

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



TESIS

**AISLAMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS CON PROPIEDADES DE
PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA CELULASA**

Presentada por

LUCRECIA SANTOS OROZCO

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenvista, saltillo, coahuila, méxico.

Junio 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Aislamiento de hongos filamentosos con propiedades de producción de la enzima celulasa”

TESIS

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Presentada por:

LUCRECIA SANTOS OROZCO

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

Dr. Mario A. Cruz Hernández
Presidente del jurado

M.C Armando Robledo Olivo
Sinodal

Dra. Susana González Morales
Sinodal

Dra. Ruth Belmares Cerda
Sinodal

Dr. Ramiro López Trujillo
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Buenavista, Saltillo Coahuila, México. Junio 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“Aislamiento de hongos filamentosos con propiedades de producción
de la enzima celulasa”**

TESIS

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

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Presentada por:

LUCRECIA SANTOS OROZCO

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



Dr. Mario A. Cruz Hernández
Director



M.C. Armando Robledo Olivo
Co-Director



Dra. Susana González Morales
Asesor



Dra. Ruth Belmares Cerda
Asesor

Buenavista, Saltillo Coahuila, México. Junio 2014

AGRADECIMIENTOS

Los grandes logros requieren tiempo y paciencia, te doy gracias dios por guiarme y darme la sabiduría, paciencia y acompañarme siempre a lo largo de este periodo.

A mis padres Hernán y Olga gracias por brindarme el apoyo moral y económico por su cariño, amor y sobre todo por darme el mejor ejemplo de persona, por enseñarme el valor del trabajo, por orientarme a través de sus consejos por un buen camino para llegar a ser una buena persona.

A mis hermanos José Luis y Adolfo por todo su apoyo durante todo el proceso de mi formación profesional y sobre todo por ser los mejores hermanos del mundo, los amo.

A mi alma mater por haberme formado no solo como profesionista sino también como persona con valores éticos cívicos y morales, por brindarme todos los recursos necesarios para lograr este sueño.

A mis asesores el Dr. Mario A. Cruz Hernández, Mc. Armando Robledo Olivo, Dra. Susana González y Dra. Ruth Belmares que depositaron su confianza en mí para sacar adelante este último trabajo que me fortalece profesionalmente, por sus enseñanzas y paciencia gracias.

A todos mis maestros que contribuyeron directamente a mi formación profesional y moral gracias ya que son la pieza más importante en mi formación.

A la familia Maldonado ortega gracias por su apoyo incondicional y por la confianza depositada en mi persona.

A mis amigos Dulce, Idalia, Isabel, Román, rafa, por brindarme su apoyo en todos los sentidos durante este periodo de mi vida., sobre todo por brindarme su amistad en todo momento.

A mis compañeros por su apoyo por compartir todas esas experiencias que nunca olvidare, los recordare siempre.

A María Concepción Santiago García por el apoyo atención y tiempo brindado en la etapa experimental de este trabajo.

Dedicatoria

A lo más valioso que tengo en la vida: mi familia.

En primer lugar a mis padres que me han sacado adelante con gran esfuerzo y dedicación. Son ellos mi mejor ejemplo de persona, ellos quienes se han desvelado, han sufrido y han luchado por buscar mi bienestar, mis padres que siempre me han dado todo lo que han podido sin pedirme nada a cambio, esos seres por los que soy quien soy. Los amo.

A mis hermanos a quienes amo con todo mi corazón, además de ser mis hermanos han sabido ser amigos y padres ya que han cuidado de mi toda la vida y me han brindado su apoyo en todo momento, mi chaparrito mi hermanito mayor y mi flaco mi hermanito hermoso.

A mis abuelitos quienes son mis pilares sin ellos no habría tenido la dicha de tener los padres que tengo, son mis raíces los quiero mucho mis viejitos: Efrén, Margarita, Leónides y Anita

INDICE GENERAL

CONTENIDO	Pág.
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA.....	ii
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. JUSTIFICACIÓN	4
4. HIPOTESIS	4
5. OBJETIVOS	5
5.1 Objetivo general.....	5
5.2 Objetivos Específicos.....	5
6. MARCO TEORICO	6
6.1 Microorganismos y los alimentos	6
6.2 Hongos.....	7
6.2.1 Estructura celular	7
6.2.2 Morfología	8
6.2.3 Metabolismo	9
6.2.4 Reproducción	9
6.3 Definición de enzima.....	10
6.3.1 Clasificación de enzimas.....	11
6.4 Condiciones que afectan la actividad enzimática.....	12
6.4.1 Concentración de enzima sustrato.....	12
6.4.2 Efecto del PH.....	14
6.4.3 Efecto de la temperatura.....	15
6.5 Celulosa	16
6.6 Celulasas	17
6.6.1 Clasificación de celulasas	18
6.6.2 Hidrolisis enzimática de la celulasa	19
6.7 Factores que determinan la actividad enzimática de las celulasas	19

6.7.1 Sinergismo	20
6.7.2 Absorción	20
6.8 Factores que afectan la acción enzimática de la celulasa	21
6.8.1 Interacción enzima sustrato	21
6.8.2 Temperatura	21
6.8.3 Aireación	22
6.8 Microorganismos que hidrolizan celulasas.....	22
6.9 Tecnología de la fermentación o bioproceso	24
6.9.1 Biorreactores.....	24
6.9.2 Fermentación	25
6.9.3 Fermentación sumergida	26
6.9.4 Fermentación en medio sólido	27
6.10 Biología molecular.....	28
6.10.1 Identificación molecular de hongos filamentosos.....	28
6.10.1.1 Extracción de ADN.....	28
6.10.1.2 Determinación de pureza y cuantificación de ADN	29
6.10.1.3 Espectrofotometría.....	29
6.10.1.4 Electroforesis en gel	29
6.10.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	31
7.1 Obtención y mantenimiento de la cepa de interés	31
7.1.2 Microorganismo utilizado	31
7.1.3 Aislamiento de hongos.....	31
7.2 Identificación del cultivo e identificación macroscópica y microscópica	32
7.2.1 Tinción con lactofenol (azul de algodón).....	32
7.3 Crecimiento de los microorganismos	33
7.3.1 Preparación de medios de cultivo	33
7.4 Preservación del microorganismo en glicerol-leche descremada	33
7.5 Determinación de pruebas cualitativas	34
7.5.1 Actividad celulolítica.....	34

7.6	Determinación cuantitativa y cinéticas de fermentación.....	35
7.6.1	Fermentación en medio líquido	35
7.6.2	Condiciones de la fermentación.....	35
7.6.3	Preparación del inóculo	35
7.6.4	Extracción enzimática de fermentación en medio líquido	37
7.7	Determinación de la actividad enzimática	37
7.7.1	Determinación de azúcares reductores (método de Miller 1989) fermentación con CMC al 0.5%.	37
7.7.2	Determinación de azúcares reductores (método de Miller 1989) fermentación con CMC de sodio al 0.1%.....	38
7.7.2.1	Determinación de endocelulasas	38
7.7.2.2	Cuantificación de U/ ml	40
7.7.2.3	Determinación de exo-glucanasa	41
7.7.2.4	Cuantificación de FPU/mL	42
7.7.3	Determinación de biomasa	42
7.8	Parámetros cinéticos.....	43
7.8.1	Cinética de formación de biomasa	43
7.8.2	Cinética de formación de producto	43
7.9	Análisis estadístico.....	44
7.10	Identificación molecular de las cepas seleccionadas	45
7.10.1	Cuantificación de ADN.....	46
7.10.2	CALIDAD DEL ADN: Electroforesis horizontal de agarosa al 1%....	46
7.10.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	47
7.10.4	Electroforesis horizontal de agarosa al 3%	48
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
8.1	Condiciones iniciales, aislamiento y purificación de las cepas.....	50
8.2	determinación de pruebas cualitativas	53
8.2.1	Actividad celulolítica.....	53
8.3	Determinación cuantitativa y cinética de fermentación líquida	55
8.3.1	Determinación de actividad celulasa en fermentación con CMC al 5 %	55

8.3.2 Determinación de actividad celulasa en fermentación con CMC de Na al 0.1%.....	56
8.3.3 Biomasa.....	56
8.4 Identificación molecular de las cepas productoras de la enzima celulasa	63
9. CONCLUSIONES	68
10. BIBLIOGRAFIA	69
11. ANEXOS	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ultraestructura de la célula fúngica	8
Figura 2: Efecto de la concentración del sustrato sobre el índice de la actividad enzimática (Lenhiger 1993).....	13
Figura 3: Efecto de la concentración de la enzima en la actividad enzimática (Lenhiger 1993).....	13
Figura 4: pH optimo en el cual la actividad de las enzimas es máxima.	14
Figura 5: Variación de la actividad de las enzimas en función a la temperatura. .	15
Figura 6: Estructura Química de la celulosa (Heldt 1997)	16
Figura 7: Glucosa después de la hidrólisis de celulosa (Whithers, 2001).	17
Figura 8: Identificación A) macroscópica y B) microscópica de hongos filamentosos	32
Figura 9: Fotografía microscópica de hongos (tinción azul de algodón, objetivo 40x).	33
Figura 10: Testigo rojo congo (tiempo 0)	34
Figura 11: Suspensión de esporas sobre la cámara de Neubauer	36
Figura 12: Diagrama para el conteo de esporas	36
Figura 13: Incubación del extracto enzimático y buffer en baño maría	40
Figura 14: Filtración de biomasa con la bomba de vacío.	42
Figura 15: Agarosa al 1% vertiéndose en un portagel	47
Figura 16: Tira de parafilm con buffer de carga más muestra.....	47
Figura 17: Transiluminador de luz UV con fotodocumentador.	49

Figura 18: Comparación a) morfología <i>p. cladosporium</i> b) morfología cepa N8 ..	52
Figura 19: Comparación de los halos formados después de 144 horas (A) testigo, B) M2, C) M4, D) M5).....	53
Figura 20: Cinética preliminar de actividad celulasa de las cepas M2, M4 y M5..	55
Figura 21: Producción de biomasa por la cepa M4	56
Figura 22: Producción de biomasa de la cepa M5	57
Figura 23: Actividad endocelulasa cepa M4	59
Figura 24: Actividad endocelulasa de la cepa M5	59
Figura 25: Grafico de comparación de producción de biomasa (puntos azules) y endocelulasa (puntos naranjas) de la cepa M5.....	60
Figura 26: Actividad exocelulasa de la cepa M4	61
Figura 27: Actividad exocelulasa de la cepa M5	62
Figura 28: Electroforesis con gel agarosa al 1%. Calidad del ADN, Carril: 1-3, cepas M2, M4, Y M5 respectivamente.	64
Figura 29: Electroforesis con gel agarosa al 3%, CN control negativo; MM marcador molecular a 600 pb (PCR).....	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición del medio Czapek-Dox.....	45
Tabla 2: Composición del coctel.....	48
Tabla 3: Identificación microscópica y macroscópica de las cepas aisladas.....	50
Tabla 4: Valores obtenidos en la cuantificación de ADN por espectrofotometría	63
Tabla 5: Calidad del ADN	64
Tabla 6: Secuencia de nucleótidos de la cepa M5 utilizando los iniciadores 518F y 800R.	66

1.RESUMEN

En la actualidad la industria hace uso de enzimas en sus procesos, lo cual se hace cada vez más común y rentable, debido a que estas presentan ventajas frente a catalizadores no biológicos convencionales. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de producción de la enzima celulasa de quince cepas de hongos filamentosos, iniciando desde el aislamiento, purificación hasta la identificación de las cepas. Se llevaron a cabo fermentaciones en medio líquido inoculando esporas de los hongos con mayor producción de celulasa, utilizando como sustrato CMC de sodio con condiciones de 200 rpm y con temperatura de 32 °C. La cepa de mayor producción de la enzima de interés fue la cepa codificada como M4 esto alcanzado a las 72 horas con una producción de 1718 U/MI.

Palabras clave: *Enzimas, celulasa, fermentación en medio líquido, hongos filamentosos.*

2. INTRODUCCIÓN

Hoy en día los procesos desarrollados en la industria que son catalizados por enzimas son mucho más numerosos, debido a que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores no biológicos convencionales.

La industria alimentaria ha sabido sacar un gran partido a las enzimas y así lo demuestra el rápido desarrollo que en los últimos años ha tenido la enzimología en el ámbito de la bioquímica de alimentos.

A lo largo de la historia se han venido empleando las enzimas para usos industriales, una de las enzimas comúnmente utilizadas es la celulasas obtenidas mediante fermentación de diferentes microorganismos, los cuales han sido estudiados en varios sustratos.

La celulosa constituye una buena fuente de carbono limitada a los microorganismos capaces de hidrolizar el enlace B- 1,4 a expensas de un complejo sistema de enzimas denominadas celulasas o celulolíticas.

Las celulasas son sintetizadas por una gran variedad de bacterias y hongos, pero pocos microorganismos pueden producir las enzimas necesarias para degradar la celulosa cristalina. Los hongos filamentosos son responsables de la mayor celulosis en la naturaleza por la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos, y sus ventajas adaptativas. (Yoandy *et al.*, 2011).

En la industria textil, las celulasas juegan un papel muy importante en el desteñido de telas de jeans ya que se usan para remover el color azul índigo y dar una apariencia de desteñido. Tradicionalmente este desteñido se realizaba con piedra pómez. En la actualidad, una pequeña cantidad de enzima puede sustituir varios kilos de piedras. Con la reducción de las piedras se producen menos daño a las telas y menos desgaste de las lavadoras.

Las celulasas también son utilizadas en la industria de los detergentes. La enzima degrada las microfibrillas que se separan parcialmente de las fibras principales, restituyendo a las fibras una superficie suave y a la prenda su color original.

Dentro de la industria alimenticia, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, entre otras aplicaciones.

Como la celulosa es el componente más abundante de la biomasa vegetal, la obtención de bioetanol a partir de este compuesto, es la gran esperanza para un desarrollo sostenible de los biocombustibles. Sin embargo, como la degradación de la celulosa en unidades de glucosa es un procedimiento lento y costoso, esta etapa se convierte en la principal dificultad económica que obstaculiza el aprovechamiento rentable de esta abundante fuente de energía. Estas dificultades se deben a la limitada disponibilidad y al costo de las enzimas celulasas que se requieren en grandes cantidades, para maximizar el rendimiento de la degradación de celulosa en alcohol. Una alternativa, que se encuentra en etapa de investigación, es el uso de organismos transgénicos capaces de degradar biológicamente la celulosa en azúcares simples y transformarlos en bioetanol.

En el presente trabajo se pretende producir la enzima celulasa empleando hongos filamentosos aislados de material vegetal, para esto se llevaron a cabo pruebas cualitativas y cuantitativas posteriormente se identificaron genéticamente las cepas con mayor producción de la enzima.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el cambio climático y el enfoque orgánico que se le han otorgado a los diferentes procesos de manufactura, ha llevado a las industrias a buscar nuevas alternativas biológicas para la realización de dichos procesos; haciendo uso de microorganismos capaces producir ciertas enzimas, utilizando cultivos de hongos filamentosos con propiedades de producción de enzimas extracelulares con importantes aplicaciones industriales; especialmente en la manufactura de textiles y papeles y en la industria de alimentos en el procesamiento de vinos, producción de purés de frutas, verduras y en polvos instantáneos para jugos naturales además de su uso en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica para la producción de etanol (Paredes *et al.*,2010).

En este trabajo se busca comprobar la eficiencia de los microorganismos en este caso de hongos filamentosos para producir la enzima celulasa la cual tiene una gran importancia económica industrial. Ya que los métodos tradicionales de producción de esta enzima pueden ser demasiado prolongados hasta la obtención de la enzima purificada.

En esta investigación se aislaron y purificaron hongos filamentosos para la producción de celulasa en fermentación líquida, evaluando la cinética de producción, los valores óptimos de actividad así como las condiciones más apropiadas para la mayor producción de la enzima. Lo anterior llevado a cabo en las instalaciones del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

4. HIPOTESIS

Los hongos filamentosos aislados de fuentes vegetales producirán la enzima celulasa en fermentación en medio líquido empleando carboxil-metil celulosa de sodio como única fuente de carbono.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Producir la enzima celulasa a través de fermentaciones líquidas con hongos filamentosos aislados de material vegetal utilizando como fuente de carbono CMC de Na (carboxil-metil celulosa de sodio).

5.2 Objetivos Específicos

- Aislar, purificar, conservar e identificar hongos filamentosos presentes en muestras de material vegetal endémico de la región.
- Determinar actividad celulolítica de las cepas de hongos filamentosos, para realizar una selección de las que muestren mayor producción.
- Analizar cinéticamente la producción de enzimas celulolíticas en fermentación en medio líquido.
- Identificar genéticamente los microorganismos con mayor producción de enzimas celulolíticas.

6. MARCO TEORICO

La producción de enzimas para uso industrial tuvo sus orígenes en Dinamarca y Japón, a finales del siglo XIX, cuando se produjeron las primeras preparaciones de renina a partir del estómago de terneros y de amilasa de origen fúngico. Las enzimas son productos de las células y por lo tanto pueden obtenerse a partir de tejidos animales, tejidos vegetales o mediante procesos de fermentación empleando microorganismos seleccionados.

Debido a que las aplicaciones industriales de las enzimas requieren que estas sean producidas a gran escala y bajo costo, el empleo de algunas enzimas de origen vegetal y animal ha ido decayendo, a favor de las enzimas de origen microbiano (Carrera J. 2002).

A lo largo de la historia se han venido empleando las enzimas para usos industriales, una de las enzimas comúnmente utilizadas es la celulasa obtenidas mediante fermentación de diferentes microorganismos, los cuales han sido estudiados en varios sustratos. La optimización de la producción de enzimas a partir de microorganismos depende de una serie de factores interrelacionados, lo que significa que una enzima solo puede sintetizarse durante parte de su ciclo de crecimiento.

6.1 Microorganismos y los alimentos

Los microorganismos son formas de vida muy pequeñas que sólo pueden ser observados a través del microscopio. En este grupo están incluidas las bacterias, los virus, los mohos y las levaduras. Algunos microorganismos pueden causar el deterioro de los alimentos entre los cuales se encuentran los microorganismos patógenos, que a su vez pueden ocasionar enfermedades debido al consumo de alimentos contaminados. Adicionalmente, existen ciertos microorganismos patógenos que no causan un deterioro visible en el alimento. Sin embargo, por otro lado existen también algunos microorganismos que son beneficiosos y que pueden ser usados en el procesamiento de los alimentos con la finalidad de prolongar su

tiempo de vida o de cambiar las propiedades de los mismos (por ejemplo, para la fermentación llevada a cabo para la elaboración de las salchichas, el yogur y los quesos).

Los microorganismos son capaces de realizar una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse a muchos ambientes diferentes (Madigan, *et al.*, 2003).

6.2 Hongos

Los hongos forman dos grupos: los hongos filamentosos multicelulares, o hifas, y las levaduras unicelulares. El comportamiento único y distintivo de la organización celular de los hongos filamentosos presenta retos especiales al describir su forma y función. El citoplasma dentro de los filamentos tubulares se puede mover en respuesta a las condiciones ambientales, campos eléctricos, superficies y gravedad. Esta inusual formación celular distingue a los hongos filamentosos de entre el resto de los organismos del suelo y les permite formar redes de hifas que son predominantemente benéficas para la mayoría de las plantas.

6.2.1 Estructura celular

Las células fúngicas son eucariotas, poseen el núcleo y las estructuras propias de estas células, como son el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, las mitocondrias y un citosqueleto, así como los ribosomas, en un citoplasma limitado por una membrana celular, que posee esteroides, recubierta por una pared rígida característica (Figura 1).

La pared celular de los hongos está formada por capas o estratos, constituidos por diversos polímeros polisacáridos fibrilares, como la quitina, la celulosa y por estructuras amorfas como otros glucanos y mananos. La pared de los hongos también contiene proteínas, asociadas a los polisacáridos y lípidos.

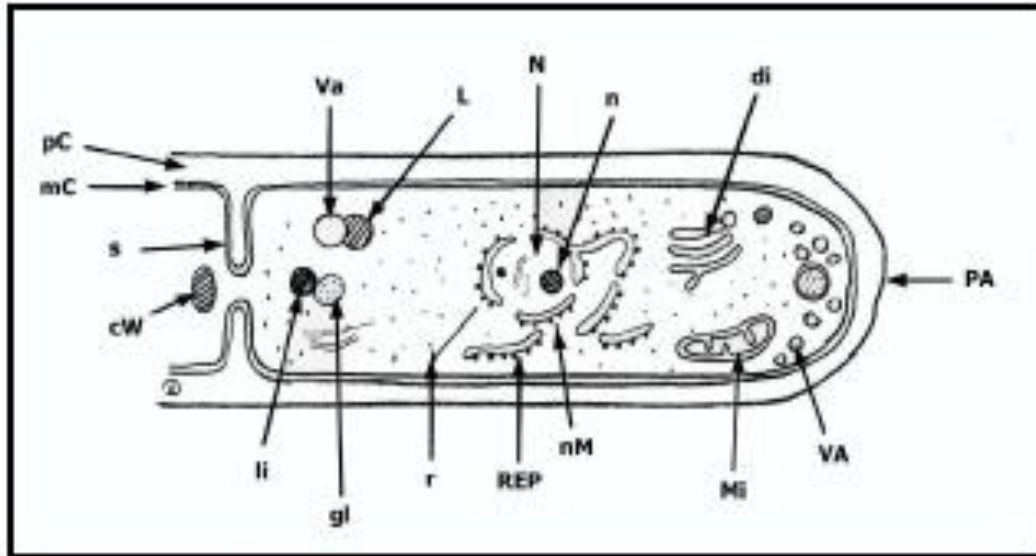


Figura 1: Ultraestructura de la célula fúngica

PA: polo apical; VA: vesícula apical; N: núcleo; a: nucléolo; di: dictiosomas; Mi: mitocondria; REP: retículo endoplásmico; r: ribosomas; li: liposomas; gl: gliosomas; mN: membrana nuclear; Va: vacuola; L: lisosoma; Pc: pared celular; Mc: membrana citoplásmica; s: septum, cW: cuerpo de woronin.

6.2.2 Morfología

Los hongos forman un grupo de organismos heterogéneos en el ámbito morfológico. Unos son unicelulares y están constituidos por células aisladas, ovales, denominadas levaduras. Otros son pluricelulares y están constituidos por células alargadas, cilíndricas, de 3 a 12 μm de diámetro, dispuestas linealmente formando unas estructuras filamentosas denominadas hifas, que pueden alcanzar varios centímetros de longitud.

En algunos hongos filamentosos las hifas se entrecruzan desordenadamente formando matas con aspecto algodonoso de diversos colores que pueden verse enmohecendo alimentos, paredes húmedas y otros lugares en la naturaleza en cuanto alcanzan su tamaño macroscópico.

Los hongos filamentosos se dividen en inferiores o superiores, por las características de las hifas anchas o finas respectivamente.

El micelio se divide en dos partes, la que penetra en los sustratos nutritivos, denominada micelio vegetativo, y la que se dispone en la superficie y contiene las estructuras reproductoras, que constituye el micelio aéreo o reproductor.

6.2.3 Metabolismo

Los hongos poseen un metabolismo heterótrofo semejante al de otras células eucariotas. Los nutrientes complejos se digieren mediante exoenzimas liberadas al medio, siendo posteriormente absorbidos.

La glucólisis, seguida de la respiración aerobia o ciclo de Krebs constituyen la vía habitual para la obtención de energía a partir de la glucosa. La mayoría de los hongos son aerobios estrictos y otros son aerobios facultativos.

Un número limitado de hongos son únicamente fermentadores y son aerotolerantes.

Los hongos, como las bacterias, pueden cultivarse en medios artificiales, tienen requerimientos simples y toleran variaciones de pH y osmolaridad.

6.2.4 Reproducción

Muchos mohos pueden reproducirse también a través de esporas sexuales, generadas por meiosis, o división reductora, de un núcleo diploide (meiosporas). En la meiosis, el número de cromosomas se divide por la mitad. Las esporas sexuales contienen sólo un cromosoma de cada par homólogo. La condición diploide se restablece cuando dos estructuras haploides se unen, completando el ciclo vital. Los mohos a los que no se les conoce ciclo sexual, se consideran hongos imperfectos (Méndez, 2013).

Los mohos con estructuras reproductoras sexuales (teleomorfos) corresponden a tres grupos: ascomicetos, basidiomicetos y zigomicetos. Los ascomicetos producen sus esporas en ascos, que generalmente se forman dentro de un complejo cuerpo fructífero, el ascoma. De forma similar, los basidiomicetos desarrollan sus esporas sexuales externamente, en los basidios que se hallan en un complejo cuerpo fructífero: el basidioma. Pero este grupo también comprende a los carbonos y las

royas, organismos de interés agronómico por ser parásitos vegetales. Los zigomicetos producen zigosporas a veces visibles a ojo desnudo. En condiciones naturales, los mohos se reproducen en la mayoría de los casos asexualmente, las estructuras reproductoras sexuales sólo aparecen ocasionalmente en circunstancias favorables (Méndez, 2013).

6.3 Definición de enzima

Los enzimas son biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula, son muy eficaces como catalizadores ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas mucho más que cualquier catalizador artificial conocido, y además son altamente específicos ya que cada uno de ellos induce la transformación de un sólo tipo de sustancia y no de otras que se puedan encontrar en el medio de reacción.

Las enzimas que permanecen asociadas con la célula y no son normalmente excretadas al medio. En algunos casos, como en el caso de lipasa e invertasa, el que la enzima sea intracelular o extracelular depende del microorganismo utilizado.

Pocas enzimas intracelulares son producidas a gran escala y las ventas de estas enzimas representan solo un pequeño porcentaje del total de ventas. Sin embargo, la producción de enzimas intracelulares es de interés por varias razones. Con los avances en las técnicas de inmovilización, el uso de enzimas y células inmovilizadas está en aumento. Por ejemplo, se han establecido procesos comerciales para la producción de jarabes de fructosa usando glucosa iso-merasa.

Las enzimas han sido aplicadas a usos prácticos durante miles de años, en forma de preparaciones crudas de plantas o de animales, o como consecuencia del desarrollo permitido por los microorganismos y han sido más consecuentemente aplicadas en operaciones industriales a lo largo de los últimos años (Bu'lock y Kristiansen, 1991).

6.3.1 Clasificación de enzimas

Muchas enzimas han sido designadas añadiendo el sufijo –asa al nombre del sustrato, es decir, de la molécula sobre la cual la enzima ejerce su acción catalítica.

Las enzimas se dividen en seis clases principales que son: oxidoreductasas, transferasas, hidrolizas, liasas, isomerasas y ligasas; cada una de las cuales se dividen a su vez en subclases de acuerdo con el tipo de reacción catalizada. Cada enzima es designada por un nombre recomendado, generalmente corto y apropiado para su uso habitual; por un nombre sistemático, que identifica la reacción que cataliza, y por un número de clasificación que se emplea cuando se precisa la identificación inequívoca de la enzima (Julio G. Peretó, 2007).

En función de su acción catalítica específica, las enzimas se clasifican en 6 grandes grupos o clases:

1. **Oxidoreductasas.** Catalizan reacciones de oxidación-reducción. Entre las subclases de este grupo se encuentran deshidrogenasas, oxidasas, oxigenasas, reductasas, peroxidasas.

2. **Transferasas.** Catalizan reacciones en las que hay una transferencia de grupos de molécula a otra. Entre los ejemplos de estos grupos están amino, carboxilo, carbonilo, metilo, fosforilo y acilo (RC=O). Los nombres comunes triviales suelen incluir el prefijo trans. Entre los que están transcarboxilasas, tranmetilasas y transaminasas.

3. **Hidrolasas.** Catalizan reacciones en las que se produce la ruptura de enlaces por la adición de agua. Entre las hidrolasas están esterases, fosfatasas y peptidasas.

4. **Liasas.** Catalizan reacciones en las que se eliminan grupos (p. ej., H₂O, CO₂ Y NH₃) para formar un doble enlace o se añaden a un doble enlace. Los ejemplos son liasas, descarboxilasas, hidratasas, dehidratasas, desaminasas y sintasas.

5. **Isomerasas.** Se trata de un grupo heterogéneo de enzimas, las cuales catalizan varios tipos de reordenamiento intramoleculares. Las epimerasas catalizan la

inversión de átomos de carbono asimétrico. Las mutasas catalizan la transferencia intramolecular de grupos funcionales.

6. **Ligasas.** Catalizan la formación de un enlace entre dos moléculas de sustrato. La energía para estas reacciones la aporta siempre la hidrólisis del ATP. Los nombres de muchas ligasas incluyen el término sintetasa. Otras ligasas se denominan carboxilasas.

6.4 Condiciones que afectan la actividad enzimática

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

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

6.4.1 Concentración de enzima sustrato

Algunas enzimas permanecen libres en condiciones bajas de sustrato y no se alcanza la máxima velocidad. Cuando el sustrato se encuentra en exceso, toda la enzima se transforma en enzima sustrato (ES) y la reacción se realiza a su máxima velocidad. Finalmente la reacción entra en equilibrio cuando no ocurren más cambios. Sin embargo si el producto (P) se quita después de que se produjo, impedirá el establecimiento del equilibrio; por lo tanto el sustrato (S) se seguirá convirtiendo en producto (P).

En la Figura 2 se observa el efecto de la concentración del sustrato sobre el índice de la actividad enzimática. El índice aumenta rápidamente con incremento inicial en el sustrato; incrementos posteriores en las concentraciones del sustrato no tienen efecto sobre el índice; ya que este se vuelve independiente de la concentración del sustrato, el mismo efecto ocurre con un incremento de la concentración de la enzima, como se aprecia en la Figura 3.

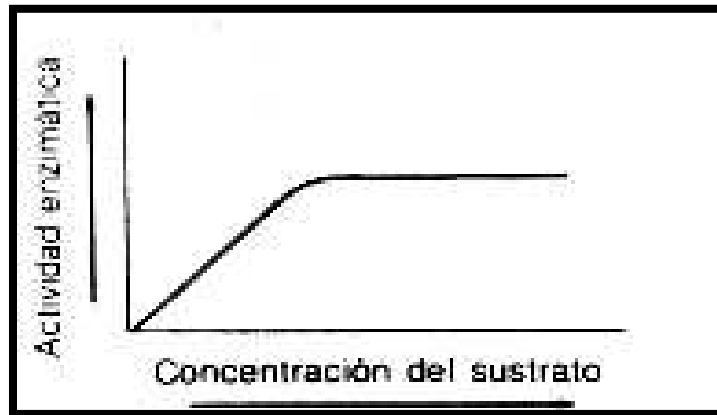


Figura 2: Efecto de la concentración del sustrato sobre el índice de la actividad enzimática (Lenhiger 1993).

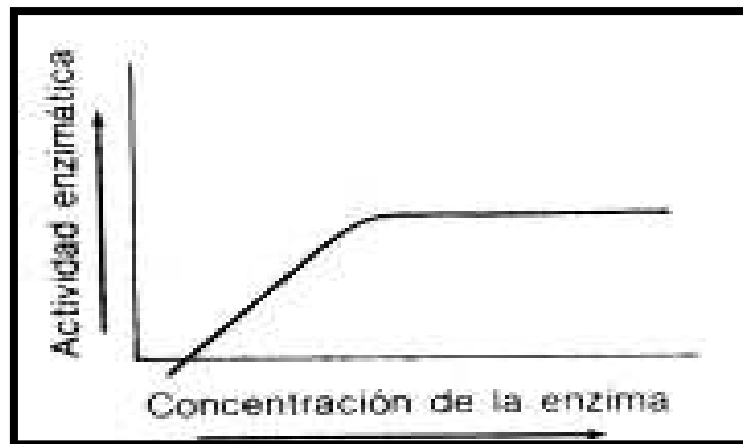


Figura 3: Efecto de la concentración de la enzima en la actividad enzimática (Lenhiger 1993).

6.4.2 Efecto del PH

La mayoría de los enzimas presentan un pH óptimo para el cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese pH la actividad disminuye bruscamente. Este efecto se debe a que, al ser las enzimas de naturaleza proteica, al igual que otras proteínas, se desnaturalizan y pierden su actividad si el pH varía más allá de unos límites estrechos (Figura 4). De ahí la conocida importancia biológica de los sistemas tampón.

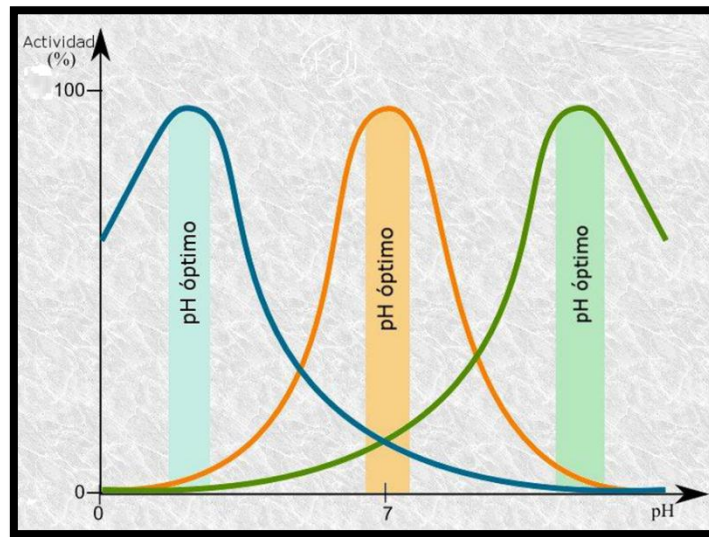


Figura 4: pH óptimo en el cual la actividad de las enzimas es máxima.

En la mayor parte de los casos el pH óptimo está próximo a la neutralidad, en consonancia con el pH intracelular, pero existen enzimas con pH óptimo muy diverso según sea el pH del medio en el que habitualmente actúan (los enzimas proteolíticos del jugo gástrico tienen pHs óptimos próximos a 2 ya que este es el pH de dicho jugo). Por último existen algunos enzimas a los que el pH no afecta en absoluto.

6.4.3 Efecto de la temperatura.

Al igual que ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa con la temperatura. La variación de la actividad enzimática con la temperatura es diferente de unas enzimas a otras en función de la barrera de energía de activación de la reacción catalizada. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en otras reacciones químicas, en las reacciones catalizadas por enzimas se produce un brusco descenso de la actividad cuando se alcanza una temperatura crítica. Este efecto no es más que un reflejo de la desnaturalización térmica del enzima cuando se alcanza dicha temperatura. Si representamos gráficamente la variación de la actividad de las enzimas en función de la temperatura (Figura 5) da la impresión de que existe una temperatura "óptima" análoga al pH óptimo estudiado anteriormente; hay que resaltar que esa aparente temperatura óptima no es más que el resultado de dos procesos contrapuestos: 1) el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura y 2) la desnaturalización térmica del enzima.

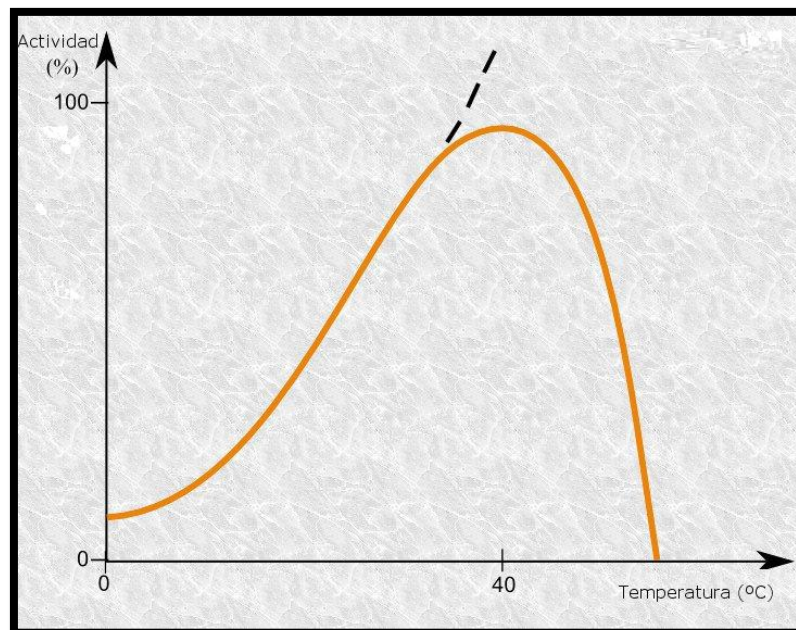


Figura 5: Variación de la actividad de las enzimas en función a la temperatura.

6.5 Celulosa

La celulosa es el carbohidrato más abundante en la biomasa vegetal, forma el 40-60 % de la pared celular de las plantas (Paredes *et al.*, 2010; Plomion *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2008).

La celulosa en su forma nativa consiste en una cadena lineal de unidades de glucosa con enlaces glucosídicos β -1,4. Por lo que constituye una abundante fuente de carbono limitada a los microorganismos capaces de hidrolizar este enlace, a expensas de un complejo sistema de enzimas denominadas celulasas o celulolíticas.

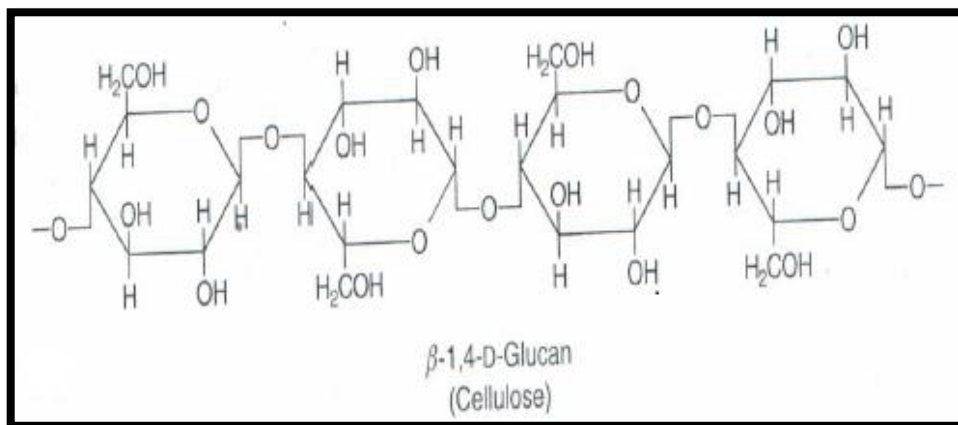


Figura 6: Estructura Química de la celulosa (Heldt 1997)

La susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática está afectada por la estructura natural de los materiales celulósicos, la celulosa está asociada a lignina y hemicelulosa, con una conformación capilar, un orden molecular variable y fuerte cristalinidad. Por ello, se considera el pretratamiento de los sustratos lignocelulósicos como un paso necesario para una hidrólisis enzimática óptima, por un aumento de la accesibilidad a la celulosa (Yoandy *et al.*, 2011).

6.6 Celulasas

Las celulasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos de la celulosa, transformándola en múltiples monómeros de glucosa y utiliza dos mecanismos de hidrólisis del enlace glicosídicos que generan dos posibles configuraciones estereoquímicas finales, esta enzima lleva a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición β (mecanismo de retención) y otro tipo en la que se pierde (mecanismo de inversión) (Whithers, 2001).

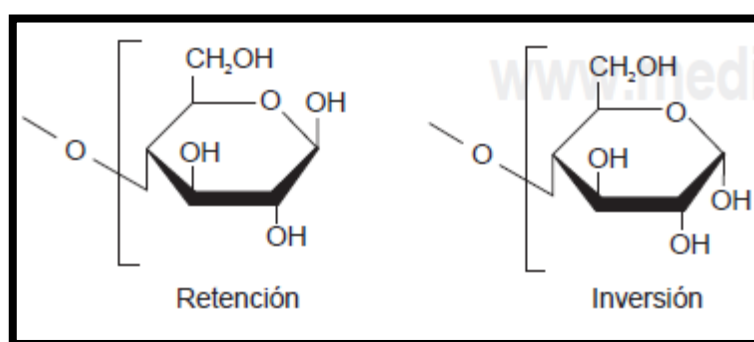


Figura 7: Glucosa después de la hidrólisis de celulosa (Whithers, 2001).

El interés por las celulasas empezó alrededor de los años 50 debido a su enorme potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles. Cabe señalar que la lignocelulosa es la fuente de energía renovable más abundante de la tierra. Está formada por tres componentes principales que son: celulosa, hemicelulosa y lignina, y su contenido es bajo en cenizas, proteínas, grasas y ceras (Paredes, 2010).

Cada complejo celulasa está compuesto por una variedad de enzimas con diferentes especificidades y modos de acción, que actúan en sinergismo para degradar la celulosa (Yoandy *et al.*, 2011) estas presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa (Yoandy *et al.*, 2011).

En la industria textil, las celulasas juegan un papel muy importante en el desteñido de telas de jean ya que se usan para remover el color azul índigo y dar una apariencia de desteñido. Tradicionalmente este desteñido se realizaba con piedra pómez (“stone wash”). En la actualidad, una pequeña cantidad de enzima puede sustituir varios kilos de piedras. Con la reducción de las piedras se producen menos daño a las telas y menos desgaste de las lavadoras.

Las celulasas también son utilizadas en la industria de los detergentes. La enzima degrada las microfibrillas que se separan parcialmente de las fibras principales, restituyendo a las fibras una superficie suave y a la prenda su color original. Dentro de la industria alimenticia, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, entre otras aplicaciones.

6.6.1 Clasificación de celulasas

Cada complejo celulasa está compuesto por una variedad de enzimas con diferentes especificidades y modos de acción, que actúan en sinergismo para degradar la celulosa (Yoandy *et al.*, 2011). Las enzimas del complejo celulasa han sido agrupadas en tres componentes principales.

1) Exoglucanasas o exo- β -1,4-D-glucanasas (E.C.3.2.1.91). También llamadas cellobiohidrolasas. Trabajan consecutivamente en cada extremo de la celulosa (Alcarraz *et al.*, 2008). Atacan los extremos terminales no reductores de la celulosa previamente fragmentada, liberando subunidades de celobiosa (Ferrer, 2011). Producen glucosa o celobiosa (Alcarraz *et al.*, 2008).

2) Endoglucanasas o endo- β -1,4-D-glucanasa (E.C.3.2.1.4) Cortan la celulosa en sitios al azar y producen cadenas de oligosacáridos de diferentes longitudes (Alcarraz *et al.*, 2008). Hidrolizan aleatoriamente los enlaces β -glucosídicos en el interior de las moléculas de celulosa, con una rápida disminución del largo de las cadenas y un lento incremento en los grupos reductores (Ferrer, 2011).

3) β -1,4-Glucosidasas (E.C.3.2.1.21). Cortan la celobiosa y otros oligosacáridos para producir glucosa (Alcarraz *et al.*, 2008).

6.6.2 Hidrolisis enzimática de la celulasa

La celulosa es rápidamente hidrolizada en la naturaleza por organismos aeróbicos del suelo, particularmente por los hongos que degradan la madera. Los organismos anaeróbicos del rumen y del intestino son responsables de la digestibilidad de la celulosa en los animales rumiantes y en los herbívoros (Carrera J, 2002).

Cada complejo celulasa está compuesto por una variedad de enzimas con diferentes especificidades y modos de acción, que actúan en sinergismo para degradar la celulosa (Yoandy *et al.*, 2011). Las enzimas del complejo celulasa han sido agrupadas en tres componentes principales. Las endo- β -glucanasa o 1,4- β -D-glucan glucanohidrolasas que hidrolizan aleatoriamente los enlaces β -glucosídicos en el interior de las moléculas de celulosa, con una rápida disminución del largo de las cadenas y un lento incremento en los grupos reductores. Como complemento, las exo- β -glucanasas o 1,4- β -D glucan celobiohidrolasas atacan los extremos terminales no reductores de la celulosa previamente fragmentada, liberando subunidades de celobiosa. Esta es dividida por las β -glucosidasas o celobiasas en dos moléculas de glucosa libre (Ferrer *et al.*, 2011).

6.7 Factores que determinan la actividad enzimática de las celulasas

Existen diversos factores asociados al sistema enzimático de las celulasas, esto incluye la inhibición del complejo de celulasas por el producto final, inactivación térmica, sinergismo e irreversible adsorción de las enzimas, teniendo estos últimos la mayor influencia en la tasa de degradación del polisacárido (Mansfield *et al.*, 1999).

6.7.1 Sinergismo

El sinergismo ocurre cuando la acción combinada de dos o más enzimas aumenta la tasa de acción sobre el sustrato respecto a la acción individual. En algunos estudios se ha observado una actividad cooperativa de las celulasas provenientes de ciertos hongos filamentosos en el que las endoglucanasas actúan a lo largo de las cadenas de celulosa generando sitios donde actúan las Exoglucanasas las cuales liberan celobiosa como producto principal, la β -glucosidasa es necesaria para hidrolizar la celobiosa previniendo de esta manera la inhibición de las Exoglucanasas generando así un aumento de la tasa hidrolítica (Mansfield *et al.*, 1999).

6.7.2 Absorción

La hidrólisis de la celulosa difiere de otras reacciones enzimáticas en que el sustrato es insoluble y requiere una previa absorción de la enzima al sustrato. La absorción de las celulasas es facilitada por la presencia de dominios en el sustrato los cuales son susceptibles al clivaje proteolítico mediante uniones por fuerzas de Van Der Waals y puentes de hidrógeno.

Además dichos dominios cuentan con aminoácidos aromáticos que conforman una especificidad adicional y estabilidad al complejo enzima–sustrato (Mansfield *et al.*, 1999).

Existen dos teorías para explicar la interacción de los dominios con la celulosa. La primera se basa en que los dominios incrementan la concentración local de enzimas en la superficie de la celulosa, la segunda propone que los dominios son el instrumento que permite el rompimiento de cadenas de celulosa cristalina pero no de celulosa amorfa (Mansfield *et al.*, 1999).

6.8 Factores que afectan la acción enzimática de la celulasa

La metabolización de la celulosa está dada por diferentes factores los cuales afectan o benefician a la misma.

6.8.1 Interacción enzima sustrato

Como la celulosa es un sustrato insoluble, sus características cinéticas difieren sustancialmente de las usuales reacciones homogéneas catalizadas por enzimas. En este caso la hidrólisis enzimática se produce en medio heterogéneo y envuelve las siguientes etapas. a) transferencia de moléculas de enzima (E) de la solución acuosa a la superficie de sustrato de la celulosa (S), b) formación del complejo enzima sustrato (ES), previa absorción de las moléculas de enzima sobre la célula, c) transferencia de las moléculas de agua hacia los centros activos del complejo (ES), d) reacción en la superficie del sustrato y transferencia de los productos solubles (P), glucosa y celobiosa, desde la superficie de la celulosa hasta el baño acuoso, e) descomposición de las cadenas de celobiosa en glucosa por medio de las β -glucosidasas (Bohórquez G, 2004).

6.8.2 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 termófila puede degradar la celulosa por arriba de los 45°C (Alexander, 1980). La velocidad de reacciones catalizadas por enzimas se incrementa en general con la temperatura dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activa, debido a que hay más moléculas con la energía suficiente para entrar en el estado de transición (Julio G. Pereto 2007).

6.8.3 Aireación

La aireación también rige la composición de la flora activa. A causa del proceso anaeróbico, el metabolismo de la celulosa es reducido significativamente en medios deficientes de oxígeno en comparación con hábitats aireados (Alexander, 1980).

6.8 Microorganismos que hidrolizan celulasas

Los microorganismos celulolíticos (que degradan celulosa) desempeñan un papel importante en la biosfera reciclando este polímero. Estos microorganismos pueden ser aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos (Wang, 2002).

GRUPO	ESPECIES
Hongos aeróbicos	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Sporotrichum Pulverulentum</i> , <i>Fusarium Solani</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> y <i>Trichoderma koningii</i> .
Hongos aeróbicos termófilos	<i>Sporotrichum thermophile</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i> y <i>Humicola insolens</i> .
Hongos anaeróbicos mesofílicos	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Piromonas communis</i> , <i>Sphoeromonas communis</i> .
Bacterias aeróbicas mesofílicas y termófilas	<i>Cellulomonas sp.</i> , <i>Cellvibrio sp.</i> , <i>Microbispora bispora</i> y <i>Therrmomonospora sp.</i>
Bacterias anaeróbicas mesofílicas y termófilas	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefociens</i> y <i>Clostridium thermocellum</i> .

Dentro del grupo de hongos aeróbicos, el hongo filamentoso *Trichoderma reesei* es uno de los más estudiados y se caracteriza por su efectividad en la degradación de la celulosa nativa y cristalina mediante su complejo celulolítico que presenta las tres actividades necesarias para la hidrólisis de la celulosa (endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa). Otra ventaja que presenta el uso de este

microorganismo, es su estabilidad en reactores agitados bajo condiciones de pH ácido y a 50 °C durante 48 horas.

Entre los microorganismos, los termófilos son de interés por su capacidad para producir enzimas celulolíticas termoestables, las cuales son en general estables bajo condiciones severas, incluso en niveles de pH altamente ácidos o alcalinos así como temperaturas de hasta 90 °C.

Las enzimas celulolíticas producidas por las bacterias del género *Bacillus* presentan básicamente actividad endo- β -1,4-glucanasa y exo- β -1,4-glucanasa; pero tienen una característica particular, en especial las enzimas de *Bacillus subtilis* y es la resistencia a ser inhibida por la propia glucosa o celobiosa que producen. En la actualidad existen disponibles numerosos preparados enzimáticos comerciales que contienen principalmente actividad celulolítica (endo- β -1,4-glucanasa, exo- β -1,4-glucanasa, β -1,4-glucosidasa). Estos preparados enzimáticos son obtenidos de microorganismos de origen fúngico y bacteriano, que principalmente provienen de los microorganismos *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis*.

Según (Vílchez, 2000) los Géneros y especies de hongos tales como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, incluyendo además hongos comestibles como: *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sp.*, producen celulasas.

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 lograrse la completa degradación de la celulosa debido a que muestra algunas ventajas para la producción industrial de enzimas: tiene un alto nivel de producción, presenta buenas propiedades para el cultivo, lo que posibilita la producción a gran escala, sus productos son generalmente considerados como GRAS (Villena *et al.*, 2003).

Actualmente las celulasas comerciales provienen de especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo la cantidad de enzima producida por

estos microorganismos es todavía motivo de múltiples investigaciones, puesto que existen múltiples factores involucrados, entre ellos el medio de cultivo, que juega un rol determinante al momento de la expresión de la enzima.

6.9 Tecnología de la fermentación o bioproceso

La tecnología de la fermentación o bioproceso es un componente importante de la mayoría de los procesos de biotecnología tanto nuevos como viejos y normalmente implica células vivas completas (de microbios, mamíferos o plantas), organulo9s o enzimas como biocatalizadores y cuyo objetivo es producir cambios químicos y/o físicos en materiales orgánicos. Para poder ser viable en un determinado contexto industrial, el bioprocesamiento debe presentar ventajas sobre otros métodos de producción competitivos, tales como la tecnología química (Smith, 2006).

6.9.1 Biorreactores

Los biorreactores son los vehículos contenedores de cualquier proceso de producción basado en la biotecnología, ya sea para la fabricación de cerveza, compuestos orgánicos o aminoácidos, antibióticos, enzimas o vacunas o para procesos de biorremediación. Para todo proceso de biotecnología se debe diseñar el sistema contenedor más apropiado para crear el entorno adecuado para optimizar el crecimiento y la actividad metabólica del biocatalizador. Los biorreactores oscilan desde simples recipientes abiertos con o sin agitación a sistemas integrados asépticos complejos que implican niveles variables de control avanzado por ordenador. El origen para una enzima nueva o mejorada, esta guiado por la intención de que el cultivo del organismo sea llevado a cabo en reactores agitados, aireados (Bu'lock y Kristiansen, 1991).

Los biorreactores pueden ser de dos tipos distintos. Dentro del primer grupo se encuentran principalmente sistemas no asépticos donde no es imprescindible trabajar con cultivos completamente puros y el segundo tipo las condiciones asépticas son un prerequisite para una formación de producto exitosa como es el caso de los antibióticos vitaminas y polisacáridos.

Dentro de un biorreactor los microorganismos se encuentran suspendidos en un medio nutritivo acuoso q contiene los sustratos necesarios para el crecimiento del organismo y la formación del producto requerido (Smith, 2006).

El fermentador y su contenido han de esterilizarse antes del comienzo del proceso de fermentación y las condiciones de asepsia deben mantenerse durante la misma (Trevan *et al.*, 1990).

6.9.2 Fermentación

El proceso conocido como fermentación implica el empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica, catalizadas por enzimas. Los productos comerciales importantes de las fermentaciones industriales pertenecen a cuatro categorías principales: células microbianas, moléculas grandes como enzimas y polisacáridos, productos básicos y metabolitos secundarios que no son necesarios para el crecimiento celular. Las células utilizadas para obtener estos productos tienen una gran variedad de propiedades bioquímicas y fisiológicas. La producción comercial de productos de fermentación ha empleado principalmente diversas especies de bacterias, levaduras y hongos (Ward, 1989).

Para que un proceso de fermentación se desarrolle adecuadamente se debe establecer inicialmente el medio óptimo para el crecimiento de los microorganismos. Esto incluye la determinación de parámetros como pH, temperatura, oxígeno disuelto y nutriente, entre otros, con el fin de que el microorganismo ya sea hongo, bacteria o levadura, desarrolle apropiadamente su metabolismo y obtener de esta manera la base para un producto de interés industrial comercial.

En cualquier proceso de fermentación que sea objeto de estudio se deben evaluar una serie de variables para conocer, controlar y manipular el curso de la fermentación; estas variables se suelen dividir entre las que se pueden medir continuamente (temperatura, velocidad de agitación, presión, formación de espuma, oxígeno disuelto y pH principalmente) y las que típicamente se miden a ciertos

intervalos de tiempo (formación de biomasa y de producto y consumo de sustrato básicamente).

Los microorganismos implicados en los procesos de fermentación son principalmente quimiorganotrofos, es decir, que pueden obtener su energía y su fuente de carbono por la oxidación de compuestos orgánicos. Los hongos más importantes implicados en las fermentaciones industriales se clasifican en dos grupos: los zygomycotina, con hifas aceptadas como géneros *Mucor* y *Rhizopus* y los de deuteromicotina, septados u hongos imperfectos, por ejemplo los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillus* y *Fusarium*. En general, la producción masiva de microorganismos biocontroladores puede llevarse a cabo mediante dos técnicas fermentación líquida o sumergida y fermentación sólida o en superficie (Ward, 1989).

6.9.3 Fermentación sumergida

El cultivo sumergido, también llamado fermentación líquida, es el que se refiere a un sistema en el cual los sustratos están disueltos o suspendidos en un medio acuoso y son agitados para conservar la homogeneidad del sistema.

Este sistema de fermentación tomó auge durante la II Guerra Mundial debido a que la producción de antibióticos como la penicilina, hizo que el desarrollo de tecnología y equipamiento para este tipo de fermentación se desarrollara de manera acelerada aun cuando el sistema de fermentación en estado sólido es más antiguo.

La fermentación líquida es definida como la técnica de crecimiento de microorganismos en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos en el medio de cultivo y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones fisicoquímicas controladas, este es el método más usado por la industria biotecnológica. En comparación con la fermentación sólida, presenta las siguientes ventajas: se obtiene un producto más homogéneo, es más sencillo el control de los factores de fermentación como temperatura, aireación, agitación y PH, presenta mejor distribución de oxígeno y del calor suministrado al sistema, y se puede llevar a cabo la medición directa de la biomasa. La fermentación sumergida se realiza

principalmente usando tres métodos de eliminación de sustrato: fermentación en lote, fermentación en lote alimentado y fermentación en medio continuo (Cruz, 2007).

Una vez que los procesos de fermentación líquida han alcanzado niveles de producción óptima, la retirada del agua es un factor principal en el coste de recuperación de bioproducto y el procesamiento posterior.

6.9.4 Fermentación en medio sólido

La fermentación sólida es un proceso que involucra sólidos en ausencia parcial o total de agua libre; sin embargo, el sustrato debe tener la humedad suficiente para permitir el crecimiento del microorganismo y que lleve a cabo todos sus procesos metabólicos (Pandey, 2003); además, sirve como fuente de nutrientes y como soporte para que los microorganismos crezcan sobre el (Demain *et al.*, 2000). Este tipo de procesos tienen bajos requerimientos de energía y producen una menor cantidad de aguas residuales en comparación con los procesos de fermentación líquida (Pandey, 2003).

Los hongos filamentosos constituyen el grupo de microorganismos de mayor utilización en los procesos de fermentación sólida ya que su crecimiento en forma de micelio e hifas, así como su tolerancia a condiciones tales como baja actividad de agua y una alta presión osmótica, les proporcionan ventajas sobre otros microorganismos en la colonización de sustratos sólidos y su utilización como fuente de nutrientes (Krishna, 2005).

6.10 Biología molecular

La Biología molecular, se ocupa del estudio de las bases moleculares de la vida; es decir, relaciona las estructuras de las biomoléculas con las funciones específicas que desempeñan en la célula y en el organismo.

La biología molecular concierne principalmente al entendimiento de las interacciones de los diferentes sistemas de la célula, lo que incluye muchísimas relaciones, entre ellas las del ADN con el ARN, la síntesis de proteínas, el metabolismo, y el cómo todas esas interacciones son reguladas para conseguir un correcto funcionamiento de la célula.

6.10.1 Identificación molecular de hongos filamentosos

Taxonómicamente existen miles de especies de hongos. Por tal motivo es necesaria su identificación no solo morfológica si no también molecular y una forma de identificar estas especies es por medio de la técnica de ADN recombinante como la reacción en cadena (PCR) (Carranza, 2006).

Son numerosas las técnicas moleculares que se han utilizado para el estudio de los hongos; desde la cuantificación del contenido guanina/citosina del ADN nuclear hasta la hibridación ADN-ADN, técnicas clásicas que se han aplicado para determinar diferencias entre especies fúngicas e incluso para su identificación. No obstante, en los últimos años para tal finalidad destacan los métodos electroforéticos y de secuenciación, especialmente el análisis comparativo de secuencias nucleotídicas de un determinado gen o fragmento del mismo (Wengenack y Binnicker, 2009).

6.10.1.1 Extracción de ADN

La extracción y purificación del ADN son la base de cualquier protocolo en laboratorios de biología molecular y depende de la naturaleza del material inicial (micelio, esporocarpio, espora). Este procedimiento primero consiste en romper las células fúngicas, la segunda etapa remueve las proteínas celulares por

precipitación dejando el ADN en solución, finalmente, el ADN genómico es concentrado y desalado por precipitación con isopropanol (Carranza, 2006).

6.10.1.2 Determinación de pureza y cuantificación de ADN

La pureza del ADN es un factor muy importante para los subsecuentes análisis moleculares. Existen en general métodos diferentes para medir la cantidad de ácidos nucleicos en solución entre los cuales podemos mencionar el método de absorbancia y el de fluorescencia, la elección de estos está en función del método de extracción del ácido nucleico (Carranza, 2006).

6.10.1.3 Espectrofotometría

La capacidad que tiene el ADN de absorber luz a una determinada longitud de onda (260 nm) permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico en la muestra.

Las proteínas tiene un máximo de absorción a 280, así las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. El cálculo de una relación entre las lecturas a 260 y 280 nm es una manera común para hacer un estimado de la pureza o evaluar la contaminación de una preparación de ADN con proteínas del ácido nucleico, esta relación debe estar entre los valores 1.8 y 2.0 (Carranza, 2006).

6.10.1.4 Electroforesis en gel

La electroforesis en gel es un modo conveniente de cuantificar el ADN y analizar su estado físico al mismo tiempo, se puede visualizar si existen contaminantes que pueden estar presentes en la muestra de ADN o si esta degradado (Carranza, 2006).

La electroforesis es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial. Aquellas partículas cargadas positivamente migran hacia el cátodo y las cargas negativas hacia el ánodo (Sambrook y Russell, 2001).

6.10.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El impacto de la PCR en la biología molecular ha sido muy grande. Este es un método para obtener múltiples copias de fragmentos de ADN, utiliza una enzima polimerasa estable al calor y ciclos de calentamiento y enfriamiento para seleccionar y separar, sucesivamente las hebras de ADN y utilizar los fragmentos así obtenidos como plantillas para la formación de nuevo ADN completo (Carranza, 2006).

La reacción es muy sencilla, necesita cantidades de ADN muy pequeñas, algunos reactivos, una fuente de calor y unas pequeñas cadenas de nucleótidos que actúan como cebadores o primers (Sambrook y Russell, 2001).

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de ciencia y tecnología de alimentos de la universidad autónoma agraria Antonio narro el cual consta de etapas diferentes en las cuales se busca obtener resultados en cuanto a la producción de celulasas a partir de los microorganismos empleados.

Se dividió en dos pruebas cualitativas y cuantitativas.

7.1 Obtención y mantenimiento de la cepa de interés

7.1.2 Microorganismo utilizado

Las cepas empleadas en esta investigación fueron aisladas de manzanas y nueces en estado de deterioro en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

7.1.3 Aislamiento de hongos

Con la ayuda de un asa previamente estéril se tomaron las muestras directamente de las superficies de la manzana y nueces llevando acabo así la siembra en agar PDA por estría por agotamiento.

Los microorganismos se incubaron (Incubadora RIOSSA modelo E-71) a 32 °C durante 4 días monitoreando el crecimiento.

Una vez teniendo los cultivos se llevó a cabo la purificación y crecimiento de las cepas empleando las técnicas y condiciones ya mencionadas.

7.2 Identificación del cultivo e identificación macroscópica y microscópica

Los hongos se identificaron en primer lugar por la morfología de las colonias, color, textura y velocidad de crecimiento en las cajas Petri (Figura 8).

Se observaron los micelios y esporas mediante la técnica de azul de algodón que a continuación se describe.

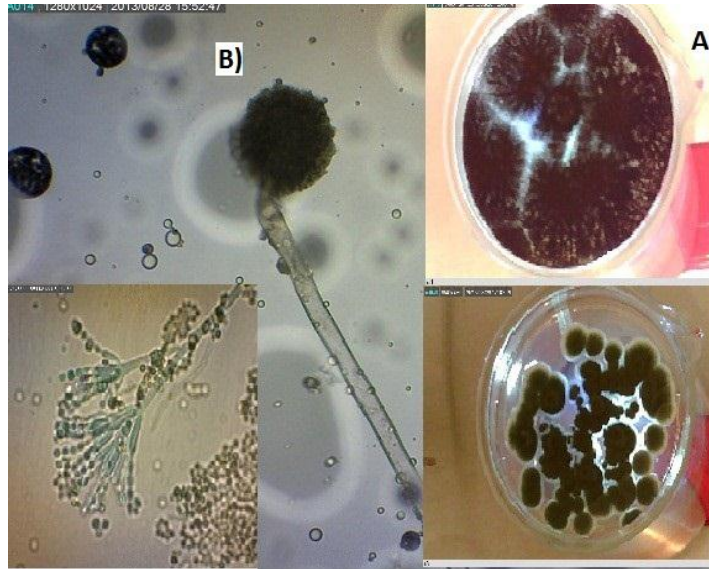


Figura 8: Identificación A) macroscópica y B) microscópica de hongos filamentosos

7.2.1 Tinción con lactofenol (azul de algodón)

Para asegurar que el cultivo de hongos filamentosos estuviera puro se realizó Tinción utilizando lactofenol.

Los hongos se observaron en muestras teñidas, primeramente se coloca una gota de azul de algodón en un portaobjeto y se tomó una muestra del hongo con la ayuda de un asa previamente quemada para evitar una contaminación del cultivo, se colocó sobre la gota de lactofenol seguido del cubreobjetos.

Posteriormente se procede a observar en el microscopio (LABOMET CxL) con el objetivo 40x (figura 9) y capturando la fotografía desde una computadora conectada a la cámara (Dinocapture 2.0).

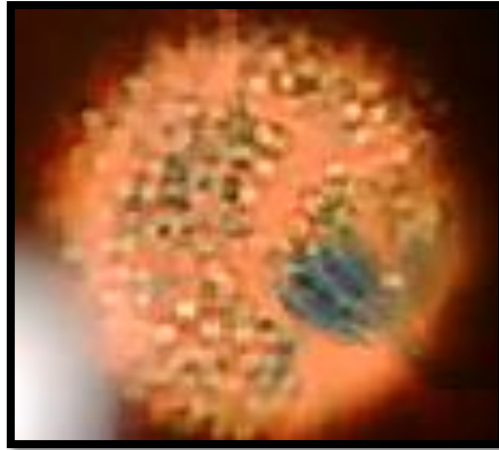


Figura 9: Fotografía microscópica de hongos (tinción azul de algodón, objetivo 40x).

7.3 Crecimiento de los microorganismos

7.3.1 Preparación de medios de cultivo

Se preparó Agar papa dextrosa (PDA) en un matraz Erlenmeyer, se calentó hasta ebullición durante 1 minuto y se esterilizó durante 15 minutos a 121°C (15 psi) procediendo a vaciar el medio en las cajas Petri estériles en condiciones asépticas; para esto se usó una campana de aire estéril (Scorpion Scientific campana de flujo laminar) y se dejaron solidificar, se almacenaron en el refrigerador a 4°C.

7.4 Preservación del microorganismo en glicerol-leche descremada

Se llevó a cabo la conservación de las cepas previamente purificadas mediante esta técnica. Se preparó una solución con glicerol (10 %) y leche descremada (Svelty 5%), y se homogenizó en 100 mL de H₂O destilada, se esterilizó a 121 °C (15 psi) durante 15 min. Se dejó enfriar y se tomó 10 mL de la mezcla preparada la cual se agregó a los matraces que contenía los microorganismos (cultivo puro) y con ayuda de una asa bacteriológica se desprendieron las colonias para su conservación, se tomaron 1000 µL de la solución contenido en el matraz y se colocó en tubos Eppendorf previamente esterilizados (121°C por 15 minutos) con

capacidad de 1.5 mL y se almacenaron a temperatura de congelación (-20°C) para su conservación.

7.5 Determinación de pruebas cualitativas

7.5.1 Actividad celulolítica

Para la medición de la actividad celulolítica se utilizó un medio a base de CMC de Na (carboximetil celulosa de Sodio) al 0.5 % Rojo congo (0.5 %), Agar nutritivo (1.5 %) y extracto de levadura (0.1%).

Se homogenizo y se esterilizó la solución a 121°C (15 psi) por 15 minutos se enfrió y se vaciaron en cajas Petri estériles haciendo un pozo en el centro del Agar rojo Congo se inoculo el microorganismos previamente conservados en glicerol y leche descremada manejando siempre un ambiente de asepsia para evitar contaminación del medio. Posteriormente se colocó en una incubadora (Prendo INO 650V-7 Incubadora Orbital) a una temperatura de 32°C monitoreando la coloración del medio por la degradación que ejercían cada una de las cepas sobre este, esta prueba se siguió monitoreando cada 24 horas hasta llegas a las 144 horas.



Figura 10: Testigo rojo congo (tiempo 0)

7.6 Determinación cuantitativa y cinéticas de fermentación

7.6.1 Fermentación en medio líquido

Una vez seleccionadas las mejores cepas degradadoras de la fuente de carbono mediante la técnica de rojo Congo se procede a llevar a cabo la fermentación en este caso en medio líquido.

7.6.2 Condiciones de la fermentación

Para llevar a cabo la fermentación en medio líquido se utilizó las cantidad de 100 mL de solución Czapek-Dox previamente esterilizado y la cantidad de Células/mL que se determinó en el Recuento de las mismas para el inicio de la fermentación con ayuda de una micropipeta. Se homogeniza el medio y se coloca un tapón evitar contaminación por acción de cualquier otro microorganismo no deseado.

En la primera fermentación se utilizó una concentración de CMC al 0.5% para la solución de Czapek-Dox y en las posteriores una concentración 0.1 % de CMC de Na (Anhidro, Glicolato de celulosa de Sodio, Golden Bell reactivos).

La concentración de células utilizadas fueron 2×10^6 células/mL las cuales se inocularon en condiciones de asepsia en los 100 ml de solución de Czapek-Dox previamente esterilizada a 121 °C (15 psi) durante 15 min y se incubó a 32° C (nova 44 incubator shaiker series) proporcionándole una agitación de 200 rpm para mantener la homogeneidad entre el medio y el microorganismo monitoreando el crecimiento de las misma cada 24 horas y la obtención del extracto enzimático y biomasa se realizó a diferentes tiempos tomando como inicio tiempo 0 hasta las 120 y 144 horas la fermentación se realizó por triplicado.

7.6.3 Preparación del inóculo

Se seleccionaron las cepas codificadas como M2, M4 Y M5 se sembraron en cajas Petri en agar papa dextrosa (PDA), se incubó a 32 °C (Prendo INO 650V-7 Incubadora Orbital) durante 4 días y las esporas producidas se cosecharon con 20

mL de solución de Tween 80 al 0.1 % previamente esterilizado a 120 °C (15 psi) durante 15 minutos. Una vez cosechadas y recolectadas, se tomaron 100 µL de la suspensión de esporas y se diluyó en 20 mL de H2O destilada, se utilizaron 20 µL de la dilución, se colocó en la cámara de Neubauer y se cubrió con un portaobjetos (Figura 11); se observó en un microscopio con el objetivo 40X. Las esporas presentes se contaron en los cuadros elegidos (formando una “Z”). Se contaron un total de 13 cuadros, cinco en cada línea (cinco arriba y cinco abajo) y tres de la diagonal que cruza el centro uniendo las líneas.

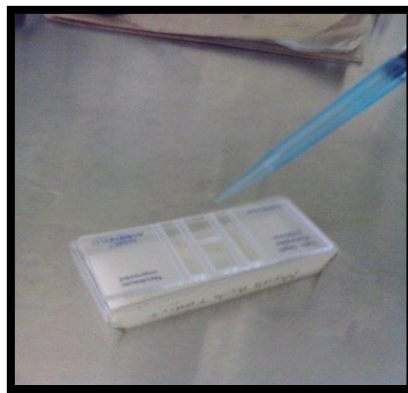


Figura 11: Suspensión de esporas sobre la cámara de Neubauer

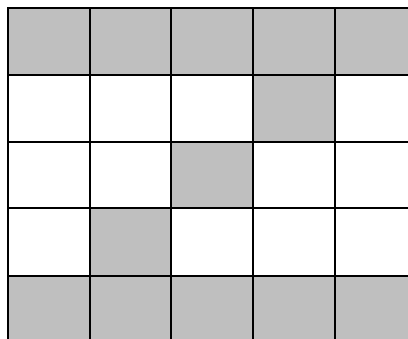


Figura 12: Diagrama para el conteo de esporas

Se determinó el número de esporas por mL utilizando la siguiente fórmula:

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

El resultado obtenido del recuento de células es lo que se inocula en cada uno de los matraces que contiene Czapek-Dox para el inicio de la fermentación.

7.6.4 Extracción enzimática de fermentación en medio líquido

Cada una de las muestras con sus respectivos tiempos fueron recolectados para su filtrado y así recuperar el extracto enzimático con ayuda de una bomba de vacío (Millipore), matraz Kitazato y un embudo de porcelana, cada fermentación a diferentes tiempos se filtró por triplicado con papel filtro Whatman N° 1 (Maciel et al., 2009) y se almacenaron en tubos de plástico Corning 430290 de 50 mL a 4°C.

7.7 Determinación de la actividad enzimática

7.7.1 Determinación de azúcares reductores (método de Miller 1989) fermentación con CMC al 0.5%.

Mezcla de reacción (MR)

En un tubo de ensaye se colocó 700 µL de carboximetil celulosa al 0.5 %, 300 µL de extracto enzimático, incubando a 55°C durante 5 min en un baño María (Thermo Scientific), se adicionaron 250 µL de buffer acetato sódico 50 mM pH 6.0 y 1250 µL de DNS, se sometió a ebullición durante 5 minutos, para detener la reacción en la muestra se sometió a un baño de hielo durante 5 minutos se dejó 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser leído a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV).

Blanco enzimático (BE)

En un tubo de ensaye para el blanco enzimático se adiciono 700 µL de carboximetil celulosa al 0.1%, 250 de buffer Acetato sódico 50 mM pH 6.0, 1250 µL de DNS y 300 µL de extracto enzimático, incubando a 55°C durante 5 min en un baño María (Thermo Scientific), se sometió a ebullición durante 5 minutos, para detener la reacción en la muestra se sometió a un baño de hielo durante 5 minutos se dejó 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser leído a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV).

Blanco de sustrato (BS)

Para el blanco de sustrato se añadieron 700 μL de carboximetil celulosa al 0.5%, 550 de buffer Acetato sódico 50 mM pH 6.0, 1250 μL de DNS, incubando a 55°C durante 5 min en un baño María (Thermo Scientific), se sometió a ebullición durante 5 minutos, para detener la reacción en la muestra se sometió a un baño de hielo durante 5 minutos se dejó 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser leído a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV).

La mezcla de reacción (MR) y el Blanco enzimático (BE) se compararon con una curva patrón de glucosa al 0.5%.

7.7.2 Determinación de azúcares reductores (método de Miller 1989) fermentación con CMC de sodio al 0.1%

Para la actividad enzimática de los extractos de la fermentación con CMC de sodio al 0.1% se empleó el método de Ghose. T.K. (1987) en la determinación de endocelulasas Y exocelulasas determinando los azúcares reductores de las muestras seleccionadas por el método de Miller (1989).

7.7.2.1 Determinación de endocelulasas

En esta prueba se detecta la actividad de las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en las regiones internas de la molécula de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización.

Mezcla de reacción (MR)

En un tubo de ensaye para la mezcla de reacción se adiciono 200 μL de carboximetil celulosa al 0.1%, 50 μL de extracto enzimático, incubando a 50°C durante 10 min en un baño María (Thermo Scientific), se sometió a ebullición durante 5 minutos, se adiciono 250 μL de Buffer de Acetato (0.1 M ; 4.8 pH), 1250 μL de DNS, se sometió a una segunda ebullición, para detener la reacción en las muestra se sometió a un baño de hielo durante 5 minutos se deja 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser leído a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV).

Blanco Enzimático (BE)

En un tubo de ensaye para la mezcla de reacción se adiciono 200 µL de Buffer de Acetato (0.1 M ; 4.8 pH), 50 µL de extracto enzimático, incubando a 50°C durante 10 min en un baño María (Thermo Scientific), se sometió a ebullición durante 5 minutos, se adiciono 250 µL de Buffer de Acetato (0.1 M ; 4.8 pH), 1250 µL de DNS, se sometió a una segunda ebullición, para detener la reacción en las muestra se sometió a un baño de hielo durante 5 minutos se deja 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser leído a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV).

Blanco de Sustrato (BS)

En un tubo de ensaye para la mezcla de reacción se adiciono 200 µL de carboximetilcelulosa al 0.1%, 50 µL de Buffer de Acetato (0.1 M ; 4.8 pH), incubando a 50°C durante 10 min en un baño María (Thermo Scientific), se sometió a ebullición durante 5 minutos, se adiciono 250 µL de Buffer de Acetato (0.1 M ; 4.8 pH), 1250 µL de DNS, se sometió a una segunda ebullición, para detener la reacción en la muestra seguido de un baño de hielo durante 5 minutos se dejó 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser leído a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV).

La mezcla de reacción (MR) y el Blanco enzimático (BE) se compararon con una curva patrón de glucosa a 0.1%.

La determinación de azúcares reductores producidos por la hidrólisis enzimática de carboximetil-celulosa se utilizó para determinar la presencia de enzimas celulasas, mediante la prueba de DNS (Miller *et al.*, 1989).



Figura 13: Incubación del extracto enzimático y buffer en baño maría

7.7.2.2 Cuantificación de U/ ml

Las unidades de enzimas presentes en los extractos enzimáticos fueron calculadas de la siguiente manera.

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

Dónde: U= unidad enzimática que se define como la cantidad de μ mol del producto derivado de la hidrólisis de la enzima como se expresa a continuación:

μ mol de Glucosa en fermentación CMC al 0.5%

$$\frac{u}{mL} = \frac{mg}{mL Rxn} = \frac{1 mol}{189160 mg} = \frac{1000000 \mu mol}{1 mol} \left| \frac{2.5 mL Rxn}{0.300 mL EE} \right| \frac{1}{5 min} = 9.25 \frac{u}{mL} \text{ de celulosa}$$

μ mol de Glucosa en fermentación CMC a 0.1%

$$\frac{u}{mL} = \frac{mg}{mL Rxn} = \frac{1 mol}{189160 mg} = \frac{1000000 \mu mol}{1 mol} \left| \frac{1.75 mL Rxn}{0.05 mL EE} \right| \frac{1}{10 min} = 19.42 \frac{u}{mL} \text{ de celulosa}$$

7.7.2.3 Determinación de exo-glucanasa

Se detecta la actividad de las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces β -1,4 localizados en las regiones externas de la molécula de celulosa, contribuyendo a la disminución del grado de polimerización.

Blanco de enzima (BE):

En un tubo de ensaye colocar 1 mL de buffer y se colocan 50 μ L de extracto enzimático, incubando a 50°C durante 1 hora en un baño María (Thermo Scientific), se sometió a ebullición durante 5 minutos, se adiciono 250 μ L de Buffer de Acetato (0.1 M ; 4.8 pH), 1250 μ L de DNS, se sometió a una segunda ebullición, para detener la reacción en las muestra se sometió a un baño de hielo durante 5 minutos se deja 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser leído a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV).

Blanco de sustrato (BS):

En un tubo de ensaye colocar 1 mL de buffer y se colocan una tira de papel filtro incubando a 50°C durante 1 hora en un baño María (Thermo Scientific), se sometió a ebullición durante 5 minutos, se adiciono 250 μ L de Buffer de Acetato (0.1 M ; 4.8 pH), 1250 μ L de DNS, se sometió a una segunda ebullición, para detener la reacción en las muestra se sometió a un baño de hielo durante 5 minutos se deja 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser leído a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV).

Mezcla de reacción (MR):

En un tubo de ensaye colocar 1 mL de buffer y se colocan una tira de papel filtro. Se adicionan 50 μ L de extracto enzimático. incubando a 50°C durante 1 hora en un baño María (Thermo Scientific), se sometió a ebullición durante 5 minutos para detener la reacción, se adiciono 250 μ L de Buffer de Acetato (0.1 M ; 4.8 pH), 1250 μ L de DNS, se sometió a una segunda ebullición, para detener la reacción en las muestra se sometió a un baño de hielo durante 5 minutos se deja 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente ser leído a 540 nm (espectrofotómetro UV/VIS Velab modelo VE 5600 UV).

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

7.7.2.4 Cuantificación de FPU/mL

Para lograr la cuantificación de las unidades de papel filtro se calcula con la siguiente fórmula:

Dónde: 0.185 es constante y a lo que equivalen las unidades de papel filtro.

7.7.3 Determinación de biomasa

Para poder determinar biomasa de las cepas en fermentación líquida se hizo por diferencia de peso de muestra fresca y muestra seca. Para esto se llevaron a cabo las fermentaciones de las cepas inoculando 2×10^6 esporas y se tomaron muestras cada 24 horas filtrando las muestras con la ayuda de una bomba de vacío (Millipore), matraz Kitazato y un embudo de porcelana, a diferentes tiempos por triplicado y duplicado con papel filtro Whatman N° 1 previamente pesados y puesto a peso constante. Las muestras filtradas fueron secadas (Estufa RIOSSA E-71) por 24 horas y pesadas utilizando la balanza analítica (OHAUS PIONEER, PA214). Posteriormente se llevaron a cabo las diferencias de pesos.

Biomasa = peso de papel con muestra seca- peso del papel sin muestra.

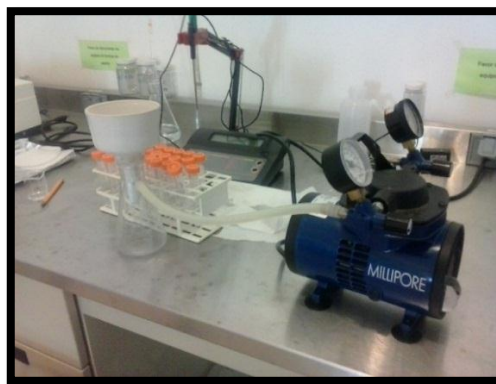


Figura 14: Filtración de biomasa con la bomba de vacío.

7.8 Parámetros cinéticos

7.8.1 Cinética de formación de biomasa

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

$$\frac{dX}{dt} = \mu_M \left[1 - \frac{X}{X_{max}} \right] X \quad (11)$$

Dónde: X es la biomasa (g por L, por cm² o por Kg), μ_M es la velocidad máxima de crecimiento específico (h⁻¹) y X_{MAX} es el valor de equilibrio para X donde $dX/dt = 0$, para $X > 0$. La solución de la ecuación anterior es la siguiente:

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

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

7.8.2 Cinética de formación de producto

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

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

$$Y_{PS} = \frac{P_2 - P_1}{S_1 - S_2} \quad q_P = \mu Y_{E/S} \quad Y_{PX} = \frac{P_2 - P_1}{X_2 - X_1}$$

$$P_C(t) = P_{C,0} + \alpha_C \cdot (X(t) - X_0) + \beta_C \cdot \frac{X_{\max}}{\mu_{\max}} \cdot \ln\left(1 - \frac{X_0 \cdot (1 - e^{\mu_{\max} \cdot t})}{X_{\max}}\right)$$

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

7.9 Análisis estadístico

Para las determinaciones de biomasa, endocelulasa y exocelulasa se llevaron a cabo los experimentos por triplicado, los resultados mostrados en las cinéticas presentan los promedios obtenidos de dichos experimentos. Las pruebas de medias se realizaron con Minitab 16 y se empleó el análisis de Tuckey con un alfa = 0.05 cuando fue necesario.

7.10 Identificación molecular de las cepas seleccionadas

La identificación de las cepas se llevó a cabo por amplificación del gen 18S ADNr. Para lo cual se propagaron las cepas en medio de Czapek-Dox con glucosa al 30 % por 4 días para la mayor producción de biomasa, la cual fue filtrada para la posterior extracción del ADN.

Tabla 1 Composición del medio Czapek-Dox

Componente	g/L
KH ₂ PO ₄	3.04
MgSO ₄	1.52
KCl	1.52
NaNO ₃	0.32
Glucosa	30.00

La biomasa fue transferida a un mortero con pistilo estéril y se le agregó nitrógeno líquido para macerar la muestra y obtener un polvo blanco y fino. El polvo se transfirió a un tubo Falcón de 50 mL estéril y se le agregaron dos volúmenes de buffer de extracción TES (Trizma base 0.01M, EDTA 0.05 M, SDS 0.5 M). Se dio un ligero vortex y se dejó incubar a -20 °C durante 10 minutos utilizando el congelador (PANASONIC MPR-414F), posteriormente se la muestra se distribuyó (1.5 ml) en tubos Eppendorf de 2.0 mL estériles, adicionándoles 200 µL de acetato de potasio y 150 µL cloruro de sodio 5 M, se incubo la muestra en el congelador a -20 °C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugo a 14,800 rpm por 20 minutos a 4°C; se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo estéril. Se adiciono 0.5 volúmenes de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugo a 14,800 rpm por 10 min a 4°C. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo estéril y se agregó 0.1 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol frio al 70 %. Se incubo en el congelador a -20 °C durante toda la noche.

Posteriormente, se centrifugo a 14,800 rpm por 10 minutos a 4°C, se decantó y se dejó evaporar el etanol. Después, se agregaron 50 µL de buffer TE 0.1X para disolver la pastilla.

7.10.1 Cuantificación de ADN

Para cuantificar el ADN se utilizó un espectrofotómetro marca Thermo Scientific con el método para medir ácidos nucleicos, se midió el blanco (agua milli Q) y posteriormente las muestras. Para medir la muestra se agregaron 2 µl de muestra y 198 µl de agua milli Q, y se tomaron los datos de Absorbancia a λ 260, Absorbancia λ 280, y el valor R.

Se realizó una tabla de la siguiente manera:

Muestra	λ 260	λ 280	R	µg/ml	µg totales (50 µl)
Código de la muestra	Abs	Abs	=A260/A280	=(A260)(100)(50)	=(µg/ml)(0.05)

7.10.2 CALIDAD DEL ADN: Electroforesis horizontal de agarosa al 1%

En un vaso de precipitado se disolvieron 0.45 g de agarosa en 150 ml de buffer TAE 1x (Trizma base, ácido bórico, EDTA 0.5M), mediante una parrilla de calentamiento (300°C) hasta que la mezcla se tornó transparente. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C. La solución se vertió en un portagel al cual se le agregó un peine, evitando dejar burbujas en el gel. Se dejó solidificar el gel de 15 a 20 minutos y se removió el peine. Sobre una tira de parafilm se colocó una gota (1 µl) de buffer de carga (50% de glicerol, 1 mM EDTA, 0.2% azul de bromofenol y 60 µg/mL de red gel), se colocaron 5 µl del ADN de una muestra y 4 µl de marcador molecular 100 pb marca Axygen, se mezcló succionando y expulsando de 5 a 10 veces. La mezcla se colocó en un pozo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó un volumen de buffer TAE 1x hasta cubrir completamente

el gel. Las muestras se fraccionaron a 90-95 volts por 45 minutos. En el Transiluminador de luz UV, se visualizó la banda correspondiente a cada gen.

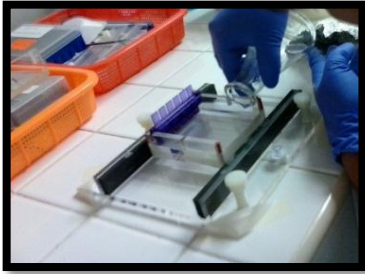


Figura 15: Agarosa al 1% vertiéndose en un portagel

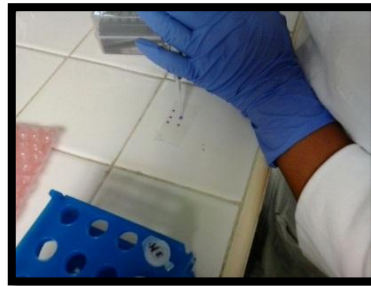


Figura 16: Tira de parafilm con buffer de carga más muestra

7.10.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez que se obtuvo buena cantidad y calidad del ADN de cada muestra, se llevó a cabo amplificación del gen 18S ADNr empleando los iniciadores PN3 (5'-CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC -3') y PN10 (5'-TCCGCTTATTGATATGCTTAAG -3').

Se etiquetaron microtubos de 0.2 ml para las muestras. Se sacaron las muestras y reactivos del refrigerador y congelador, se colocaron en baño de hielo 8 minutos para que se descongelaran gradualmente, después se sometieron a un pequeño paso de vortex (5 segundos). Se realizó el coctel colocando en un tubo de 0.6 ml los reactivos que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Composición del coctel

Reactivos	Cantidad (para 1 muestra)
Agua destilada desionizada estéril	18 μ l
Buffer para PCR 10x	2.5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
dNTPS (25 mM)	0.2 μ l
Iniciador 5´-3´ (15 pM)	0.83 μ l
Iniciador 3´-5´ (15 pM)	2.0 μ l
Enzima Taq-Polimerasa (5 U/ml)	0.2 μ l
TOTAL	24 μ l

Se mezclaron los reactivos con la micropipeta, el tubo se depositó en un recipiente con hielo, posteriormente se depositaron 24 μ l del coctel en un tubo de 0.2 μ l, luego se adicionó 1 μ l del ADN de la muestra y se mezclaron con la micropipeta. Los tubos se introdujeron al Termociclador marca Labnet donde las condiciones de PCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, 30 ciclos (30 segundos a 95°C, 30 segundos de la TM del iniciador, 1 minuto a 72°C) y 10 minutos a 72°C. Una vez terminado el tiempo de corrida las muestras se guardaron a -20°C en el congelador.

Una vez obtenido el producto de la PCR, se realizó una electroforesis horizontal para verificar la presencia del amplificado de cada muestra, y comprobar con un marcador molecular el amplificado de 600 pares de bases de cada banda.

7.10.4 Electroforesis horizontal de agarosa al 3%

En un vaso de precipitado se disolvieron 4.5 g de agarosa en 150 ml de buffer TAE 1x (Trizma base, ácido bórico, EDTA 0.5M), mediante una parrilla de calentamiento (300°C) hasta que la mezcla se tornó transparente. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C. La solución se vertió en un portagel al cual se le agregó un peine, evitando dejar burbujas en el gel. Se dejó solidificar el gel de 15 a 20 minutos y se removió el peine. Sobre una tira de parafilm se colocó una gota (1 μ l)

de buffer de carga (50% de glicerol, 1 mM EDTA, 0.2% azul de bromofenol y 60 µg/mL de red gel), se colocaron 5 µl del ADN de una muestra (4 µl de marcador molecular 600 pb marca Axygen) y se mezcló succionando y expulsando de 5 a 10 veces. La mezcla se colocó en un pozo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó un volumen de buffer TAE 1x hasta cubrir completamente el gel. Las muestras se fraccionaron a 90 volts por 45 minutos. En el Transiluminador de luz UV, se visualizó la banda correspondiente al gen.



Figura 17: Transiluminador de luz UV con fotodocumentador.

Los productos de PCR obtenidos se mandaron a secuenciar a la empresa MacroGen USA. Para la secuenciación del amplificado se utilizaron los iniciadores 518F (CCAGCAGCCGCGGTAATACG) y 800R (TACCAGGGTATCTAATCC).

La búsqueda de homología de secuencias se llevó a cabo empleando la herramienta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) de la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information).

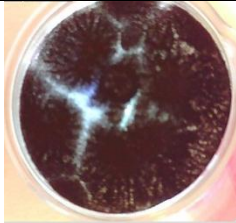











8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

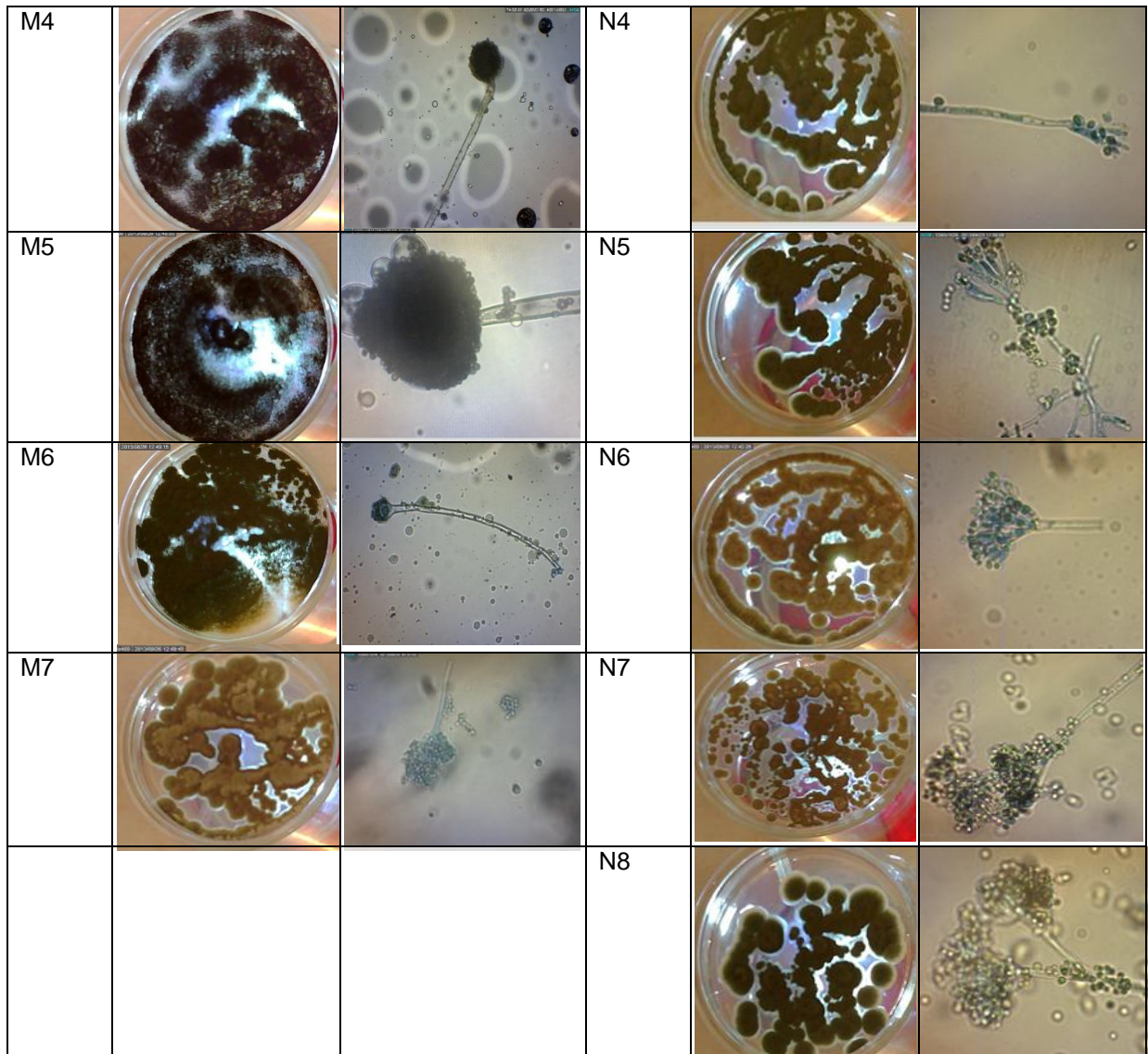
8.1 Condiciones iniciales, aislamiento y purificación de las cepas

Se aislaron y purificaron 15 cepas de hongos filamentosos a partir de material vegetal; de las cuales ocho cepas provienen de nueces codificadas como N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7 y N8 y siete cepas fueron aisladas de manzana, las cuales también fueron codificadas como M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7 posteriormente estas fueron conservadas en leche descremada y puestas en congelación.

Las 15 cepas obtenidas fueron identificadas macroscópicamente y microscópicamente como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Identificación microscópica y macroscópica de las cepas aisladas

Cepas	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Cepas	Morfología macroscópica	Morfología microscópica
M1			N1		
M2			N2		
M3			N3		



La mayor parte de las cepas identificadas de acuerdo a su morfología en este estudio se ubican en los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*.

Las cepas M7, N2, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7 probablemente pertenecen a especies de *Penicillium* de acuerdo a Arias & Piñeros (2008) ya que este género presentan crecimiento rápido, filamentoso y velloso, lanoso o de textura algodonosa. Son inicialmente blancas y luego se convierten en verde azuladas, gris verdosas, gris oliva, amarillentas. El reverso de la colonia es pálido o amarillento. De acuerdo con Anguiano (2012) el género *Penicillium* son hongos filamentosos

que están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se hallan en el suelo, la vegetación caída, el aire. De acuerdo las evidencias fotográficas que presentan estos mismos autores la cepa N8 puede ser identificada como una especie de *P. cladosporium* como se puede mostrar en la figura 18 que hace una comparación entre la cepa N8 y la cepa aislada en el estudio ya mencionado.

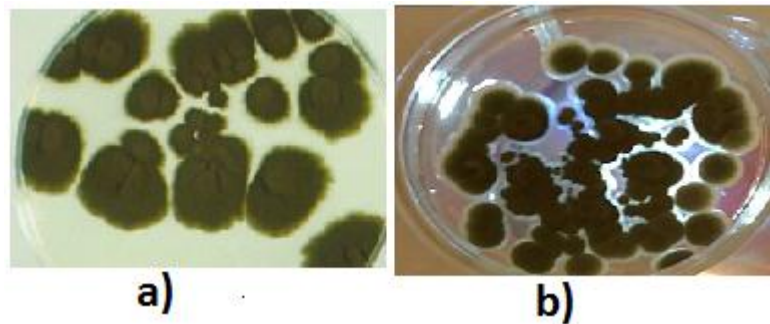


Figura 18: Comparación a) morfología *p. cladosporium* b) morfología cepa N8

Las cepas M1, M2, M3, M4 y M5 presentan tonos negros característicos del grupo de *Aspergillus*, las cuales son: cabezas conidiales de tonos negro a negro grisáceo, negro café, negro púrpura o negro carbón, 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 como lo menciona Sáez Vega (2002).

Penicillium y *Aspergillus* crecen de manera adecuada en agar PDA, aplicando temperatura de 30 °C de acuerdo con estudios realizados por Pérez *et al* (2010) quien aisló e identificó estos géneros a partir de residuos orgánicos.

Según Anguiano (2012) uno de los microorganismos más frecuentes en la manzana y que disminuye su vida útil, es el hongo del género *Penicillium*, principalmente la especie *Penicillium expansum* (Alimentación-sana.org, 2011).

8.2 determinación de pruebas cualitativas

8.2.1 Actividad celulolítica

La detección cualitativa de la actividad enzimática se evaluó con el revelado de las zonas de obscurecimiento utilizando el medio agar rojo Congo, el diámetro de los halos en las muestras no muestra un patrón en específico, las cajas que contenían las cepas aisladas de nueces (N, N2, N3, N4, N5 y N6) mostraron degradación nula y en comparación de las cajas en las cuales se inocularon hongos aislados de manzanas (M2, M4 y M5) presentando actividad gradual a partir de las 48 horas de incubación en el caso de M2 y M4, mientras que la cepa M5 presenta actividad a partir de las 72 horas después de éstas los halos que se formaron fueron aumentando (figura 19) como se muestra en el monitoreo aplicándole una temperatura de 32 °C.

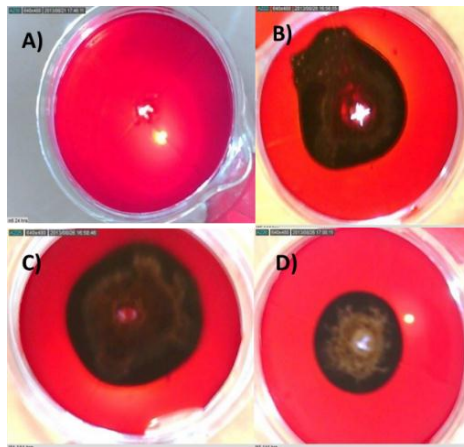


Figura 19: Comparación de los halos formados después de 144 horas (A) testigo, B) M2, C) M4, D) M5)

Yoon *et al.*, (2007) realizaron un estudio comparando cuatro colorantes de los más comunes para determinar cuál de ellos es favorable para la detección de la actividad extracelular con diferentes especies de hongos. Reportan de acuerdo a los datos obtenidos que el rojo Congo es el colorante más recomendado para la realización

de ensayos en placa para la selección de la degradación de celulosa llevada a cabo por hongos.

En un estudio realizado por Pérez *et al.*, (2007) la actividad celulítica se evidenció mediante evaluación cualitativa con el revelado de zonas de aclaramiento utilizando rojo Congo al 1% (p/V) como también ha sido reportado por diferentes autores (Hendricks *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

En comparación con otros estudios realizados para la obtención de la misma enzima utilizando el agar rojo Congo y fuente de carbono CMC, un estudio realizado por Lu *et al.* (2005) en donde los diámetros presentados por cepas aisladas de tallos de flores y que fueron cultivadas en el mismo agar e incubando a una temperatura de 32°C durante 5 días alcanzaron valores de 6.4 cm de diámetro, lo cual demuestra una actividad alta de los hongos filamentosos M2, M4 y M5 ya que los halos de estas muestras alcanzaron diámetros similares a los reportados.

Las cepas seleccionadas cuentan con un mecanismo enzimático adecuado para la degradación del sustrato, por lo cual se escogieron para llevar a cabo el proyecto.

El género de *Aspergillus* es reportado como microorganismo con alta actividad celulolítica.

8.3 Determinación cuantitativa y cinética de fermentación líquida

8.3.1 Determinación de actividad celulasa en fermentación con CMC al 5 %

Se llevó a cabo una fermentación preliminar con CMC al 5 % para seleccionar las 2 mejores cepas productoras de la enzima de interés, obteniendo la siguiente cinética que representa gráficamente los resultados obtenidos de esta parte experimental.

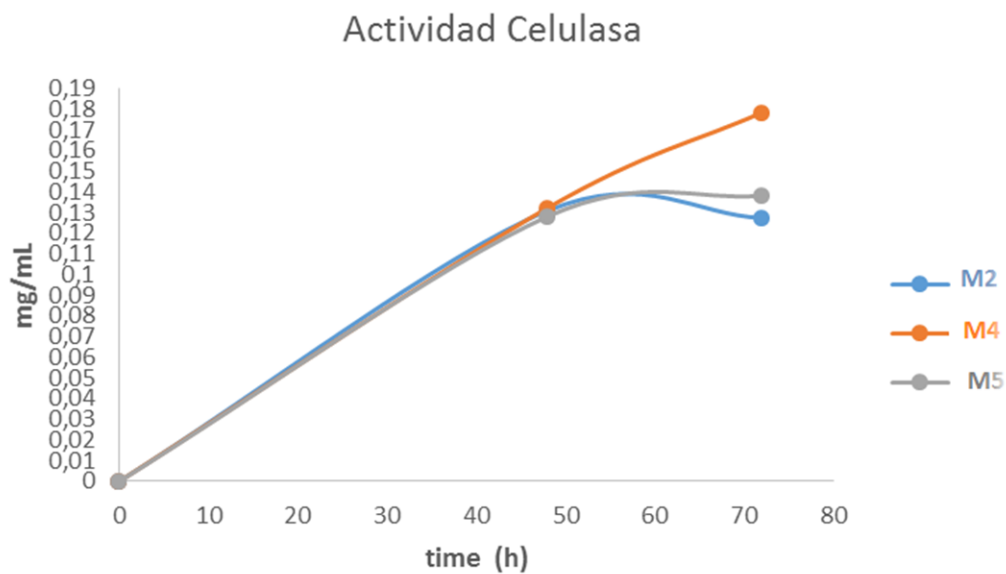


Figura 20: Cinética preliminar de actividad celulasa de las cepas M2, M4 y M5

En la figura 20 se puede observar a un tiempo de 72 horas de fermentación como la cepa M2 presenta una baja producción de la enzima con 0.12 mg/mL en comparación con las cepas M4 y M5 con 0.14 y 0.17 mg/mL respectivamente las cuales presentan un aumento gradual de actividad a partir del tiempo 0 hasta el tiempo 72 mientras que la cepa M2 alcanza su mayor actividad entre las 50 a 60 horas y decae, esto debido probablemente a que esta cepa no se adapta al medio de fermentación líquido es por esto que se opta por descartarla y llevar a cabo las siguientes pruebas experimentales con las cepas M4 y M5.

8.3.2 Determinación de actividad celulasa en fermentación con CMC de Na al 0.1%

Los valores obtenidos de biomasa y producto fueron obtenidos en cada experimento. Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación logística, para obtener los parámetros cinéticos de X_0 , X_{max} , μ_M . Estos resultados fueron expresados en miligramos (mg) sobre mililitro (mL), por tiempo en horas.

8.3.3 Biomasa

La producción de biomasa de la cepa M4 en base a los resultados obtenidos se comporta de manera exponencial (figura 21) de 0 a 72 h, a partir de las 96 horas (punto máximo con 1.04 mg/mL). De acuerdo con el modelo matemático empleado se obtiene una μ de 0.06 h^{-1} que es un valor cercano a 0 por lo que se puede decir que el crecimiento del hongo está fuertemente ligado a la degradación del sustrato para su crecimiento. Las repeticiones no muestran una amplia desviación estándar. El modelo de la ecuación logística, representa perfectamente el comportamiento de crecimiento para las primeras 48 horas, con un X_{MAX} de 0.91 mg/mL, permaneciendo el comportamiento a partir de este punto de manera constante esto quiere decir que el microorganismo aún tiene las condiciones óptimas para su crecimiento.

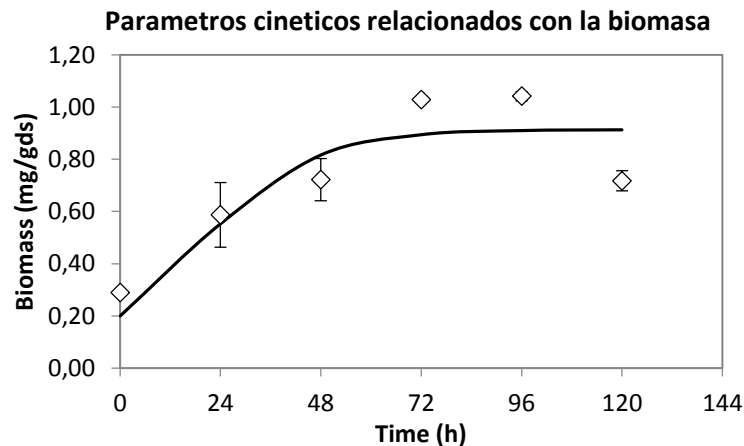


Figura 21: Producción de biomasa por la cepa M4

La producción de biomasa de la cepa M5 como se muestra en la figura 22 se comporta de manera exponencial de 0 a 96 h, al igual que la cepa M4 ya que se puede observar la ausencia de la fase de adaptación. A partir de las 96 horas (punto máximo de 1.95 mg/mL), de acuerdo a la ecuación logística se obtuvo un μ de 0.2 h^{-1} que al igual que la M4 sugiere que el crecimiento del hongo está fuertemente ligado a la degradación del sustrato para su crecimiento. Las repeticiones tampoco muestran una amplia desviación estándar.

Se puede observar que el modelo de la ecuación logística, representa perfectamente el comportamiento de crecimiento para las primeras 72 horas, con un X_{MAX} de 3.24 mg/mL.

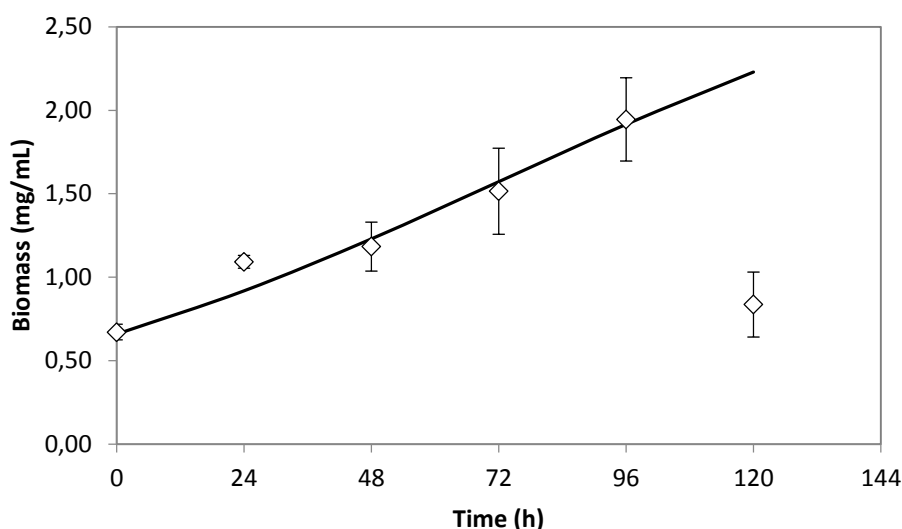


Figura 22: Producción de biomasa de la cepa M5

La falta de ajuste del modelo experimental con el comportamiento real de la producción de biomasa a partir de las 48 h, se puede deber a la degradación o modificación del sustrato y los materiales que se van transformando conforme transcurre el tiempo.

8.3.1.2 Producto

La actividad enzimática para la producción de endocelulasas y exocelulasas fue calculada en unidades por mililitro (U/mL) y unidades de papel filtro por mililitro (FPU/mL) respectivamente.

Endocelulasas

Como se muestra en la figura 23 la producción de endocelulasas de la cepa M4 inicia desde el principio de la fermentación que como se menciona en la literatura es la primer enzima que actúa sobre las regiones amorfas de la celulosa, produciendo un rápido decremento en la longitud de la cadena del polímero de celulosa (González G, 1999). Esta alcanza su punto máximo a las 96 horas con una producción de 1718 U/mL, presentando un decremento drástico a partir de este tiempo, esto posiblemente se debe a la degradación del sustrato. La elevada especificidad de la reacción enzimática es sensible a los cambios estructurales de los sustratos lo cual se puede dar por modificación del medio de reacción (Bohórquez G, 2004). Una vez actuando esta enzima se da paso a la acción de las exocelulasas.

El ajuste a la ecuación logística es perfecto en las primeras 48 horas y se obtiene un valor de k de -0.25 lo cual indica que la tasa específica secundaria de inestabilidad de la enzima puede estar relacionada con la tasa de producción de la enzima asociada al crecimiento vegetativo del microorganismo. Con lo cual se puede deducir que la formación de la enzima endocelulasa no está ligada a la formación de biomasa.

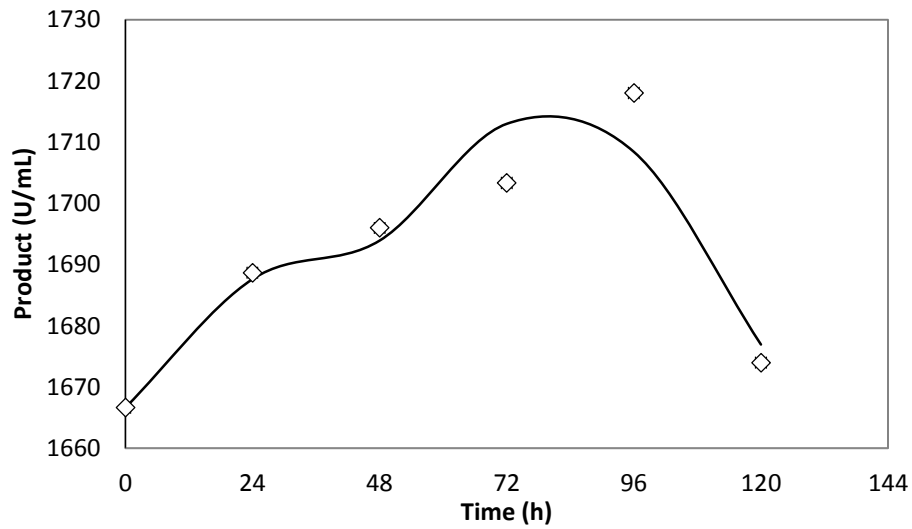


Figura 23: Actividad endocelulasa cepa M4

La figura 24 muestra cómo inicia la producción de endocelulasas de la cepa M5 a partir de las 48 horas alcanzando la mayor producción a las 120 horas con 1706 U/mL, se observa que el ajuste a la ecuación logística es medio y se calcula una k de 0,10 U/mL, dado que es un valor positivo podemos deducir que la producción de esta enzima está ligada a la producción de biomasa (figura 25).

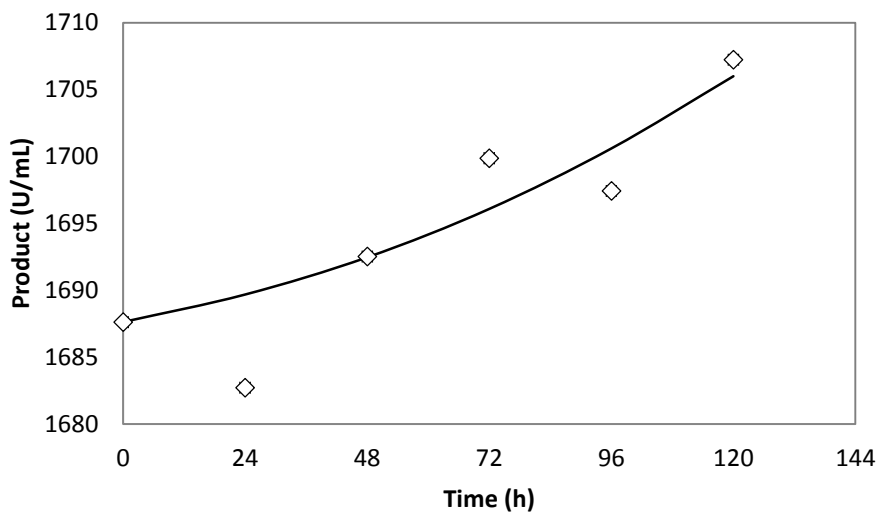


Figura 24: Actividad endocelulasa de la cepa M5

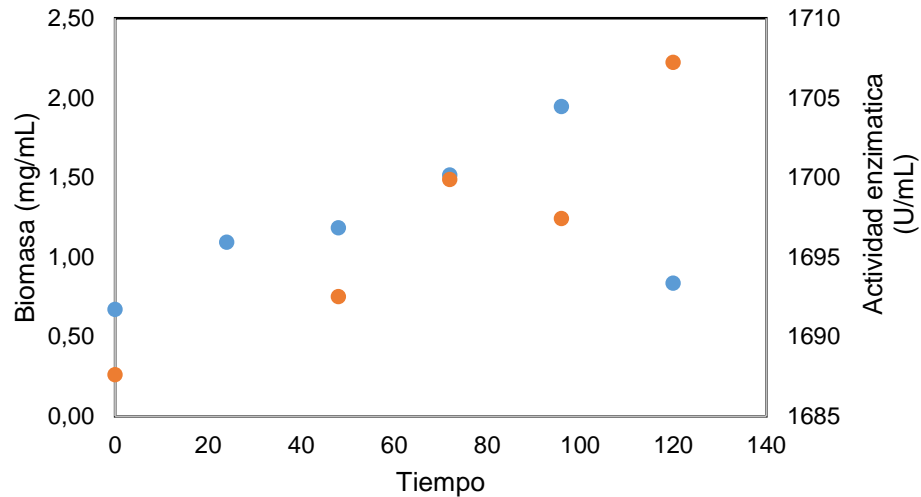


Figura 25: Grafico de comparación de producción de biomasa (puntos azules) y endocelulasa (puntos naranjas) de la cepa M5

La CMC se ha utilizado ampliamente para caracterizar la actividad enzimática de endoglucanasas. La CMC es un sustrato muy específico para las celulasas con acción endo, ya que su estructura ha sido diseñada para celulosa y crear sitios amorfos que son ideales para la acción endoglucanasa. Este sustrato es deseable debido a que el producto de la catálisis se mide fácilmente utilizando un ensayo de azúcar reductor, tal como ácido 3,5-dinitrosalicílico.

EXOCELULASAS

En base a los resultados obtenidos de las cinéticas de fermentación de la cepa M4 utilizando la prueba de DNS, la máxima actividad enzimática de exocelulasa se presentó a las 72 horas con 22 FPU/mL manteniendo esa producción a las 96 horas y presentando un decremento a las 120 horas (Figura26).

El microorganismo presenta una producción casi nula las primeras 48 horas debido a que primeramente tiene que actuar la enzima endocelulasa para que la enzima exocelulasa pueda intervenir. Esta enzima degrada lentamente las cadenas

terminales no reductoras presentando una elevada actividad sobre la celulosa amorfa, dando como producto celobiosa (Bohórquez G, 2004).

Se puede observar en la figura 26 como los resultados se ajustaron mejor a la ecuación logística a partir de las 72 horas, obteniéndose un valor de k de -0.03 de igual manera indicando la independencia de la formación de producto con la formación de biomasa.

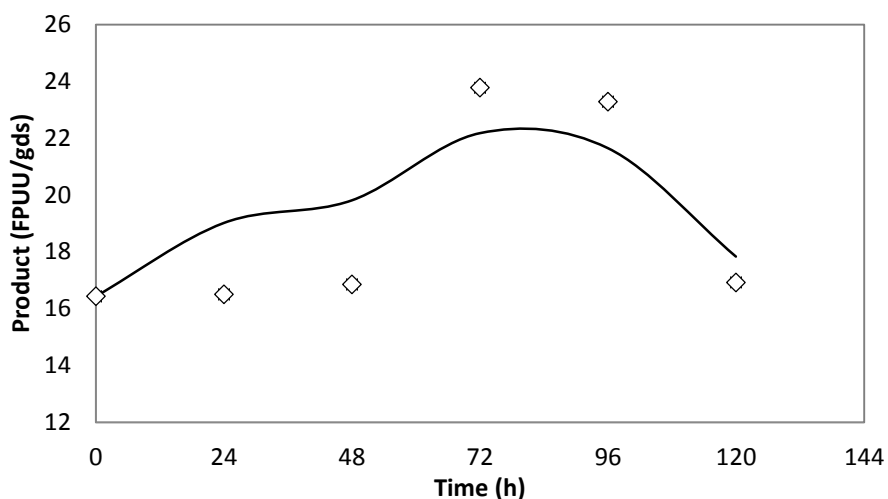


Figura 26: Actividad exocelulasa de la cepa M4

Los resultados obtenidos en la figura 27 muestra que la producción de exocelulasa de la cepa M5 inicia a partir de las 24 horas llegando a un punto máximo a las 96 horas con 24 FPU/mL a partir de este tiempo se presenta un decremento al igual que de la cepa M4 esto se debe probablemente por acumulación de celobiosa que actúa como inhibidor de las exocelulasas (Bohórquez G, 2004).

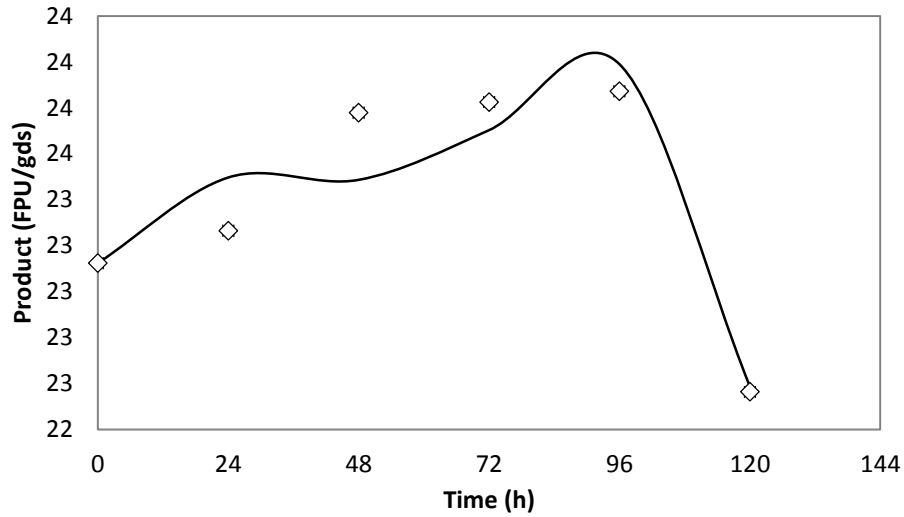


Figura 27: Actividad exocelulasa de la cepa M5

Ramírez P, Cocha J. M. (2003) hicieron un estudio de degradación enzimática celulolítica por actinomicetos termófilos con cepas de *Streptomyces sp.* 7CMC10 y 11CMC1, empleando CMC como sustrato, donde mostraron los mayores valores de 20.14 UI/mg y 9.55 UI/mg de proteínas referentes a endoglucanasas, respectivamente en comparación con la actividad específica por proteínas para la exoglucanasa con 2,61 UI/mg, Estos reportes coinciden con los resultados obtenidos de la cepa M4 ya que presenta más actividad endocelulasa (1728 U/mL) en comparación con la exocelulasa (22 FPU/mL).

8.4 Identificación molecular de las cepas productoras de la enzima celulasa

Se extrajo ADN de las tres cepas de hongos filamentosos productoras de la enzima celulasa extrayendo la biomasa de una fermentación en medio Czapeck pero utilizando como fuente de carbono glucosa al 30% para poder obtener mayor cantidad de biomasa en menos tiempo.

La pureza del ADN es un factor muy importante para los subsecuentes análisis moleculares. Existen métodos diferentes para medir la cantidad de ácidos nucleicos en solución entre los cuales podemos mencionar el método de espectrofotometría (Carranza D. 2006) que fue el método que empleamos para cuantificación del ADN obteniéndose los siguientes resultados que se muestran en la tabla 2.

Tabla 4: Valores obtenidos en la cuantificación de ADN por espectrofotometría

Muestra	λ 260	λ 280	R	$\mu\text{g/ml}$	μg totales (50 μl)
M2	0.049	0.0265	1.7105	245	12.25
M4	0.102	0.0645	1.193	510	25.5
M5	0.0455	0.026	1.392	227.5	11.375

Calidad del ADN

Tomando en cuenta los datos de tabla anterior, se procedió a realizar la tabla 4, facilitando de esta manera hacer de nuestro conocimiento las cantidades adecuadas de reactivos y muestra requerida y efectuar la electroforesis.

Tabla 5: Calidad del ADN

MUESTRA	μL MUESTRA	2 μg	AGUA MILLI Q	BUFFER DE CARGA μL
M2	17.39	10.0	0.0	2.0
M4	66.66	10.0	0.0	0.0
M5	57.14	10.0	0.0	2.0

Se evaluó la calidad del ADN por medio de una electroforesis, la cual fue buena ya que aparecieron bandas definidas en la parte superior del gel (Figura 28). Mientras que el material parcialmente degradado forma un barrido (mancha) de fragmentos pequeños a lo largo del carril (Valadez, 2000).

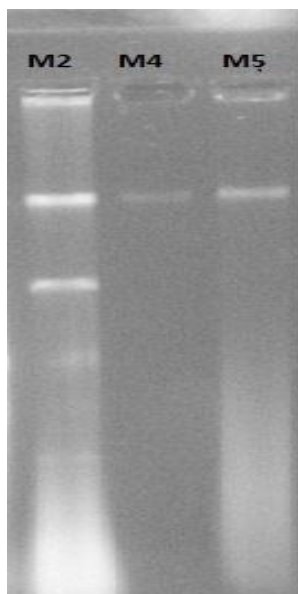


Figura 28: Electroforesis con gel agarosa al 1%. Calidad del ADN, Carril: 1-3, cepas M2, M4, Y M5 respectivamente.

Se observa la aparición de una banda más marcada en el carril de la cepa M2 mientras que en el de la cepa M4 se observa una banda menos perceptible posiblemente debido a la presencia de poca cantidad de ADN pero presenta menos degradación que la cepa M4 y M5 que presentan una pequeña área de barrido.

Una vez teniendo ADN de buena cantidad y calidad, se realizó las PCR específica para el gen 18 S ARNr.

La identificación por PCR ha sido el método más utilizado por su rapidez, reproductibilidad es una técnica muy sencilla y necesita cantidades de ADN muy pequeñas (Sambrook y Russell, 2001).

Según Bruns *et al.*, 1991 se puede seleccionar cualquier tipo de marcador molecular, dependiendo del organismo a identificar en este caso se utilizó la amplificación con un producto 600 pb con el cual se obtuvo un buen resultado como se puede observar en la figura 29 se presentan bandas bien definidas en los tres carriles, mostrando una buena amplificación.

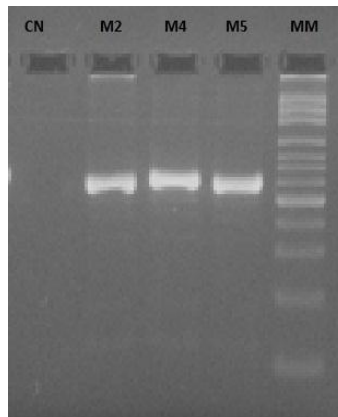


Figura 29: Electroforesis con gel agarosa al 3%, CN control negativo; MM marcador molecular a 600 pb (PCR).

Una de las razones más comunes para el uso de la PCR es la formación de suficiente ADN para su secuenciación (Carranza D. 2006) que fue el fin en esta investigación ya que el producto de las PCR se envió a secuenciar para la identificación de las cepas de hongos filamentosos.

La secuenciación se realizó en la empresa Macrogen USA, mediante los primers 518F y 800R.

Tabla 6: Secuencia de nucleótidos de la cepa M5 utilizando los iniciadores 518F y 800R.

CEPA	INICIADOR	SECUENCIA
M5	518F	NNGGGGNNNGGGNNCCTTNGGNCCAACCTNNATCC GTGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCC GCTTGTCGNCGCCGGGGGGGCGCCTTTGCCCCC GGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACAC TGTCTGAAAACATGGAGACTGAGATGATTGAATGCAA TCAGTTAAACTTTCAACAATG
	800R	NNNNNNNNNNCCNNNNCENNNTGGGNACCTCNATCC GTGTCTATGTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGC CGCTTGTCGGCCGNCGGGGGGGCGCCTTTGCCCG AGGGCCCGTGCCCCCGGACACCNTTNCGAACACT GTCTGAAAACATGCAGACTGAGACCCTTGAATGCAAT CAGTTAAGAGGTTAAACAAGGCATCTCTAGGTTCCCTG CNCCNATGAATAANNGGCGAAATGTGATAACTAATGT GAATTGCANAATTCGANAATCATCTAGTCTTTGAATGT ACATTGCGCCTGCTGGCATTACCGGGGGCATGCCCG TCAGANNCNNTGTTCTGCCTTTTAACCCAGCTTGTTTC AANNAACTCCCCNNCCCCCNTTCANATGATGGT

En el caso de las cepa M5 con el iniciador 518F se encontró un 94 % de identificación con la cepa *Aspergillus vadensis* CBS 113365 (número de acceso AY585549.1), con un máximo score de 294 y un valor de E de 2e-76.

Para la misma cepa empleando el iniciador 800R se encontró un 84% de identificación con la cepa *Aspergillus niger* SC41 (número de acceso DQ335979.1), con un máximo score de 318 y un valor de E de 2e-83.

Tomando en cuenta el mayor porcentaje de identificación de 94 % se asume que la cepa M5 pertenece al género y especie de *Aspergillus vadensis*.

Se realizó un estudio con una cepa del grupo de *Aspergillus* negro la cual fue analizada a detalle para determinar la especie a la que pertenece, para esto se llevaron a cabo análisis de la morfología, patrones de RFLP y perfiles de metabolitos. Los datos obtenidos indicaron que la cepa era estrechamente relacionada, pero no idéntica, a la de *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus tubingensis*. Por lo tanto, fue designado como una nueva especie y el nombre *Aspergillus vadensis* (De Vries R.P *et al.*, 2005).

La cepa *Aspergillus vadensis*, se analizó por su potencial como huésped para la producción de proteína homóloga y heteróloga. A diferencia de la otra *Aspergillus* negro, esta cepa no acidificar el medio de cultivo cuando el nitrato es la fuente de nitrógeno y sólo produce niveles muy bajos de proteasas extracelulares, metaloproteasas principalmente de serina (De Vries R.P *et al.*, 2004).

Debido a que *Aspergillus vadensis* es una especie nueva, no se cuenta con estudios patogénicos hasta el momento, por lo tanto es importante el manejo adecuado y tomar las medidas de precaución necesarias al trabajar con esta cepa.

9. CONCLUSIONES

Se aislaron, purificaron e identificaron 15 cepas de hongos filamentosos de material vegetal de las cuales la mayoría pertenecen al género de *Penicillium* y *Aspergillus*, según la morfología macroscópica y microscópica presentada.

Se llevó a cabo la determinación de actividad celulítica de las 15 cepas aisladas utilizando el colorante rojo congo y CMC de Na con esta prueba se logró determinar la capacidad de los hongos filamentosos para producir celulasas que degraden la celulosa que es la enzima de interés en este estudio, resultado seleccionadas tres cepas M2, M4 y M5.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las cinéticas de producción de la enzima celulasa, mediante el análisis de actividad endocelulasa y exocelulasa, la cepa M4 presento mayor actividad endocelulasa con 1718 U/mL a las 96 horas comparada con la cepa M5 con 1706 U/mL a las 120 horas. En lo que se refiere a la actividad exocelulasa la de mayor producción fue la cepa M5 con 24 FPU/mL a las 96 horas comparada con 22 FPU/mL producida por la cepa M4 a las 72 horas.

Se considera que la cepa de mayor producción de la enzima de interés de este estudio es la M4 debido a que presenta la mayor actividad endocelulasa que es la enzima que actúa inicialmente para que las otras enzimas intervengan en la degradación de la celulosa en glucosa.

Se inició la identificación molecular de las cepas M2, M4 y M5 los resultados de la espectrofotometría muestran que se extrajo una buena cantidad de ADN de igual manera los resultados de la PCR muestran la obtención del ADN de calidad. El ADN obtenido se mandó a secuenciar.

Se logró identificar molecularmente la cepa M5 con un 94% de identificación como *Aspergillus vadensis* CBS 113365 (número de acceso AY585549.1), con un máximo score de 294 y un valor de E de $2e-76$.

10. BIBLIOGRAFIA

Acosta Aranda J.A. (2013). Tesis licenciatura. "Cinética de producción de celulasa y proteasa termoestables sobre olote de maíz por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A". Universidad Autónoma Antonio Narro. Pag.25-27.

Anguiano C. J. Cepeda N.A.C. Zugasti C.A. (2012). Tesis maestría. Contaminación por hongos filamentosos en manzana: amenaza para la salud y la economía. Universidad autónoma de Coahuila, facultad de ciencias químicas

Bohórquez G, Losada R. (2004). tesis licenciatura. Estudio de la actividad enzimática celulolítica en la etapa termófila de una fermentación en estado sólido realizada a partir de residuos generados en el procesamiento industrial de papa R-12. Universidad de la sabana, facultad de ingeniería.

Bu'lock J, Kristiansen B. (1991). Biotecnología basica. Ed. Acribia, S. A.

Carranza D. Z. (2006). Tesis licenciatura. Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Cienc. Agro.

Carrera, J. (2002). Módulos de Biotecnología "Enzimas Industriales, Biorreactores, Variables de Control, Guías de Laboratorio y Biotecnología Agrícola y Vegetal" Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca.

Cruz Martínez L.C. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Pontificia universidad javeriana, facultad de ciencias. Pág. 32-35.

De Vries Ronad, Samson A. R, Visser J, Frisvad J. (2004). A New Black *Aspergillus* Especies, *A. vadensis*, es un anfitrión prometedor para los homólogos y heterólogos de Producción de Proteínas. Genética Molecular de Microorganismos Industriales, Universidad de Wageningen. Wageningen 6703 HA.

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

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

Galindo, J.L., Marrero Y., González, N. & Aldama, A.I. (2005). Cinéticas de la actividad de las celulasas microbianas en el líquido de rumen. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 38:259.

González G, Carminal G. "Estudio del comportamiento de la fibra lyocell frente a la hidrólisis enzimática con celulasas".rev. Biotechnology and bioengineering, vol 24. 1999.

Lee S. 2004. Development of a plate technique for screening of Polisaccharide-degrading microorganism by using a mixture of insoluble chromogenic substrate. J Microbiol Methods. 56:375-382.

Mansfield, S; Mooney, Cy Saddler, J. 1999. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. Biotechnol. Prog 15:804-816.

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

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

Ovando Chacón SL., Watiszewski KN., (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Biotecnología y Bioquímica.21 (42): 111-120.

Paredes Mediana Daysi A. 2010 Obtención de enzimas celulasas a partir de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*). (Tesis de

Licenciatura) Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos.

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

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

Plomion, C., Leprovost, G. & Stokes, A. 2001. Wood Formation in Trees. *Plant Physiol.* 127, 1513-1523.

Ramírez P, Cocha J.M. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Rev. Perú. Biol;* 10(1):67-77

Sáez Vega A., Flores L. y Cadavid R. (2002). caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus Níger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *Rev. Universidad EAFIT.* N° 128.

Sambrook K. J. y Russell D. W. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual.* Volumen I, II Y III. 3ed. Cold spring harbor laboratory press, New York. 2400pp.

Smith John E. *Biotecnología* (2006). Ed.ACRIBIA, S.A.

Villena K.G. y Gutiérrez C.M. (2003). *Aspergillus Niger* parafilm for celulasas production: some structural and physiological aspects. Facultad de ciencias biologicas UNSMSM. *Rev. Perú. Biol.* 10(1): 78-87.

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

Ward, O. P., Qin, W. M., Dhanjoon, J., Ye, J., Singh, A. 2006. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*, 58: 1-75.

Wengenack N, Binnicker M. 2009. Fungal molecular diagnostics. *Clin. Chest. Med.* 30: 391–408.

Withers, S. G. 2001. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr Polym.* 44, 325-337.

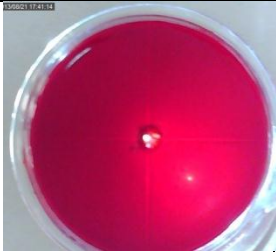
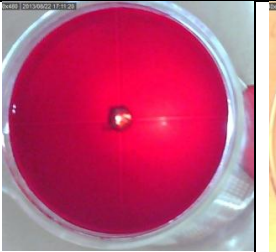
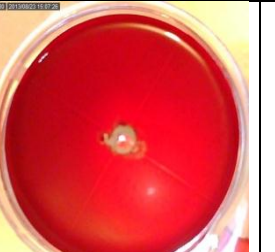
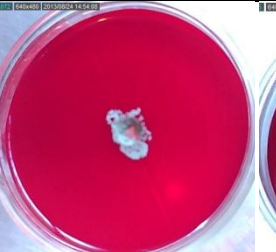

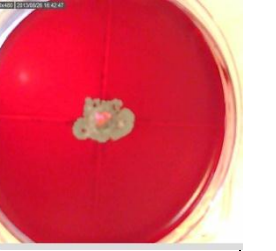
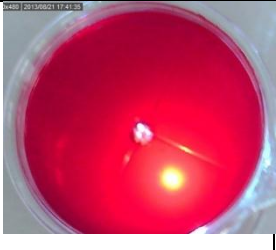
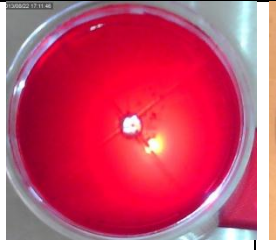
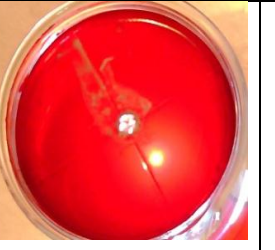




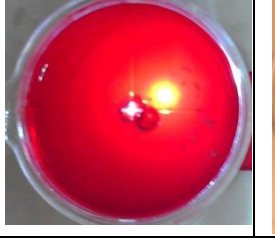

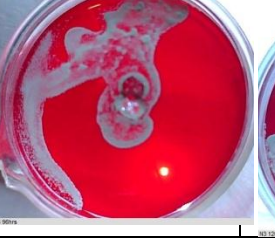

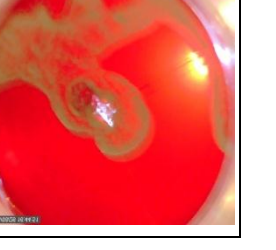
Wood TM, McCrae SI: Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. *Adv Chem Ser* 1979, 181:181–209.

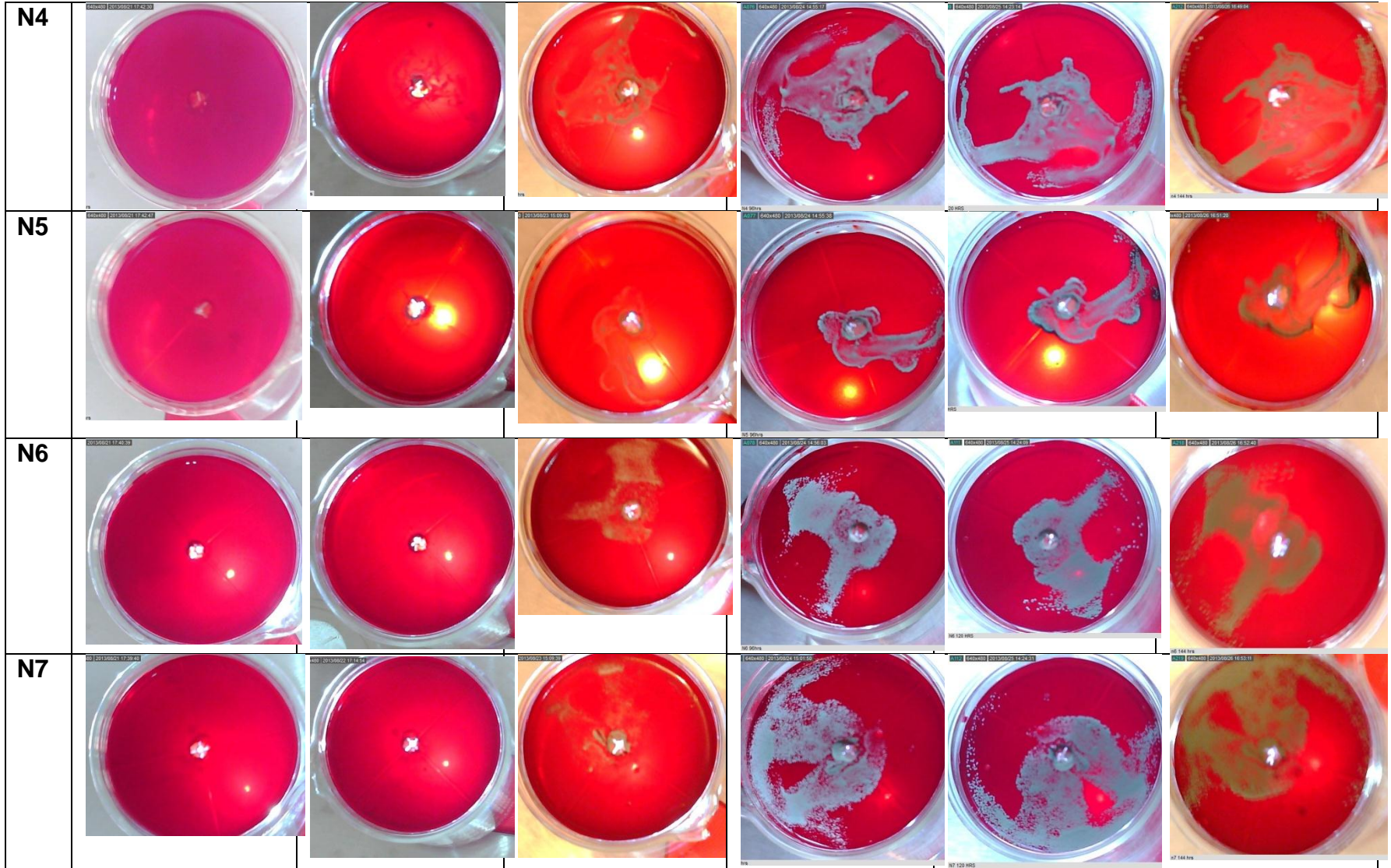
Zhang, Y. Himmel, M. Mielenz, J. 2006 Outlook for Cellulase improvement: Screening and selection Strategies. *Biotechnology Advances* 24: 452-481.

Perdomo Z. 2011. Caracterización fenotípica y molecular de hongos filamentosos oportunistas: *scedosporium*, *acremonium*, *phialemonium*, *lecythophora* y *paecilomyces*

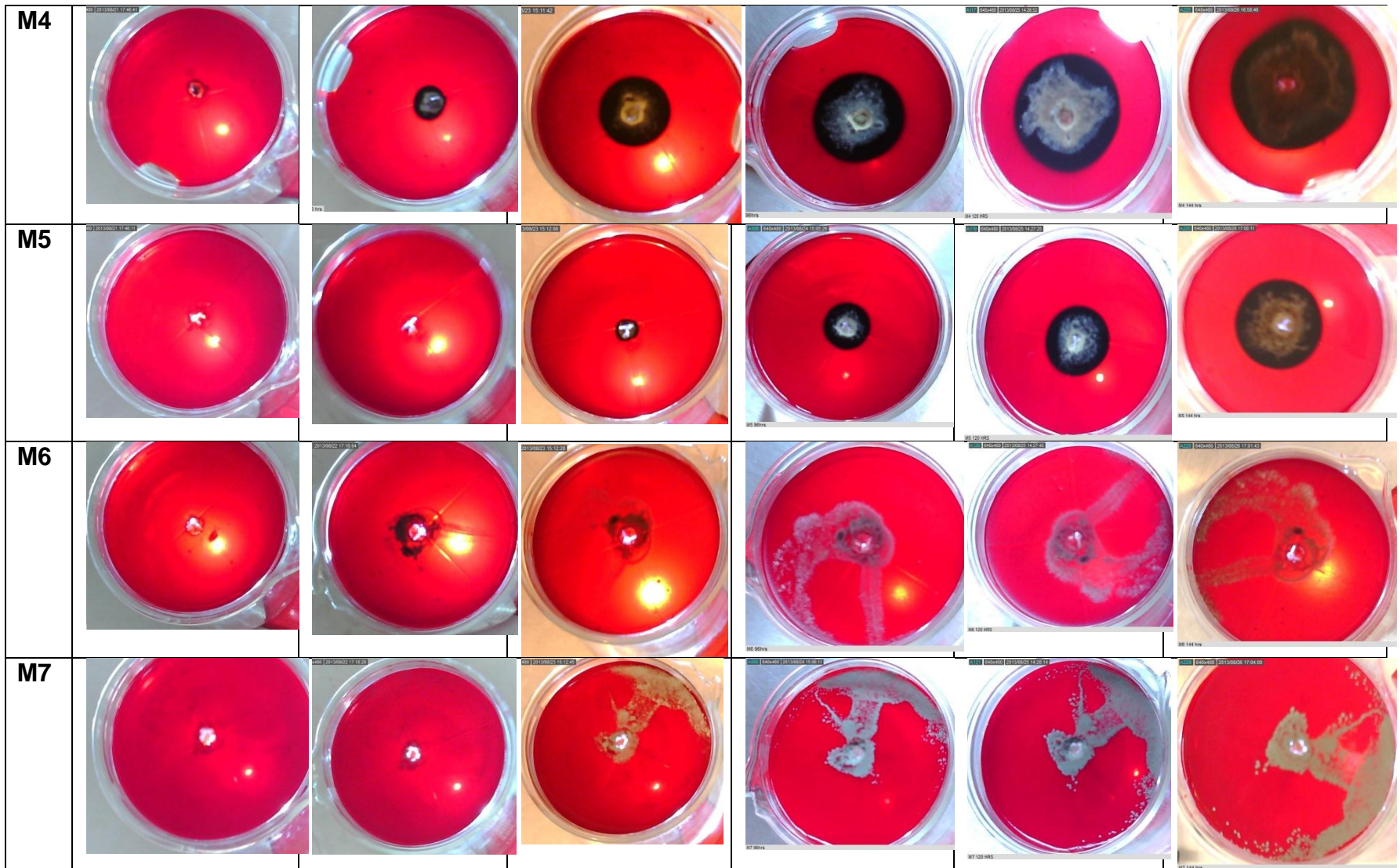
11. ANEXOS

ANEXO 1: MONITOREO ROJO CONGO

clave	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
N1						
N2						
N3						

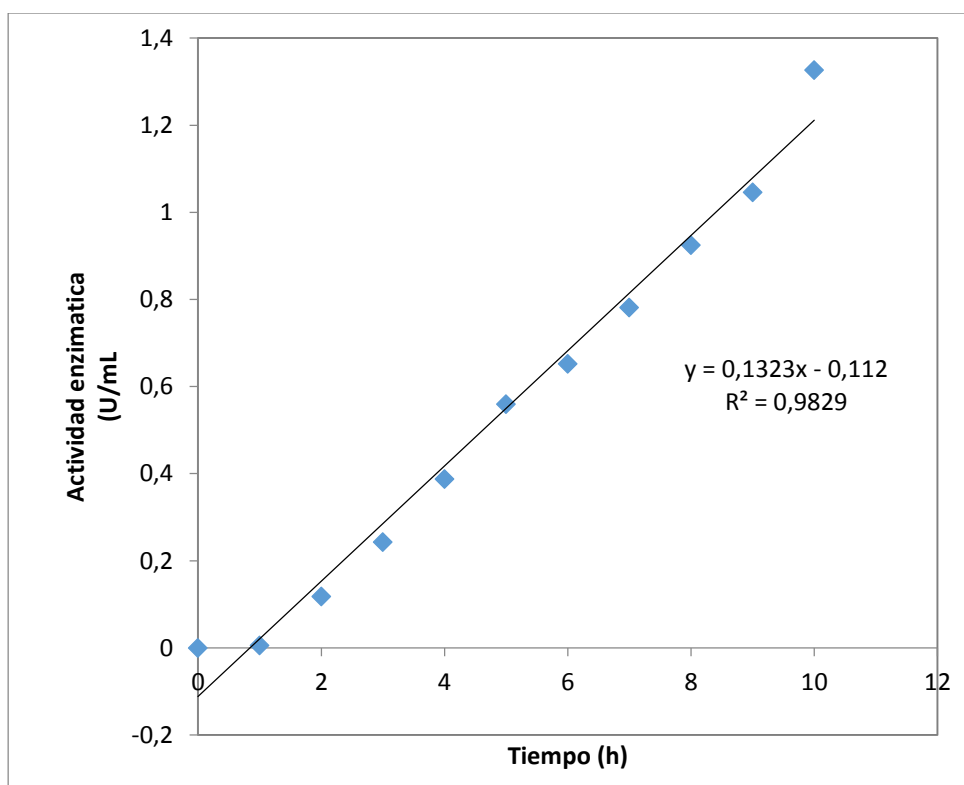




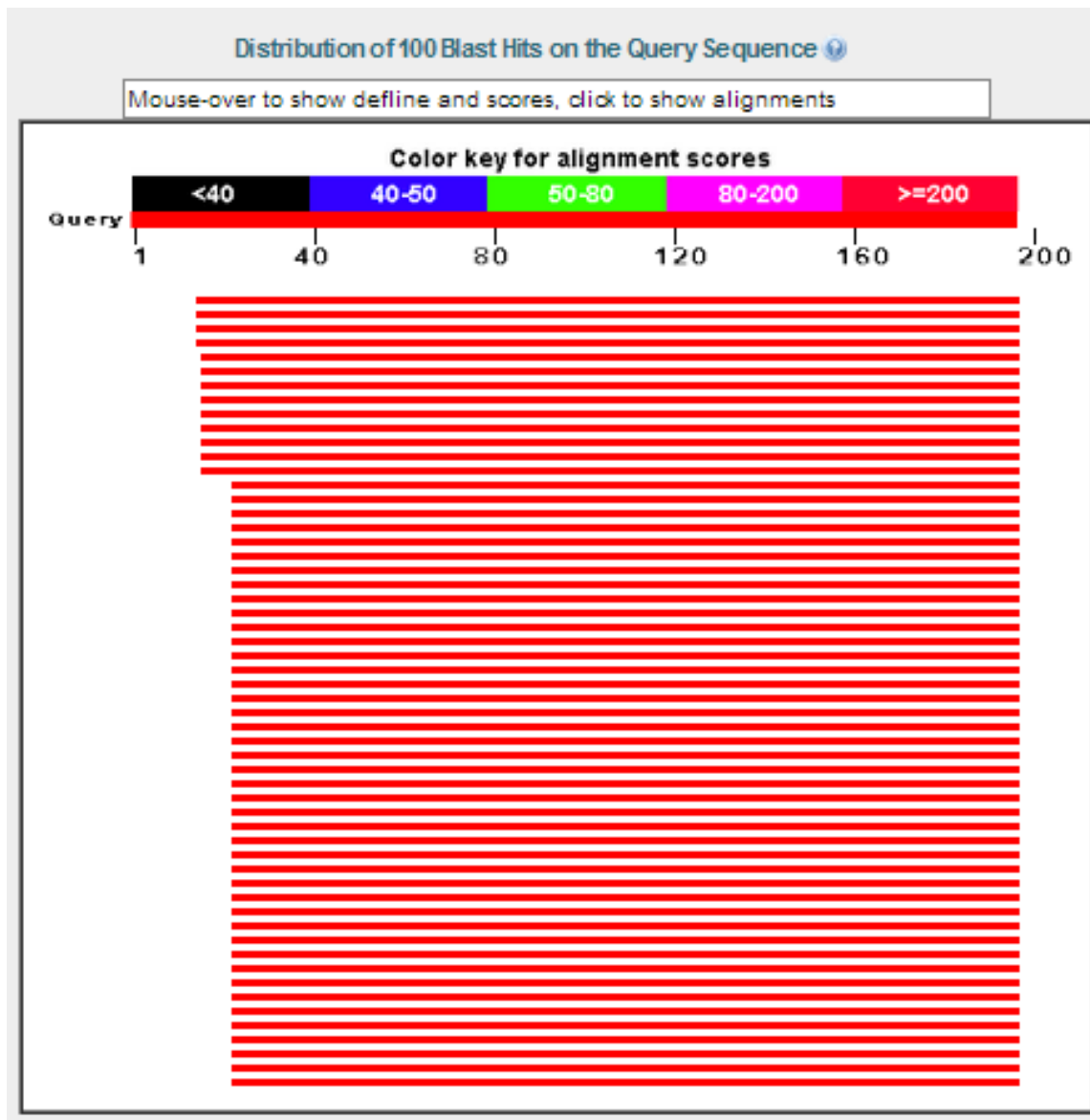


ANEXO 2: CURVA PATRÓN AZÚCARES REDUCTORES

CONCENTRACION DE CMC 0.1%



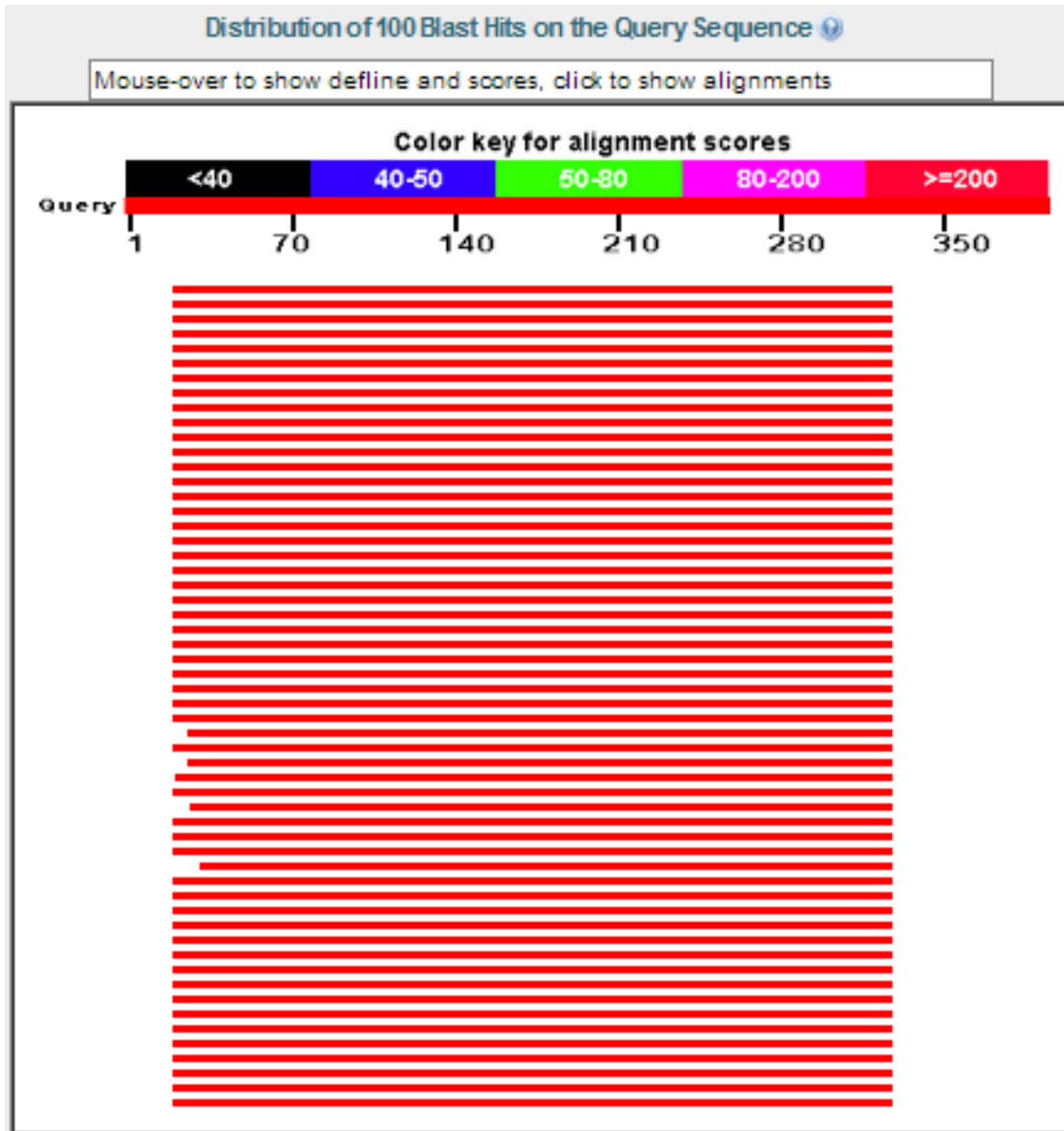
ANEXO 3 GRAFICO DE ALINEACIÓN PRIMER 518F (CEPA M5)



**ANEXO 4: RESULTADO DE LAS ALINEACIONES CON LA
CODIFICACION DEL MICROORGANISMO PRIMER 518F: CEPA M5
(Descripcion, max. Score, cobertura, E y % de identificacion)**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Aspergillus vadensis strain CBS 113365 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S r	294	294	93%	2e-76	94%	AY585549.1
<input type="checkbox"/> Fungal sp. AM2013 strain 83_Jmp internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosom	289	289	93%	9e-75	94%	KC506249.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tubingensis strain YMCHA 69 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ri	289	289	93%	9e-75	94%	JF436887.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger strain YMA 119 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal	289	289	93%	9e-75	94%	JF436885.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger strain SICAU SDT11 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribos	287	287	92%	3e-74	94%	KJ027986.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger strain LCC09 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal F	287	287	92%	3e-74	94%	KF986548.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tubingensis strain Cc_117 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal trans	287	287	92%	3e-74	94%	JQ910156.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus piperis internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene an	287	287	92%	3e-74	94%	JX101618.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger strain YMA 10 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal F	287	287	92%	3e-74	94%	JF436886.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger strain YMCHA 71 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosom	287	287	92%	3e-74	94%	JF436882.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and	287	287	92%	3e-74	94%	JF318957.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger isolate AN3 internal transcribed spacer 2, partial sequence	287	287	92%	3e-74	94%	JF826009.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus phoenicis internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene	287	287	92%	3e-74	94%	HQ315842.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus niger strain F207 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sr	281	281	89%	1e-72	94%	KJ544770.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tubingensis isolate 3SGSK2.1II 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal	281	281	89%	1e-72	94%	KC920472.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus tubingensis isolate 3SGSK1.1I 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal I	281	281	89%	1e-72	94%	KC920471.1

ANEXO 3 GRAFICO DE ALINEACIÓN PRIMER 800R (CEPA M5)



**ANEXO 4 RESULTADO DE LAS ALINEACIONES CON LA
CODIFICACION DEL MICROORGANISMO PRIMER 800R:CEPA M5
(Descripcion, max. Score, cobertura, E y % de identificacion)**

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain SC41 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	318	318	77%	2e-83	84%	DQ335979.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus tubingensis strain SCSGAF0190 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	315	315	77%	3e-82	84%	JN851058.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus tubingensis strain SICAU SDT29 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	KJ027996.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger isolate MO-25 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	KF939141.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus tubingensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	KF494190.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus tubingensis strain 1234 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	KF435033.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain FCBP648 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	KF496081.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain FCBP518 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	KF496080.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain FCBP469 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	KF496079.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus tubingensis strain JP44MY19 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	KF031025.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain PK-16 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	KC771221.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus tubingensis strain SL-89 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	KC460883.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus tubingensis strain HN-DC-9 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	KC215130.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain AL-25 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	KC341970.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger isolate OZ-3 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	313	313	77%	1e-81	84%	JX110160.1