al.*

(1994), y Hernandez (1999), el pH no mostro diferencias por la adición de levaduras; aunque, Kumar *et al.* (1994) menciona que la suplementacion con levaduras incrementa el pH a nivel ruminal.

El pH óptimo para la actividad de las celulasas producidas por bacterias abarca un amplio rango, el cual incluye condiciones ácidas y alcalinas (cuadro 5). Por otro lado, las celulasas producidas por hongos requieren generammente un pH acido (cuadro 6).

Cuadro 5. Bacterias con alta Actividad Especifica de celulasas

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

(Howard et al., 2003)

Cuadro 6. Hongos con alta Actividad Especifica de celulasas.

Microorganismos	Actividad específica ($\mu\text{mol. min}^{-1}. \text{mg}^{-1}$)	pH optimo
<i>Sclerotium rolfsii</i>	475	3.3
<i>aspergillus niger</i>	194	5
<i>Achlya bisexualis</i>	7840	6
<i>Orpinomyces sp.</i>	3659	5.8
<i>Rizhopus chinensis</i>	4800	ND
<i>Penicillum brefeldianum</i>	405	4-2

(Howard et al., 2003)

N.D. No determinado

Mientras que el tamaño físico de las enzimas varía considerablemente. Con el objeto de que las enzimas puedan funcionar, sus redes de proteínas necesitan ser mantenidas en trayectorias bastante rígidas. Estas cadenas de polipeptidos o unión de cadenas poseen centros activos, los cuales consisten de todos los residuos de aminoácidos, como también de cadenas laterales, necesarias para un modo particular de enlace al sustrato.

Por otro lado hay pesos moleculares publicados para las enzimas industriales más comunes que varían desde alrededor de 20,000 a 250,000 Daltons (cuadro 10), como se muestra en el siguiente cuadro: (Dykstra 1996)

Cuadro 10. Peso moleculares de enzimas

<ul style="list-style-type: none">• Peso mínimo de 7,000 requerido para que una enzima funcione como catalizador estable en la degradación de sustratos comunes estables	
• Alfa-amilasa	67,000 – 76,000
• Celulasas	23,000 – 35,000
• TAG lipasas	33,000 – 35,000
• Proteasas	27,300 – 27,500
• Xilanasas	101,000 – 253, 000

2.3.2 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).

2.3.3 Inoculo

Reportes de la literatura mencionan que el objetivo del presente estudio (influencia de la concentración de inoculo en la producción de celulasas y xilanasas por *Aspergillus niger*) fue evaluar la influencia de la concentración de

inóculo en la morfología y producción de celulasas y xilanasas con *A. niger* en cultivo sumergido. Para ello, fueron inoculados matraces de 250 mL con 40 mL de medio con 3% (v/v) de una suspensión de 104 o 108 esporas por mililitro e incubados a 28 °C y 175 rpm durante 120 horas. Se utilizaron 10 g*L⁻¹ de lactosa como fuente de carbono. En cada caso se determinó la cantidad de biomasa, la proteína extracelular soluble, lactosa residual, actividad celulasa total y xilanasas cada 24 horas. Aunque no hubo un efecto notorio en la morfología de crecimiento, salvo en el color y el diámetro de pellets obtenidos, sí se afectó la μ_{max} (0,06 y 0,03 h⁻¹ para 104 y 108 esporas*mL⁻¹, respectivamente) y la concentración máxima de biomasa. Además, mientras que las productividades volumétricas de celulasa (Γ_{FPA}) (8,2 y 8,0 UI.*L⁻¹*h⁻¹ para 104 y 108 esporas*mL⁻¹, respectivamente) fueron similares para ambos inóculos, la productividad de xilanasas (Γ_{XIL}) fue mayor para el inóculo más concentrado (29,7 y 33,4 UI**L⁻¹*h⁻¹ para 104 y 108 esporas*mL⁻¹, respectivamente). Los resultados indican que la productividad de celulasas y xilanasas está estrechamente relacionada con la concentración de inóculo. (Izarra 2010)

2.3.4 Temperatura

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

2.4 Cinética enzimática

2.4.1 Enzima-sustrato

Los enzimas actúan de acuerdo con los mismos principios generales que los demás catalizadores: aumentan la velocidad de las reacciones químicas combinándose transitoriamente con los reactivos de manera que estos alcanzan un estado de transición con una energía de activación menor que el

de la reacción no catalizada. Hay que destacar sin embargo que los enzimas son mucho más eficaces que cualquier catalizador artificial conocido. Se ha podido comprobar que los aumentos de velocidad que producen son de entre 10^7 y 10^{14} veces la velocidad de la reacción no catalizada. La actividad molecular (número de moléculas de sustrato transformadas por una sola molécula de enzima por minuto) de distintos enzimas oscila entre unos pocos miles y varios millones de moléculas de sustrato por minuto.

Los métodos experimentales para conocer la actividad catalítica de las enzimas son cada vez más complejos y sofisticados. Sin embargo, el método más antiguo utilizado en enzimología, desarrollado por Leonor Michaelis y Maud Menten, y que en la actualidad sigue siendo de gran utilidad, consiste en analizar como varía la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente en función de algunos parámetros experimentales como la concentración del sustrato o la del propio enzima, lo que globalmente se conoce con el nombre de **cinética enzimática**.

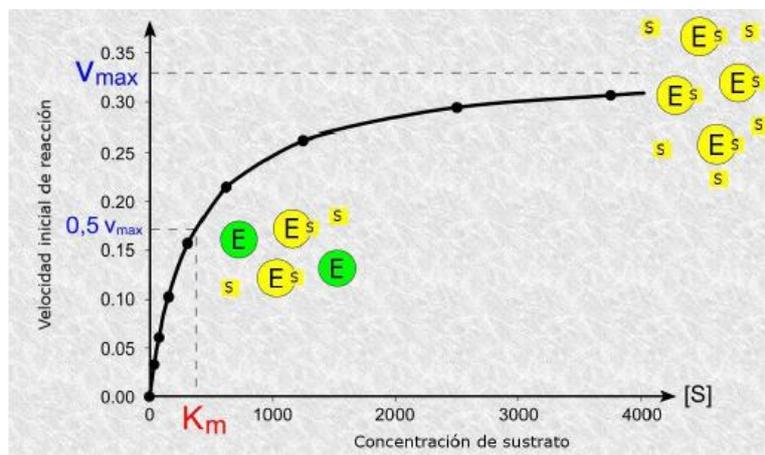


Figura 8. Saturación del enzima por el sustrato.

La cinética de las reacciones catalizadas por enzimas muestra un rasgo característico que no se observa en las reacciones no enzimáticas: **la saturación** del enzima por el sustrato (Figura 8). Cuando se mide la velocidad inicial de una reacción catalizada enzimáticamente se observa que para concentraciones de sustrato bajas la velocidad de reacción es proporcional a dicha concentración, como ocurre con carácter general para las reacciones no enzimáticas. A medida que la concentración de sustrato aumenta la velocidad

de reacción deja de ser proporcional a ésta. Con un aumento posterior la velocidad de reacción llega a ser totalmente independiente de la concentración del sustrato y se aproxima asintóticamente a un valor máximo que es característico de cada enzima y que se conoce como **velocidad máxima**. Se dice entonces que el enzima se halla saturado por el sustrato. La concentración de sustrato a la cual la reacción alcanza la mitad de su velocidad máxima se conoce con el nombre de **KM** (*constante de Michaelis-Menten*). KM es un valor característico de cada enzima y constituye una medida de la afinidad del enzima por el sustrato: valores bajos de KM indican una alta afinidad mientras que valores altos representan una baja afinidad.

El efecto de saturación del enzima por el sustrato condujo a los primeros investigadores de la cinética enzimática, incluso antes de que se conociera la naturaleza proteica de los enzimas, a formular la hipótesis, hoy corroborada, de que el enzima y el sustrato se combinan de modo transitorio para formar un **complejo enzima-sustrato** (Figura 10) en el que se alcanza el estado de transición con mayor probabilidad que en la reacción no catalizada. Una vez

Alcanzado dicho estado el complejo enzima-sustrato se descompone para dar lugar a los productos y el enzima libre según se refleja en la siguiente ecuación (figura 9):

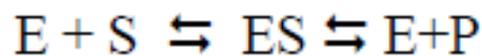


Figura 9. Ecuación enzima-sustrato.

El enzima, una vez liberado, puede combinarse con una nueva molécula de sustrato para formar un nuevo complejo enzima-sustrato cerrándose así el **ciclo catalítico** del enzima. De este modo, una sola molécula de enzima puede transformar en producto, en sucesivos ciclos catalíticos, a un elevado número de moléculas de sustrato, lo que contribuiría a explicar la gran eficacia catalítica que exhiben estas biomoléculas.



Figura 10. Complejo enzima-sustrato

La hipótesis del *complejo enzima-sustrato* explica de modo satisfactorio el efecto de saturación del enzima por el sustrato observado en los estudios de cinética enzimática: cuando la concentración de sustrato es muy superior a la concentración del enzima en el medio de reacción, todos los centros activos de las moléculas de enzima se hallan ocupados en un momento dado por moléculas de sustrato, con lo que aumentos posteriores de la concentración de éste no se traducen en aumentos en la velocidad de reacción.

3. Materiales y métodos

La presente investigación fue realizada dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en el laboratorio de Producción animal (área de microbiología). Este trabajo se dividió en tres etapas, las cuales se describen a continuación.

Etapa I. Purificación de la cepa MVL-2

3.1 Material biológico.

La cepa de los microorganismos VML-2 que fue utilizada para esta investigación fue tomada de cultivos puros y liofilizados que fueron identificados por Llamas Pertenecientes al cepario del Departamento de Producción Animal (figura 11).



3.2 Preparación de medio solido.

Se prepararon cajas petri con agar Schaedler, agregando 25.14g por cada 600ml de agua destilada dentro de un matraz Erlenmeyer de 1000ml, el cual se disolvió a flama de mechero hasta que tomara una coloración cristalina, posteriormente se esterilizó en un autoclave a 121°C y 15Lb de presión durante 15min.

3.3 Siembra en medio solido

Para llevar a cabo la siembra se utilizo el medio solido, una vez transcurrido el tiempo de esterilización del medio se retiro del autoclave para realizar el vaciado del medio en cajas petri, dando tiempo para su solidificación. Se realizaron siembras en las cajas petri, por estría abierta cruzada (Fig. 12) sobre el agar Schaedler, posteriormente se incubo a 37°C ± 2 por un periodo de 5 semanas bajo condiciones de anaerobiosis. Para la creación del ambiente anaerobio, se utilizaron botes de plástico con tapa, en los cuales se colocaron las cajas petri ya sembradas, posteriormente se colocó una vela prendida, se

cerraron los botes y se colocó cinta alrededor de la tapa para que no hubiese entrada de oxígeno al bote, obteniendo así las condiciones para el crecimiento de las enzimas (Fig. 13).

	
<p>Figura 12. Siembra por medio de estría abierta cruzada.</p>	<p>Figura 13. Condiciones de anaerobiosis para el crecimiento de las enzimas.</p>

3.4 Morfología microscópica y macroscópica del la cepa VML-2

Se identificó la morfología micro y macroscópica de la cepa VML-2, obteniendo así las características necesarias de la cepa que se muestran en la siguiente cuadro:

Cuadro 7. Morfología micro y macroscópica de la cepa VML-2

Morfología macroscópica		Morfología microscópica	
Color	Ámbar	Tinción de Gram	Negativa (-)
Forma		Forma	Bacilos
Tamaño	Crece en toda la caja	Tamaño	Cortos
Brillo	Opaco		
Textura	Cremosa		

Borde	---
Elevación	Plana
Olor	Característico/acido
Margen	Entero

3.4.1 Morfología microscópica: Tinción de Gram.

Se realizo la técnica de tinción de Gram para observar las características morfológicas de los microorganismos empleados. Para ello se utilizo un asa bacteriológica la cual fue esterilizada a flama de mechero para que no hubiese contaminación a la hora de tomar la muestra, cuando es retirada del fuego es se enfriada en una de las extremidades del medio, se tomo la muestra del cultivo puro y se disolvió en una gota de agua destilada previamente puesta en un portaobjetos para ser homogenizada, posteriormente se fijo con calor. Una vez fijada la muestra se llevo a cavo la siguiente técnica (Cuadro 8):

Cuadro 8. Tinción de Gram.

COLORANTE	TIEMPO (min)
Cristal violeta	1min.
Lavar con aguan destilada	
Iodo (lugol)	1min.
Lavar con agua destilada	
Alcohol – acetona	3seg.
Lavar con agua destilada	
Safranina	1min.
Lavar con agua destilada	

Se dejo secar la muestra por completo (fig. 14) para después ser observada en un microscopio óptico a 100X, colocándole 1 gota de aceite de inmersión (fig. 15).



Figura 14. Muestra seca para ser observada bajo microscopio.



Figura 15. Muestra observada bajo microscopio a 100X

3.4.2 Morfología macroscópica:

Se identificaron las características de color, tamaño, brillo, textura, elevación. Olor y margen de cada una de las cajas (Cuadro 7).

ETAPA II. Producción de la enzima celulasa

3.5 Fermentación para la producción del extracto enzimático

3.5.1 Preparación del medio líquido específico para la producción de celulasa

Se preparo un medio líquido específico para la degradación de celulosa con la siguiente composición (Cuadro 9).

Cuadro 9. Composición del medio líquido específico para la producción de celulasa

Componente	Cantidad (%)
NaCl	0.5
NaNO ₃	0.3
KCl	0.5
Carboximetil celulosa de sodio	1
KH ₂ PO ₄	0.2

MgSO₄	0.01
-------------------------	------

3.5.2 Curva de crecimiento

Se tomaron muestras de 1.5 µLs, obtenidas de cada tiempo (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312) cada una con su repetición. Cada una de las muestras tomadas fueron centrifugadas a 5000 rpm para poder separa la biomasa y así obtener el extracto enzimático, las cuales fueron leídas mediante la técnica de turbidez empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm.

3.5.3 Producción de celulasa

Se preparo el medio líquido específico para inducir el crecimiento de la producción de celulasa. En 9 matraces Erlenmeyer de 250mL, se agregaron 80mL de agua destilada y se agrego NaCl, NaNO₃, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄, (cuadro 9), posteriormente se esterilizaron en un autoclave a 121°C y 15Lb de presión por un lapso de 15 min. La fuente de carbono (CMC), fue previamente esterilizada durante 24hrs en cámara UV, fue disuelta en 20mL de agua destilada previamente esterilizada, se adiciono a los matraces donde fueron disueltos los minerales, una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente. Se hizo una suspensión celular, de cada matraz se tomo 3mL del medio mineral, los cuales fueron tomadas con una micro pipeta, utilizando puntillas de 1mL, para ser agregados al cultivo puro haciendo un barrido con la misma puntilla con que se tomo la muestra, realizada la suspensión se tomo 1mL de cada caja inoculando así los 9 matraces, posteriormente se incubaron a 37°C, 39°C y 41°C, realizando anaerobiosis, se tomaron muestras cada 24 horas, colocándolas en tubos ependorf y llevándolas a congelación, esto se realizo por un tiempo de 360 horas (con intervalos de 24 h). Los experimentos se realizaron por triplicado, se descongelaron dos tubos de cada matraz para leer curva de crecimiento a 590nm por turbidez, ajustando a cero con medio sin inculo, posteriormente se leyeron los tubos. Se colocaron en tubos de ensaye para ser centrifugados a 5000 rpm por 30min, con la finalidad de separar el extracto enzimático de la biomasa. El extracto enzimático fue colocado en

tubos de ensaye para determinar proteína extracelular siguiendo la técnica de Biuret (Figura 16)



Figura 16. Producción de celulasaa.

3.5.4 Cuantificación de proteína extracelular y celular

Para la cuantificación de proteína celular y extracelular se tomaron tubos de ensaye esteriles para agregar cada una de las muestras a analizar, se realizo mediante la técnica de proteínas totales. La técnica consiste realizar un blanco (método biuret). (Figura 17)



Figura 17. Cuantificación de proteína extracelular y celular.

Para conocer el efecto de las condiciones de reacción sobre la enzima y el sustrato, se preparo una muestra patrón y una muestra blanco (cuadro 9). Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

- **Blanco:** 20µl agua destilada
- **Patrón:** 20 µl de patrón + 1.0ml de reactivo de Biuret, dejar incubar durante 30 min a una temperatura de 25^aC
- **Muestra:** 20 µl de patrón + 1.0ml de la muestra a analizar
- **Absorbancia:** 546nm

Cuadro 10. Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret.

	Reactivo blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	20µl	---	---
Patrón	---	20 µl	---
Suero o plasma	---	---	20 µl
Solución 1	1.0ml	1.0ml	1.0 ml

A= absorbancia

Llevando a cabo la siguiente ecuación:

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

3.5.5 Cinética enzimática:

Se agregaron 50 ml del extracto enzimático mas 200 ml de sustrato (CMC), en matraces Erlenmeyer de 250mL, se dejaron incubar a 37°C, 39°C, 41°C, tomando muestra desde el tiempo 0 hasta llegar a los 120 min, posteriormente se siguió con la técnica de Somogy-Nelson (AR).



Figura 18. Cinética enzimática

3.5.6 Determinación de azúcares reductores (Somogy-Nelson)

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 de la muestra mas 250 μ L reactivo 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 Nelson y se agitó vigorosamente. Se agregaron 4 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente para finalmente medir la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.



Figura 19. Determinación de azúcares reductores mediante la técnica de Somogy Nelson.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

ETAPA I. Purificación de la cepa MVL-2

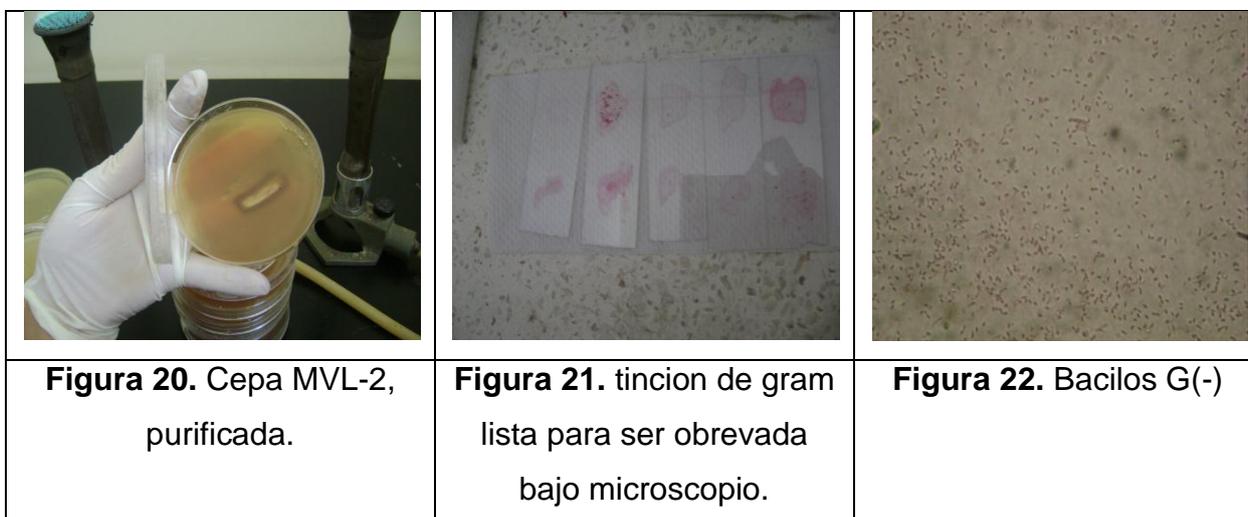
4.1 Morfología microscópica y macroscópica del la cepa VML-2

De acuerdo con Valdez Sepulveda (2010), menciona que la adición de lavadura *Saccharomyces cerevisiae* incrementa la concentración de bacterias Gram negativas en el contenido ruminal, por lo que estos resultaos coinciden con los presentados por la cepa que se analizo (cuadro 11) ya que se observa que al realizar la tinción de Gram, la mayoría de las cepas se tiñen de color rosa-rojo, lo cual nos indica que los microorganismos son Gram negativos; dicha coloración es debida a que las paredes de estos microorganismos son más delgados y con mayor cantidad de lípidos.

Cuadro 11. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa

Morfología macroscópica		Morfología microscópica	
Color	Ámbar	Tinción de Gram	Negativa (-)
Forma		Forma	Bacilos
Tamaño	Crece en toda la caja	Tamaño	Cortos
Brillo	Opaco		
Textura	Cremosa		
Borde	---		
Elevación	Plana		
Olor	Característico/acido		
Margen	Entero		

- a) Morfología microscópica: De acuerdo conmCautiño, 2011, al analizar las colonias fueron caracterizados microorganismos Gram negativo, con forma de bacilos pequeños, ovalados, algunos largos y otros cortos, lo cual 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 microscópicas similares (figura 20,21,22)



- b) Morfología macroscópica: en la figura 23 se observa una coloración ámbar, sin un tamaño definido, ya que el microorganismo crece en forma de plasta, con un brillo opaco, textura cremosa, elevación plana, con un olor muy característico (ácido) y con un margen entero. Lo cual coincide parcialmente con los resultados encontrados por Reyes Arzeola 2010 presentando una morfología macroscópica en forma de bacilos cortos con perfecta definición en sus bordes (enteros), en su morfología colonial (macroscópica), con aspecto seco y suave.

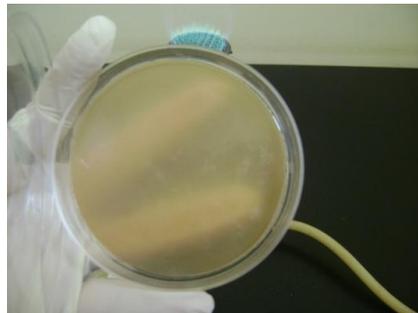


Figura 23. Placa con Cepa VML-2

ETAPA II. Producción de la enzima celulasa

4.2 Curva de crecimiento en medio específico.

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 declinación o muerte celular (Valdez-Sepúlveda, 2010).

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

Se diseñó un medio específico para la producción de la enzima celulasa, empleando como única fuente de carbono carboximetil celulosa. En la figura 24 se muestra el crecimiento de la cepa aislada en medio líquido específico; en la cual se puede observar que alcanza su fase exponencial en las primeras horas de fermentación (24 horas) que dura hasta las 120 horas, siendo esta su punto

máximo de crecimiento con una $\mu=0.9047\text{DO/h}$; su fase estacionaria comienza a apreciarse después de las 120 horas, teniendo así un descenso gradual hasta llegar a las 264 horas.

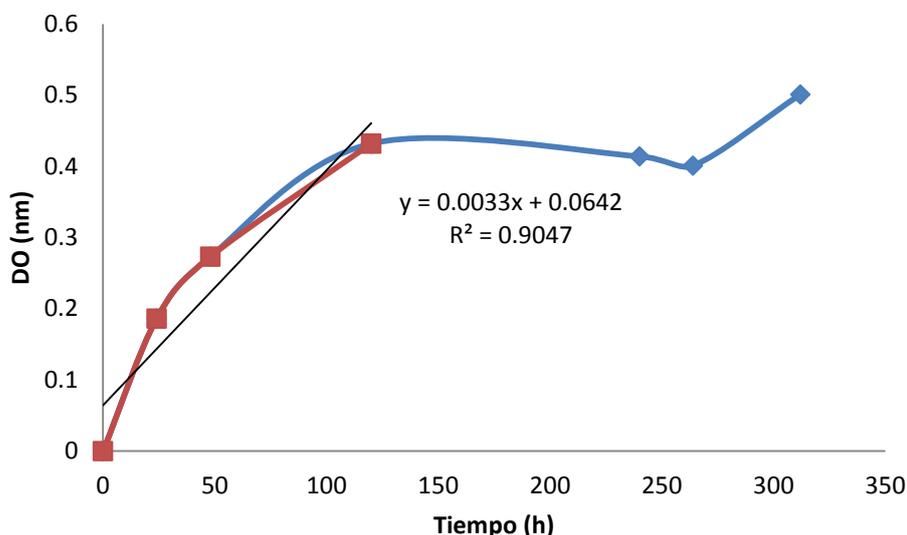


Figura 24. Curva de crecimiento de la cepa VML-2 en medio líquido específico con carboximetil celulosa a 39°C

4.4 Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret.

El principal aporte de los microorganismos en el rumen son las celulasas microbianas. La celulosa es la más importante fuente de carbono y energía en la dieta del rumiante, pero el animal por sí mismo no produce las enzimas necesarias para digerir la celulosa. Como los microorganismos usan celulosa y otros carbohidratos presentes en las plantas como sus propias fuentes de energía y carbono, ellos aportan gran cantidad de productos ácidos grasos volátiles (AGV), los cuales son usados por el animal como fuente de carbono y energía (Grudosky y Arias 1983); por lo tanto, al microorganismo en estudio se le determinó proteína extracelular ya que cuando un haz de luz choca con una partícula en suspensión parte de la luz dispersa, parte se refleja y parte se absorbe. Esta dispersión puede ser medida por turbidimetría ya que proporcionara un resultado en base a la concentración de proteína concreta, ya

que se comprara la cantidad de la luz dispersa, o la tasa de aumento de la dispersión, con los valores de estándares proteicos conocidos (Gorina, 1980).

La figura 25 muestra el comportamiento de la máxima producción de la enzima celulasaa (extracto enzimático), donde se puede apreciar que la mayor concentración de proteína extracelular se obtiene a las 120 horas de fermentación, sin embargo, una vez trascurridas las 120 horas, la cantidad de proteína empieza a disminuir considerablemente, la cual puede ser debido a que los microorganismos en condiciones de estrés (medios de cultivos específicos) producen proteasas que son liberadas al medio de cultivo provocando diferentes grados de proteólisis (Aguilar, 2002).

Según Wiedmeier *et al.*, 1990, menciona que la micro flora ruminal no se adapta rápidamente a la utilización de celulosa, por lo que la producción de la enzima se ve limitada.

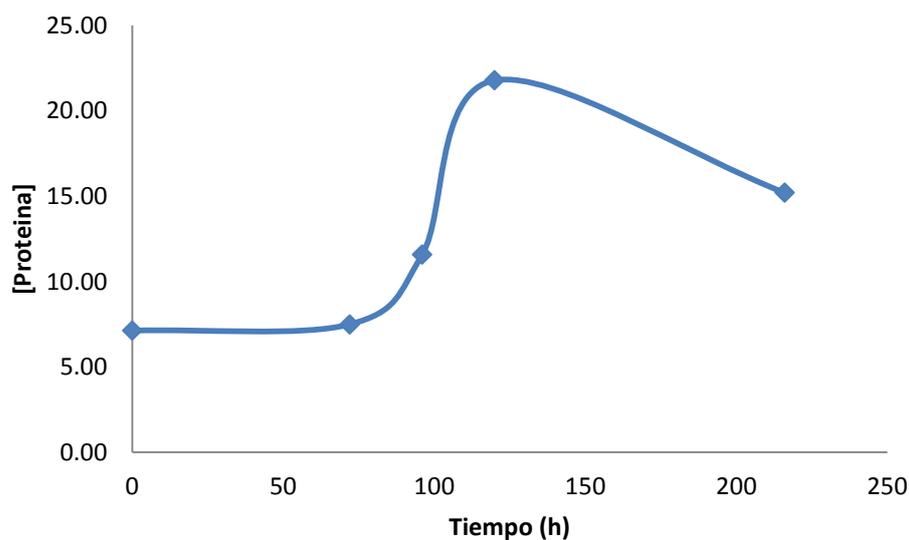


Figura 25. Cuantificación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa MVL-2

ETAPA III. CINETICA ENZIMATICA

Como ya se menciona, se diseño un medio especifico para la producción de la enzima celulasa, empleando como única fuente de carbono carboximetil celulosa. En la figura 26 se muestran los resultados obtenidos de la actividad celulasa, donde se observa que con temperatura de de 37°C alcanza su fase exponencial en las primeras 12 horas de fermentación, siendo esta su punto máximo de crecimiento; con temperatura de 41°C, alcanza su fase exponencial 120 horas, siendo este su punto máximo de crecimiento.

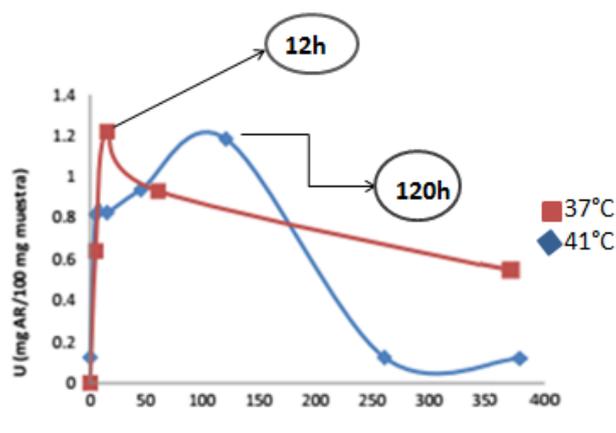


Figura 26. Curva de crecimiento de la cepa VML-2 en medio liquido específico con carboximetil celulosa a 37°C, 41°C

5. CONCLUSIONES

Se evaluaron los microorganismos de la cepa ruminal VML-2 a tres diferentes temperaturas (37, 39, 41°C), de las cuales se determinó que la temperatura óptima para la producción satisfactoria de la enzima celulasa es de 39°C.

Se aisló la cepa VML-2 en medio específico para microorganismos anaerobios (agar Schaedler) y se caracterizó macroscópicamente obteniendo así una plasta, con superficie lisa y consistencia cremosa, color ámbar, con bordes enteros, aspecto húmedo y se identificaron como bacillos cortos Gram negativos.

Se demostró que el microorganismo empleado de la cepa VML-2 produce la enzima celulasa, mediante el diseño de un medio de cultivo inductor, empleando como única fuente de carbono la carboximetil celulosa. En la cual se puede observar que alcanza su fase exponencial en las primeras horas de fermentación (24 horas) que dura hasta las 120 horas, siendo esta su punto máximo de crecimiento con una $\mu=0.9047\text{DO/h}$.

Se determino que la actividad celulasa, con temperatura de de 37°C alcanza su fase exponencial en las primeras 12 horas de fermentación, siendo esta su punto máximo de crecimiento, mientras que con temperatura de 41°C, alcanza su fase exponencial 120 horas, siendo este su punto máximo de crecimiento.

6. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. 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/>>.
2. Andrighetto, I., Bailoni, L., Cozzi G., Berzaghi, P. 1993 Effects of yeast culture addition on digestion in sheep fed a high concentrate diet. Small Ruminant Research. 12:27-34.
3. Ángeles, C.S., Corona, G.L., Castrejón, P.F., Mendoza, M.G.D., Cobos, P.M. 1995 Cambios en la población de protozoarios y en el metabolismo ruminal utilizando dos cultivos de levaduras. Memorias. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Vol. 26. Sup 2. pp.275.
4. Arcos, García, José Luis. López, Pozos, Roberto. Bernabé Hernández Abelardo. Hoffman jean, A. 2007. Temas de ciencia y tecnología.
5. Arreaza, T., Luis Carlos. NUTRICION Y ALIMENTACION DE BOVINOS EN EL TROPICO BAJO COLOMBIANO. Manual técnico.
6. Avendaño, B.H., González, M.S.S., García-Bojalil, C., Mendoza, M.G.D., Bárcenas, G.R. 1995 Efecto del nivel de rastrojo de maíz y de un cultivo

- de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*; Yea-Sacc1026) en el valor nutritivo de dietas para borregos en crecimiento. Memorias VII Congreso Nacional AMENA, Veracruz.
7. Badui, salvador. Química de los alientos. Mexico, D.F: pearson, 1993.
 8. Cautiño laguna Beatriz del Carmen; "Empleo de microorganismos ruminales para la producción y cuantificación de actividad celulasa usando diversas fuentes de carbono (papel periódico, papel filtro y carboximetil celulosa)". Tesis de licenciatura, diciembre 2011, UAAAN, Buenavista, Coahuila, México.
 9. Celulosa y celulasas. Online. <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/education/cuaderno/>». 21 de septiembre de 2011.
 10. Dykstra, Gerald, M. Artículo técnico enzimas y biodispersantes en la fabricación de papel
 11. Gaitán. Diana. 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Pontifica Universidad Javeriana. Tesis de licenciatura
 12. Gedek, B., Enders, C., Ahrens, F., Roques, C. 1993 the effect of *Saccharomyces cerevisiae* (BIOSAF Sc 47) on ruminal flora and rumen fermentation pattern in dairy cows. Ann Zootech. 42:175.
 13. Gómez-Alarcón, R.A., Dudas, C., Huber, J.T. 1987 Effect of *Aspergillus oryzae* (Amaferm) and yeast on feed utilization by Holstein cows. J. Dairy Sci. 70, suppl.1:218.
 14. Grudsky P. Roberto., Arias B. José Luis. 1983. Aspectos generales de la microbiología del rumen. Monografías de medicina veterinaria, Vol. 5 (2).
 15. Hernández, D. R. 1999 Efecto de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en consumo, digestibilidad y variables ruminales en borregos alimentados con pasto ovido (*Dactylis glomerata*) cosechado a dos intervalos de rebrote. Tesis de maestria en ciencias. Colegio de Posgraduados, Montecillo Méx. 74 p.

16. Howard, R; abots, E; rensburg, J; Howard,s. lignocelluloses biotechnology: issues of bioconversasion and enzyme production. African journal of biotechnology. 2:602-619
17. L. Izarra, Myriam *et all* 2010. Artículo de investgacion, influemcia de la concetracion de inóculo en la produccion de celulasa y xilanas por *Aspergillus niger*
18. Marín. Romelia. 2007. Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico. Universidad de Chile. Tesis de licenciatura
19. Maroto. Vela. Ma. Del Carmen. Piedrola. Angulo. Gonzalo. 1999. El bien y el mal en el hombre y en los microorganismos. Pag. 29
20. Mizraji. Eduardo. 1999. El segundo secreto de la vida. La enzimología, la genética y J. B. S. Haldane.
21. 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.
22. Rodríguez, G.F., Llamas, L.G. 1990 Digestibilidad, balance de nutrimentos y patrones de fermentación ruminal. In: R.A. Castellanos, L.G. Llamas y S. A. Shima, Eds. Manual de técnicas de investigación en ruminología. Sistemas de Educación Continua en Producción Animal en México, A.C. México, D.F. pp. 95-126.
23. Soukuo. Jaroslav. 1999. Biota. Revista de ciencias biológicas. Volumen XVII N° 99
24. 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.
25. Wiedmeier R. D., arambel, M. J., Welters, J. L. 1987. Effect of yeast culture and *Asperggillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. J. Dairy Sci. 70:7063-2068
26. Prado, Barragán, Lilia Arely. Huerta, Ochoa, Sergio. Rodríguez, Serrano, Gabriela. Saucedo, Castañeda, Gerardo. 1999. Avances en purficacion y aplicación de enzmas en biotecnología pp.15-22

27. Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor, S.A. Mexico. Pag. 162-177
28. Kumar, V.K., Sareen, P.K., Singh, S. 1994 Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture supplements on ruminal metabolism in buffalo calves given a high concentrate diet. Brit Soc. Anim Sci. 59:209-215.