



PRODUCCIÓN DE UN EXTRACTO ENZIMÁTICO CON PROPIEDADES CELULOLÍTICAS A PARTIR DE UN MICROORGANISMO CELULOLÍTICO

Florencia Salinas^a, E. Torres^a, C. Álvarez^a, E. Bazán^a,

^aUniversidad Tecnológica de Tecámac, Estado de México, biotlofencia@yahoo.com.mx, biotec.emmanuel@hotmail.com, cristian_alvarez1@yahoo.com, bazanlugo_edu@yahoo.com.mx

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio sobre la actividad enzimática que tienen algunos microorganismos obtenidos de una composta madura. Se realizó su aislamiento para obtener una cepa pura en medio Luria Bertani (Medio LB), por método de vaciado en placa; se realizó la identificación del microorganismo con la técnica de Gram y pruebas bioquímicas con la ayuda del equipo VITEC 2 de BIOMÉRIEUX, identificando a la bacteria como *Pseudomonas aeruginosa*. La bacteria se inoculó en un medio con solución isotónica permaneciendo en contacto varios días, se tomó 1 ml que contenía 1.912×10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) en dos distintos medios de cultivo a base de triptona, extracto de levadura, NaCl, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , se utilizó como sustrato paja pretratada químicamente con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y sin pretratar. Se utilizaron 6 diferentes combinaciones de sustrato con diferentes tamaños de partícula para evaluar la diferencia de degradación así como consumo y calcular rendimientos de biomasa de la fermentación que tuvo un periodo de 10 días mediante cálculos y gráficas, dando como resultado una mayor degradación en el medio que contenía como sustrato la paja pretratada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y la partícula de menor tamaño. El medio de la fermentación se trató con sulfato de amonio al 80% de saturación para precipitar las enzimas y conservándolo en 3 ml de buffer con pH de 5.5; obteniendo así el extracto enzimático. La actividad celulolítica de la bacteria fue evaluada mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en las distintas fermentaciones dando como resultado mayor actividad en la fermentación que obtuvo la paja pretratada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y con la partícula más pequeña, para ello se analizaron por medio de gráficas y métodos estadísticos, mediante un diseño en bloques azúcares reductores y actividad enzimática y análisis de medias utilizando el método de Duncan.

1. INTRODUCCIÓN

En gran parte del territorio mexicano se realiza la actividad agrícola y en ello se lleva a cabo la cosecha de trigo cuya producción anual es de 3 245 370 toneladas (INEGI, 2014) que representa un alto contenido de lignocelulosa, ya que es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa producida por la fotosíntesis es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas de degradación ambiental (Sanchez O. y Cardona C., 2005). De esta producción hay un alto volumen de residuos, la cual se ha aprovechado desde la elaboración de compostas hasta producción de etanol. Los microorganismos encargados de la degradación de la celulosa, principal componente de la pared celular de las plantas, contienen la maquinaria enzimática necesaria para dicho propósito, en el cual se encuentran las celulasas, hemicelulasas, enzimas xilanasas degradadoras de xilano, mananasas enzimas degradadoras de manano, enzimas celulolíticas donde se despiegan las endocelulasas, exocelulasas y celobiasas.

El proyecto "Producción de un extracto enzimático con propiedades celulolíticas a partir de un microorganismo celulolítico", realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Tecnológica de Tecámac (UTTEC), tiene como objetivo efectuar procesos biotecnológicos



aprovechando la capacidad celulolítica de microorganismos aislados de composta madura para degradar los residuos vegetales para su posterior implementación en diversas áreas como la alimentaria, salud, agropecuaria, ambiental, industrial y de desarrollo e investigación para la mejora del medio ambiente e implementación en procesos industriales.

Objetivo general

Producir un extracto enzimático con propiedades celulolíticas a partir de un microorganismo celulolítico.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar un microorganismo con capacidad celulolítica para obtener una cepa pura a partir de medio de cultivo Luria Bertani.
- Producir un extracto enzimático con propiedades celulolíticas a partir de la fermentación de paja de trigo químicamente pretratada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$.
- Determinar la capacidad celulolítica del extracto producido para conocer los rendimientos de actividad enzimática mediante mediciones espectrofotométricas

2. TEORÍA

Componentes de lignocelulosa

Todos los tipos de materiales lignocelulósicos se construyen principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. La composición y proporciones de estos tres componentes varían entre plantas, pero juntos constituyen alrededor del 90% del peso seco.

Celulosa

Se trata de un homopolímero lineal de Dglucosa vinculado- β -1,4 moléculas de celobiosa, dímero como la unidad de repetición, distribuida en largas cadenas de celulosa con un grado de polimerización de hasta 15.000 unidos entre sí con enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals

Hemicelulosa

Es el segundo constituyente principal de la lignocelulosa, es la vinculación material entre la celulosa y la lignina. Es un ramificado heteropolímero con menos resistencia, estructura más amorfa y menor grado de polimerización (<200) que la celulosa(Saha, 2003). Se compone principalmente de diversas hexosas tales como D-glucosa, D-galactosa y D-manosa, y de pentosas tales como D-xilosa y L-arabinosa, unidos entre sí por β -1,4 y algunas veces por β -1,3- enlaces glicosídicos.

Lignina

La lignina, el tercer constituyente principal de la lignocelulosa, es complejo, muy ramificado, de alto peso molecular, amorfo, polímero aromático, que está estrechamente ligado tanto a la celulosa y la hemicelulosa en parte de los materiales. En contraste con la celulosa y la hemicelulosa, no se compone de unidades de repetición. La lignina es muy resistente a los tratamientos químicos y microbianos, y junto con la celulosa, da una fuerza increíble a los árboles, lo que permite que se coloquen en posición vertical y crecer hasta más de 100 m de altura.

Enzimas celulolíticas

El complejo de enzimas celulolíticas consiste en tres enzimas hidrolíticas: Endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas, las cuales trabajan sinérgicamente (Lemaire. M., 1996).



Pretratamiento de la biomasa

El pre-tratamiento tiene como objetivo desintegrar la matriz de carbohidratos de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumentar la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático. El pre-tratamiento permite que los rendimientos en la hidrólisis de celulosa aumenten del 20 al 90%. Se han propuesto y desarrollado diferentes métodos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos (Sun Y. y Cheng, 2002).

3. PARTE EXPERIMENTAL

Aislamiento e identificación del microorganismo

El microorganismo se aisló a partir de una composta en fase madura, inoculado en medio estéril con harina de celulosa de trigo como fuente de carbono, se incubó durante un periodo de 5 días con aireación. Para la identificación primaria del microorganismo se utilizó la técnica de Gram. La identificación bioquímica del género y especie del microorganismo se realizó en SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) mediante el equipo llamado VITEK 2 de BIOMÉRIEUX

Fermentación

Se tomó 1 ml del inóculo utilizando 6 diferentes combinaciones de sustrato basada en tamaño de partícula y la concentración con y sin tratamiento químico ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) como se muestra en la tabla número 1

Tabla 1. Combinaciones de sustrato de diferentes mallas.

*1 A	60	0.5
*1B	60	1
*2 A	40	0.5
*2B	40	1
*3 A	20	0.5
*3B	20	1

Determinación de parámetros

Se realizó la determinación de biomasa, consumo y degradación de sustrato mediante gravimetría. La determinación de concentrado enzimático se realizó a partir del extracto de la fermentación y precipitación con sulfato de amonio al 80%. La actividad enzimática se determinó mediante la degradación de la paja con la técnica de DNS.

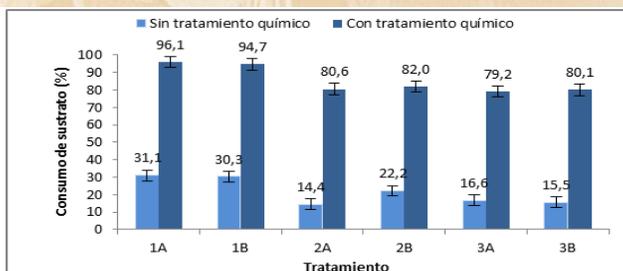
RESULTADOS

Aislamiento e identificación del microorganismo

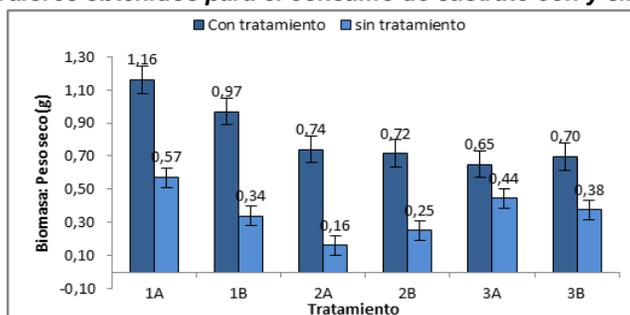
Se obtuvo una cepa pura Gram negativa, las pruebas bioquímicas la identifican como *Pseudomonas aeruginosa*.

Formación de biomasa, consumo y degradación de sustrato

Los resultados obtenidos se graficaron para una mayor apreciación de la diferencia entre las condiciones. (Gráficas 1 y 2), en donde se observa que es significativamente mayor tanto el consumo de sustrato, como formación de biomasa en paja químicamente pretratada.



Gráfica 1. Valores obtenidos para el consumo de sustrato con y sin tratamiento



Gráfica 2. Formación de biomasa con tratamiento y sin tratamiento

Azúcares reductores y actividad enzimática

Mediante un diseño de arreglo en bloques se manejaron los datos de azúcares reductores y actividad enzimática (Tabla 2), para realizar el análisis de varianza y comparación de medias, utilizando el método de DUNCAN. Los resultados indican que ambos parámetros tienen diferencias entre sí, esto puede ser por el tamaño de partícula y la concentración en la fermentación, ya que esto influye en el consumo de sustrato y la cantidad de azúcares formadas. El análisis de varianza establece que hay diferencia significativa en los tratamientos ya que el valor P es de 0.8341 lo que indica que es superior al valor F0 que establece que hay diferencia entre los tratamientos siendo los medios significativamente diferentes en azúcares reductores, en consideración al proceso presenta una diferencia de un alfa de <math><0,0001</math>; lo cual indica que hay una diferencia significativa en los días.

Tabla 1. Arreglo del diseño en bloques azúcares reductores y actividad enzimática.

Tratamiento	DÍAS															
	1		2		4		5		6		7		9		11	
	A. R	A. E														
1A	1,71	0,00	1,62	1,75	1,65	1,92	1,05	1,88	1,88	1,65	1,92	1,68	1,74	1,69	1,75	1,76
1B	1,66	0,00	1,70	1,69	1,63	1,93	1,87	1,89	1,91	1,68	1,93	1,67	1,76	1,69	1,77	1,77
2A	1,69	0,00	1,69	1,67	1,71	1,84	1,89	1,82	1,90	1,68	1,91	1,63	1,72	1,68	1,72	1,72
2B	1,66	0,00	1,69	1,65	1,72	1,82	1,88	1,83	1,89	1,65	1,91	1,69	1,72	1,70	1,70	1,70
3A	1,69	0,00	1,71	1,62	1,70	1,81	1,88	1,78	1,87	1,66	1,93	1,64	1,75	1,69	1,76	1,87
3B	1,70	0,00	1,64	1,78	1,72	1,80	1,90	1,75	1,91	1,67	1,90	1,67	1,77	1,69	1,77	1,76

A.R: Azúcares reductores; A.E: Actividad Enzimática (mg/ml)



En las tablas 3 y 4 se observa el análisis de medias para determinar significativamente las diferencias entre las muestras; se puede apreciar que la agrupación de las muestras utilizando el método de Duncan, todas las medias son significativamente diferentes ya que comparten una letra en la agrupación. Conforme los azúcares reductores como la actividad enzimática tienen diferencias entre sí, esto puede ser por el tamaño de partícula y la concentración que se tuvo en la fermentación ya que esto influye de manera directa en el consumo del mismo y la cantidad de azúcares, como de actividad desarrollada.

Tabla 2. Análisis de varianza de medias para azúcares reductores.

AGRUPACIÓN	MEDIA	N	TRATAMIENTO
A	1.78875	8	TRATAMIENTO06
A	1.78625	8	TRATAMIENTO05
A	1.77875	8	TRATAMIENTO03
A	1.77875	8	TRATAMIENTO02
A	1.7775	8	TRATAMIENTO01
A	1.77125	8	TRATAMIENTO04

Tabla 3. Análisis de varianza de medias para actividad enzimática.

AGRUPACIÓN	MEDIA	N	TRATAMIENTO
A	1.66625	8	TRATAMIENTO06
A	1.665	8	TRATAMIENTO05
A	1.64	8	TRATAMIENTO03
A	1.63375	8	TRATAMIENTO02
A	1.63	8	TRATAMIENTO01
A	1.63	8	TRATAMIENTO04

4. CONCLUSIONES

Se aisló e identificó con un 98% de certeza la bacteria celulolítica *Pseudomonas aeruginosa*. El tamaño de partícula y la concentración del sustrato si tienen gran efecto sobre la degradación de las enzimas celulolíticas, ya que entre más pequeña sea la partícula y entre más sustrato posea mayor es su producción aunque varía de acuerdo a los días de proceso

BIBLIOGRAFÍA (ARIAL, bold, 10 pt. justificado a la izquierda)

1. INEGI, I. N. (2014). Boletín de Información Oportuna del sector alimentario. México.
2. Lemaire. M. (1996). The cellulosome- an exocellular multiprotein complex specialised in cellulose degradation. *Critical Reviews and Biochemistry and Molecular Biology*, 2001-2036.
3. Saha, B. (2003). Hemicellulose bioconversion *J Ind Microbiol Biotechnol*. Estados Unidos.
4. Sanchez O. y Cardona C. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención de diferentes materias primas. *Interiencia*, 30 (11), 671-677.
5. Sun Y. y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. *Bioresource Technology*, 83, 1-11.