

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS
BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA**



**AISLAMIENTO DE CEPAS ANAEROBIAS TERMÓFILAS
PRODUCTORAS DE CELULASAS Y HEMICELULASAS,
PROVENIENTES DE LA REGIÓN ALTIPLÁNICA DE BOLIVIA,
IMPLICADAS EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL MEDIANTE
TÉCNICAS DE CULTIVO Y AISLAMIENTO TRADICIONALES Y NO
TRADICIONALES**

Elaborado por:

Univ. Neida Rios Manriquez

Asesores :

María Teresa Álvarez Aliaga PhD.

Enrique Terrazas PhD.

**La Paz – Bolivia
2008**

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo, en especial a mi madre Polonia que sin ella nada sería posible en mi vida, a mis hermanas Grisel y Melissa. A la alegría de todos mis días, mi sobrina Ilkay.

Para la realización de este trabajo, agradezco especialmente el soporte económico recibido de ASDI/SAREC – Suecia en el desarrollo del Proyecto Biodiversidad Microbiana del Lago Poopó y Río Desaguadero.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, por haberme acogido para la elaboración del trabajo y su cooperación para la realización del mismo.

A la Doctora María Teresa Álvarez por su asesoramiento, sus consejos y en especial por su brindarme su amistad.

A la Lic. Carla Crespo por haberme guiado durante el experimento y el diseño del trabajo.

A mis compañeros de Laboratorio Efraín, Víctor Hugo, Álvaro y Georgina, por ser un buen equipo de trabajo y grandes amigos.

A mis amigas Carolina y Roxana, que de formas distintas siempre me recuerdan nunca perder la esencia que cada uno lleva en el interior

INDICE DE CONTENIDO

ABREVIACIONES.....	1
GLOSARIO	4
RESUMEN	3
CAP I. INTRODUCCION	5
CAP II. ANTECEDENTES.....	7
1. Biodiversidad Microbiana Extremófila.....	7
2. Técnicas de Cultivo y Aislamiento de Bacterias Termófilas Anaerobias	9
2.1. Técnica de Roller Tubes.....	9
2.2. Cultivo Bifásico.....	11
2.3. Encapsulación en Alginato de Calcio.....	11
3. Digestión Anaeróbica y su aplicación en Biorremediación y Bioenergía.....	13
3.1. Residuos Agrícolas e Industriales como sustratos potenciales de la Digestión Anaeróbica	14
3.2. Paja de trigo como Residuo Agrícola.....	15
3.3. Melaza de Caña como sustrato crudo.....	15
4. Enzimas implicadas en la Digestión Anaeróbica dirigida a la producción de Etanol	16
CAP III. JUSTIFICACION.....	20
1. Objetivo General.....	20
2. Objetivos Específicos	20
CAP VIII. MATERIALES Y METODOS	21
1. Determinaciones Analíticas.....	21
2. Toma de Muestras y Condiciones de Cultivo	23
3. Selección de Consorcios Termófilos Hidrolíticos con capacidad de Producción de Etanol	24
4. Aislamiento Primario a través de las Técnicas Tradicionales y no Tradicionales	24
CAP IX. RESULTADOS Y DISCUSION.....	25
1. Selección de Consorcios Anaerobios Termófilos Hidrolíticos con capacidad de producción de Etanol.....	25
2. Determinación de la Actividad Enzimática específica de consorcios Anaerobios Termófilos de acuerdo a su cultivo en Medio basal Mineral con Cmc, Xilano y Almidón como fuentes de carbono	27
3. Cinética de Crecimiento, Consumo de sustrato y producción de Etanol de los consorcios 2B y FT3 crecidos en Glucosa y Xilosa.....	29
4. Selección de cepas puras por Métodos Tradicionales y No Tradicionales	32
CAP X. CONCLUSIONES	40
CAP XI. PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO.....	41
REFERENCIAS	42

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Respiración anaeróbica</i>	8
<i>Figura 2. Gasificación del medio con nitrógeno en la Técnica de Hungate</i>	10
<i>Figura 3. Desarrollo de colonias en el agar, dentro de la botella</i>	10
<i>Figura 4. Cultivo bifásico</i>	11
<i>Figura 5. Composición del polímero alginato</i>	12
<i>Figura 6. Polimerización del alginato en presencia de Ca²⁺</i>	12
<i>Figura 7. Esquema general de la Técnica de Encapsulación en alginato de calcio</i>	13
<i>Figura 8. Formación de perlas de alginato, en constante agitación</i>	14
<i>Figura 9. Estructura de la celulosa, componentes de la celulosa: glucosa y celobiosa, y microfibrillas de celulosa</i>	16
<i>Figura 10. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa</i>	17
<i>Figura 11. Sitios de ataque enzimático</i>	19
<i>Figura 12. Reacción del ácido dinitrosalícílico, azúcares reductores</i>	21
<i>Figura 13. Actividad CMCasa, endoxilanasas y endoglucanasas del consorcio 2B crecido en paja de trigo, I.I.F.B. 2007</i>	27
<i>Figura 14. Actividad CMCasa, endoxilanasas y endoglucanasas del consorcio 2B crecido en melaza, I.I.F.B. 2007</i>	28
<i>Figura 15. Actividad celulolítica, consorcio 2B crecido en CMC, I.I.F.B. 2007</i>	28
<i>Figura 16. Actividad endoxilanasas, del consorcio 2B crecido en Xilano, I.I.F.B. 2007</i>	24
<i>Figura 17. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol del consorcio 2B inoculado en medio con glucosa, I.I.F.B. 2007</i>	30
<i>Figura 18. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol del consorcio 2B inoculado en medio con xilosa, I.I.F.B. 2007</i>	30
<i>Figura 19. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol del consorcio FT3 crecido en glucosa, I.I.F.B. 2007</i>	31
<i>Figura 20. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol del consorcio FT3 crecido en xilosa, I.I.F.B. 2007</i>	31
<i>Figura 21. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa 2B-1b crecido en glucosa, I.I.F.B. 2007</i>	33
<i>Figura 22. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa FT3-1b crecido en glucosa, I.I.F.B. 2007</i>	33
<i>Figura 23. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa 2B-2b crecido en xilosa, I.I.F.B. 2007</i>	34
<i>Figura 24. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa FT3-.2b crecido en xilosa, I.I.F.B. 2007</i>	34
<i>Figura 25. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa 2B-1r crecido en glucosa, I.I.F.B. 2007</i>	36
<i>Figura 26. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa FT3-1r crecida en glucosa, I.I.F.B. 2007</i>	36
<i>Figura 27. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa FT3-1r crecido en xilosa, I.I.F.B. 2007</i>	37
<i>Figura 28. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa FT3-2r crecido en xilosa, I.I.F.B. 2007</i>	37
<i>Figura 29. Crecimiento, consumo de sustrato, proteínas totales, β-D-xilosidasa y producción de etanol de la cepa correspondiente a la perla N° 5 crecida en xilosa, I.I.F.B. 2007</i>	39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de paja de trigo	15
Tabla 2. Composición Melaza de caña	16
Tabla 3. Muestras colectadas	23
Tabla 5. Consorcios anaeróbicos termofilos hidrolíticos seleccionados de acuerdo a su capacidad de expresión de actividades CMCasa y endoxilanolítica.....	26
Tabla 6. Producción de etanol y expresión de actividad CMCasa y endoxilanolítica en consorcios microbianos anaerobios termófilos seleccionados.....	26
Tabla 7. Parámetros de crecimiento, consumo y producción	32
Tabla 8. Parámetros de crecimiento, consumo y producción	35
Tabla 9. Producción de Etanol en cepas puras encapsuladas en alginato de calcio del consorcio FT3 crecidos en xilosa.....	38

ABREVIACIONES

UI	=	Unidades Internacionales
PCR	=	Reacción en Cadena de Polimerasa
BVNC	=	Bacterias viables no cultivables
MS	=	Materia soluble
MO	=	Materia orgánica
FDN	=	Fibra detergente neutro
FDA	=	Fibra detergente ácido
HEMI	=	Hemicelulosa
CELU	=	Celulosa
LIG	=	Lignina
PC	=	Proteína cruda
atm.	=	Atmosfera
rpm.	=	Revoluciones por minuto
CMC	=	Carboximetil celulosa
CMCasa	=	Carboximetil celulosa

GLOSARIO

Citocromos: Los citocromos son proteínas cuya función consiste en el transporte de energía química, tanto en la respiración aerobia; como en la fotosíntesis. Tienen un anillo nitrogenado porfirínico que encierra un átomo de hierro o cobre, los citocromos están incorporados en la membrana celular de las bacterias y en las membranas internas de las mitocondrias y de los cloroplastos, aceptan y liberan alternativamente electrones, que pasan a otro citocromo en transferencia de electrones, que funciona con liberación de energía.

DNA recombinante: DNA recombinante (rDNA) es una secuencia de DNA artificial que resulta de la combinación de diferentes secuencias de DNAs. Esta técnica surgió a partir de Ingeniería Genética.

Fibra detergente ácido: Es el residuo que queda luego de someter a la fibra detergente neutro a una solución de detergente ácido (ácido sulfúrico y bromuro de acetiltrimetilamonio). En este proceso se extrae la hemicelulosa, de tal forma que la fibra remanente estará constituida por celulosa y lignina. Al igual que FDN, los resultados se deben expresar en porcentaje de la materia seca evaluada.

Fibra detergente neutro: Es la fibra que queda luego de hervir al forraje en una solución de detergente neutro (sulfato lauril-sódico y ácido etilen-di-amino-tetra-acético, EDTA). En el tratamiento todo el contenido celular se disuelve y queda lo correspondiente a la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina). El contenido de FDN se expresa en porcentaje del total de materia seca.

Hemocultivo: Es un cultivo microbiológico de la sangre. Es un método diagnóstico empleado para detectar infecciones que se transmiten a través de torrente sanguíneo bacteriemia o septicemias.

Mesofílicas: Las bacterias mesófilas presentan un crecimiento óptimo a temperaturas entre 25°C y 40°C, la mayoría de los patógenos

humanos presentan un crecimiento óptimo de 37 °C, correspondiendo así a este grupo.

Metabolito: Un metabolito es cualquier molécula utilizada o producida durante el metabolismo.

Psicrófila: Las bacterias psicrófilas obligatorias requieren bajas temperaturas para su crecimiento siendo por lo general por debajo de 15°C. Algunas especies marinas toleran temperaturas incluso temperaturas debajo de 0°C.

Quiral: Conduce al término de quiralidad, es un término usado para definir moléculas que no pueden superponerse a su propia imagen este concepto es de importancia en estereoquímica. En sí la quiralidad es la presencia de un átomo de carbono con cuatro átomos o grupos diferentes unidos a él.

Resina: La resina es cualquiera de las sustancias de secreción de las plantas con aspecto y propiedades más o menos análogas a las de los productos así denominados. Del latín *resina*. Se puede considerar como resina las sustancias que sufren un proceso de polimerización o secado dando lugar a productos sólidos siendo en primer lugar líquidas.

Sinérgico: La acción sinérgica es el proceso de cooperación entre los efectos y reacciones de diversas sustancias o elementos cuyo resultante es superior a la simple suma de cada uno de sus componentes por separado.

Sustratos: En química, un sustrato o sustrato es una especie química que se considera, de forma explícita, objeto de la acción de otros reactivos. Por ejemplo, un compuesto cuya transformación está afectada por un catalizador.

Termofílicas: Las bacterias termófilas son aquellas que se desarrollan a temperaturas superiores a 45°C, pudiendo superar incluso los 100°C (hipertermófilos) siempre que exista agua en estado líquido.

RESUMEN

La problemática de los combustibles, su agotamiento y alto costo han incentivado a indagar sobre la obtención de energías alternativas como el biogás, biodiesel y bioetanol, a partir de la hidrólisis de residuos agroindustriales, contribuyendo de esta manera a la biorremediación. Siendo el principal objetivo del presente trabajo estandarizar una técnica óptima que nos permita el cultivo y aislamiento de bacterias anaerobias termófilas, con capacidad de producir enzimas involucradas en la producción de bioetanol usando como fuente de carbono residuos agroindustriales.

En el presente estudio se cultivaron bacterias anaeróbicas termófilas aisladas de aguas termales de la región altiplánica de Bolivia, mediante la técnica de Roll-tubes basada en la técnica Hungate modificada, cultivo bifásico ambos considerados métodos tradicionales (Escalante, 2004; Thayaananthan, 2005) y encapsulación en alginato de calcio un método no tradicional (Hansson y Adlercreutz, 2001). Dos consorcios bacterianos (2B y FT3) cultivados en medios con glucosa (2B) y xilosa (FT3) como fuente de carbono, fueron seleccionados. Las actividades CMCasa (1 UI/mL) y endoxilanasas (0.9 UI/mL), y la producción de etanol de 0.25 y 0.1 g/L fueron determinadas para las cepas 2B y FT3, respectivamente. Estas actividades son comparables con las determinadas en *Clostridium butyricum* con una actividad endocelulolítica de 0.99 UI/mL y endoxilanolítica de 1.5 UI/mL.

La inmovilización de las bacterias en perlas de alginato permite el incremento de la biomasa y mayor rendimiento de producción, llegándose a obtener hasta 0,7 g/L de etanol, facilitando el uso directo de las mismas o en la purificación de enzimas de interés industrial. Simultáneamente las actividades exoglucolíticas fueron determinadas en ambos consorcios. La actividad β -xilosidasa fue de 4.1 UI/mL para la cepa 5 proveniente del consorcio FT3, encapsulada en perlas de alginato, la actividad encontrada es comparable con la obtenida por *Klyveromices marxinus* que muestra una producción de 6.8 UI/mL de β -xilosidasa: La aplicación de estas enzimas puede dirigirse a la reducción de compuestos clorados en la industria del papel, en el procesamiento de alimentos, mejoramiento en la producción del vino, y producción de biocombustibles.

ABSTRACT

The problem of fuels, their exhaustion and high cost have been considered enough reasons to investigate how to obtain an alternative energy source such as biogas, biodiesel and bioethanol, through the hydrolysis of agroindustrial residuals, contributing this way to the bioremediation. The important objective in the work standardizes optimum Technique for cultivate and isolated of anaerobic thermophilic bacteria as potential enzyme production implied in bioethanol production.

In this study were cultivate and isolated anaerobic thermophilic bacteria isolated from thermal waters of Bolivian Andean region, using Roll-tubes based in the Hungate modified Technique, Biphasic culture (traditional methods) and Calcium Alginate Encapsulation (non traditional method). 2B and FT3 consortia were selected by cultivation in glucose and xylose as carbon source respectively. Two enzymatic activities were measured in both consortia. The CMCase and endoxylanase activity of consortia were 1 and 0.9 UI/mL respectively. Ethanol production was 0.25 g/L and 0.1 g/L respectively. These activities are comparable with the determined in *C. butyricum* with endocellulolytic activities of 0.99 UI/mL and endoxylanolytic of 1.5 UI/mL

The immobilization of bacteria in alginate beads allows the increment of biomass and high yield ethanol production ending up obtaining to 0.7 g/L of ethanol These facts facilitate the direct use in ethanol production or in purified enzymes of industrial interest. Simultaneously exoglycolytic activities were determined in both strains. B-glucosidase activity was 4.1 UI/mL for 2B consortium and β -xylosidase activity was 12 UI/mL for FT3 consortium, encapsulated in alginate beads., this activities are comparable with *Klyveromices marxinus* showing 6.8 UI/mL of β -xylosidase production and the application of these enzymes can go to reduction of compound chlorated in the paper industry, processing of foods, enhanced in the wine production and biofuels production.

CAP I. INTRODUCCION

En la actualidad existe una gran demanda de productos y procesos biotecnológicos, tales como aquellos catalizados por enzimas, que representan una alternativa a los procesos químicos convencionales. Esto puede deberse a que se produce un menor número de subproductos, o porque son procesos más selectivos para la obtención del producto de interés (Ferrer, 2005).

Sin embargo, el desarrollo de nuevos productos y procesos está limitado a las enzimas que han sido estudiadas en microorganismos no extremófilos conocidos hasta la fecha. En la actualidad se conocen aproximadamente 4300 enzimas (secuenciadas), de las que 300 están comercializadas (Ferrer, 2005). Estas a su vez, se han utilizado en diversos procesos encaminados a la obtención de productos de alto valor añadido, por ejemplo, biopolímeros formados por unidades de amino ácidos o azúcares, compuestos quirales con actividad biológica, bioetanol y biodiesel, etc. Sin embargo, la fuerte demanda de nuevos productos con actividad biológica que impera en la sociedad, requiere la búsqueda de nuevas enzimas, lo que implica un estudio profundo de la diversidad microbiana extremófila.

Las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, tienen gran interés industrial principalmente las celulasas y xilanasas ya que tienen un importante rol en la reducción de compuestos clorados y dióxido de cloro en la industria del papel. La β -D-xilosidasa es uno de los componentes enzimáticos del complejo hemicelulítico, ampliamente distribuido en la naturaleza éste se emplea para la hidrólisis de componentes que interfieren en la producción de vino. Por otro lado, esta enzima tiene sinergismo tanto con las xilanasas como con las glucosidasas. Es así, que representan una aplicación potencial en el procesamiento de alimentos y la producción de biocombustibles

La diversidad microbiana resulta una fuente importante de metabolitos primarios, secundarios y enzimas para los procesos biotecnológicos. Sin embargo, los métodos tradicionales de cultivo de microorganismos han limitado el análisis a aquellos que son capaces de crecer en condiciones de laboratorio (Ferrer, 2005). Tradicionalmente, estos estudios para caracterizar la diversidad microbiana se basan en técnicas de cultivo que permiten recuperar únicamente entre 0.1 y 10% de las bacterias viables cultivables (Escalante *et al.*, 2004). Es decir el restante 90% es aun desconocido y lo es también sus posibles aplicaciones biotecnológicas. En consecuencia, uno de los retos más importantes de la microbiología y biotecnología en la actualidad consiste en desarrollar métodos y técnicas que permitan el estudio de toda esta diversidad.

Las bacterias extremofilas se han convertido en los últimos años en tema de estudio y representan en la actualidad gran interés, debido a que constituyen la posibilidad de ser utilizadas en procesos industriales donde se trabaja bajo condiciones físicas y químicas extremas, sin afectar su crecimiento y/o producción. Dentro de este gran grupo de bacterias se encuentra aquellas que se desarrollan a temperaturas extremas y que han sido ampliamente estudiadas en ambientes aerobios. Se denominan bacterias termófilas a aquellas que tiene la capacidad de crecer a temperaturas mayores de 45 °C, también se tienen a aquellas que desarrollan a temperaturas mas allá de las de ebullición denominadas hipertermófilas (Conference "Extremophiles", 2004).

El estudio de los microorganismos extremófilos tomó auge luego del descubrimiento de bacterias en fuentes termales uno de los pioneros, fue *Thermus aquaticus*, productor de la enzima taq polimerasa, uno de los componentes esenciales de las pruebas de PCR (Brock, 1997).

Debido a esas características estas enzimas reciben el nombre de extremozimas; por ejemplo, celulasas y proteasas obtenidas de extremofílicos, tiene gran aplicación en la industria por ejemplo en lo textiles ya que permiten remover las pelusas de la ropa (Sittenfeld *et al.*, 2003). Es por eso que el interés actual esta centrado en el estudio de bacterias anaerobias termófilas por el costo beneficio que implica su cultivo.

Existen un sin número de técnicas de aislamiento para bacterias anaerobias por lo general estos métodos son bastante conocidos y bastante utilizados como el método Hungate modificado o PRAS de Hungate (Ljungdahl y Wiegel, 1987), que permite un exitoso cultivo y aislamiento. También se tiene el uso de jarras anaeróbicas (Jarras Gaspak), bolsas plásticas, y la cámara de anaerobiosis o "cámara de guantes". Los dos últimos métodos son muy caros, requieren equipamiento complejo, son lentos y se usan para estudios de Flora Normal en laboratorios altamente especializados. Si bien los métodos ya existentes son efectivos, ya que nos aseguran el aislamiento, son muy laboriosos y requieren de mucho tiempo.

Por otro lado, últimamente se ha demostrado que el uso del polímero alginato de sodio (Smidsrod, O. y Skjak Brack ,1990) nos permite aislar a células vivas y moléculas por encapsulación. Es así, que esta técnica también se puede aplicar al aislamiento de bacterias viables cultivables y no cultivables en un ambiente anaerobio permitiendo al mismo tiempo la posibilidad de aislar las mismas, obteniendo de esta manera colonias a partir de una única célula bacteriana.

La investigación presentada esta dirigida al aislamiento de cepas anaerobias termófilas con capacidad de producir celulasas y hemicelulasas, implicadas en la producción de etanol mediante el uso de técnicas de cultivo y aislamiento tradicionales como Técnica Roller-tubes, Cultivo bifásico y Encapsulación en alginato de calcio, este último como técnica no tradicional. Así también se detalla una comparación de los tres métodos tomando en cuenta su actividad enzimática y la producción de etanol.

CAP II. ANTECEDENTES

Diferentes estudios han determinado que los microorganismos anaerobios termofílicos encontrados en ambientes a altas temperaturas pertenecen al orden Thermotogales y Clostridiales principalmente, y en particular un amplio grupo de microorganismos que pertenecen a los géneros *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium* y *Clostridium* (Posada *et al.*, 2004). La mayoría de estos organismos son objeto de estudio por su alto potencial de conversión de sustratos de origen vegetal en productos finales de valor agregado como son el lactato y el etanol, utilizados en la producción de compuestos químicos y combustibles (Cann *et al.*, 2001).

La utilización de enzimas termoestables en procesos que involucran la transformación de polímeros en unidades simples ofrece ventajas con respecto al uso de enzimas mesofílicas, ya que a elevadas temperaturas la solubilidad de los sustratos poliméricos es más alta y además, a altas temperaturas los riesgos de contaminación se reducen considerablemente (Gupta *et al.*, 2004). Es así, que diferentes enzimas termoestables de los géneros ya mencionados han sido purificadas y/o clonadas.

Por otro lado ya se han hecho investigaciones que demuestran que microorganismos extremófilos en condiciones de anaerobiosis, son capaces de producir distintas enzimas de interés biotecnológico (Soto, 2005), dichas enzimas se han utilizado en multitud de procesos, encaminados a la obtención de productos de alto valor agregado, por ejemplo, biopolímeros formados por unidades de aminoácidos o azúcares, compuestos quirales con actividad biológica, bioetanol y biodiesel, etc.; sin embargo, la fuerte demanda de nuevos productos con actividad biológica que impera en la sociedad, requiere la búsqueda de nuevas enzimas principalmente aquellas que pueden desarrollarse en condiciones extremas.

El término extremozima, se utiliza para referirse a enzimas que funcionan en forma óptima bajo condiciones ambientales extremas, provenientes de organismos extremófilos. Es así, que dada la importancia que representan estas enzimas se vienen realizando estudios hace más de 35 años, aunque enzimas extraídas de los mismos fueron utilizadas con fines industriales hasta hace 4 años. Siendo, el primer producto usado en la industria una celulasa extremófila, como aditivo para detergentes en el año 1997 (Casabona, 2001).

Así también se ha comprobado que las denominadas bacterias viables no cultivables (BVNC), también son capaces de producir enzimas por ejemplo proteasas (Thayaanathan *et al.*, 2005), con un aislamiento llevado a cabo mediante la Técnica de Encapsulación en Alginato Cálcico, la cual se ha presentado como una alternativa para el aislamiento eficaz de las BVNC en condiciones extremas.

1. Biodiversidad Microbiana Extremófila

La digestión anaeróbica es un proceso biológico fermentativo, en la cual la materia orgánica es descompuesta por la acción de una serie de microorganismos bacterianos, que la transforman en

una mezcla de gases. El proceso de digestión anaerobia, frente a los procesos aerobios, transcurre con un menor desprendimiento calorífico lo que determina un mayor contenido energético de los productos resultantes y consecuentemente, un mayor rendimiento energético del proceso. La fracción de la energía total disponible utilizada por los microorganismos para su propio crecimiento es mucho menor que en los sistemas aerobios. Es un proceso complejo, que requiere bastante control para asegurar un correcto funcionamiento. Se han descrito gran cantidad de tóxicos e inhibidores del proceso, lo que puede hacer que el proceso no sea viable para determinados sustratos (Brock, 1998; Campos, 2001).

El crecimiento anaeróbico es una de las características principales de los procariotes y bastante raro en eucariotes. Su metabolismo es bastante similar al sistema aeróbico, utilizan las mismas enzimas, citocromos, etc. La diferencia radica en que en los sistemas aeróbicos, el oxígeno molecular actúa como ultimo aceptor de electrones, a través de la cadena de transporte, mientras que en los sistemas anaeróbicos se usa otros aceptores como Fe^{3+} , NO_3^- , NO_2^- , S^0 , CO_2 y SO_4^{2-} , entre otros (Brock, 1998).

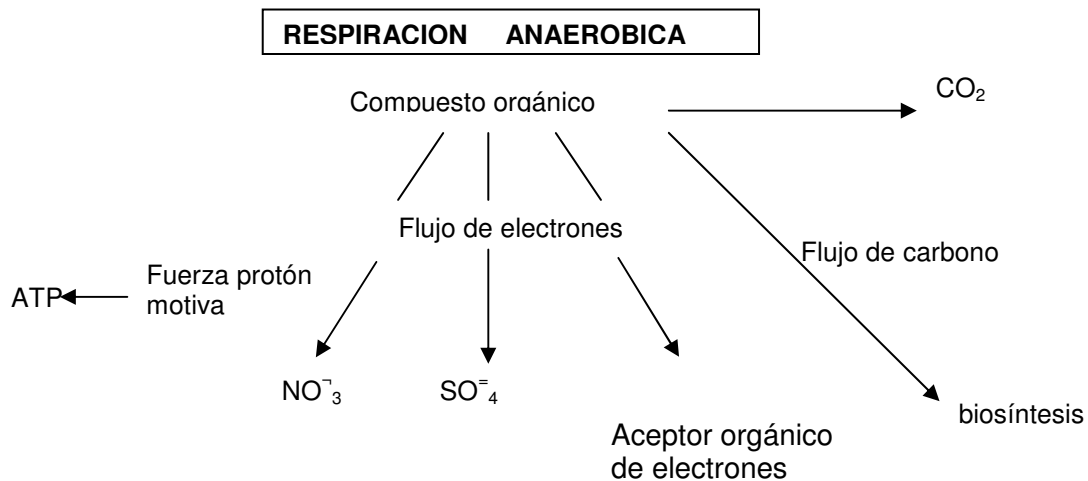


Figura 1. Respiración anaeróbica
(Extraído de Hernández et al., 1999)

Dentro de los microorganismos extremófilos se encuentran descritos los de metabolismo anaeróbico. Estos ofrecen bastantes ventajas en procesos industriales, ya que muchos funcionan más rápida y eficazmente en otras condiciones extremas como ser pH, temperatura, concentraciones de sal, etc. Por ejemplo las enzimas de los termófilos son capaces de catalizar reacciones a temperaturas elevadas, además que presentan mayor estabilidad y vida media mas prolongada que los mesófilos. Es por estas razones por la que se han incrementado estudios sobre la aplicación de los productos provenientes de microorganismos extremófilos importantes en la biotecnología, debido a la alta resistencia al calor de sus enzimas (por ejemplo, la polimerasa utilizada en la técnica PCR se obtuvo de una bacteria termófila, *Thermus aquaticus* (Posada et al., 2004).

Sin embargo el desarrollo de métodos moleculares ha permitido estimar que la diversidad existente en la naturaleza se encuentra entre 10^5 y 10^7 especies (Roselló-Mora y Amann, 2001), de los cuales se estima que sólo el 1% de los microorganismos han sido cultivados y caracterizados, dejando una gran cantidad (más de 10.000 especies diferentes) sin explorar, el desconocimiento de esta enorme diversidad es una de las carencias más importantes que ha tenido la Biología, Microbiología y Enzimología. Se puede decir que los métodos tradicionales para el cultivo de los microorganismos han limitado el análisis a los que son capaces de crecer en condiciones de laboratorio (Pace, 1997; Suzuki *et al.*, 1997), por lo que el porcentaje restante se ha denominado como viables no cultivables.

También se ha propuesto que las BVNC, son microorganismos filogenéticamente similares a los cultivables, pero en un estado fisiológico que los hace recalcitrantes a ser cultivados. La base de esta explicación es que algunas bacterias cultivables pueden convertirse en viables, pero no cultivables en condiciones ambientales adversas, y revertirse a un estado cultivable al restaurarse las condiciones favorables (McDougald *et al.*, 1998). No hay una explicación satisfactoria para entender la baja proporción de bacterias cultivables, y este fenómeno ha sido una seria limitación para estudiar la diversidad microbiana del suelo y medio ambiente.

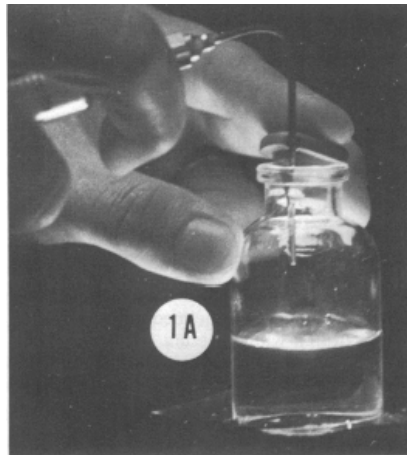
En la actualidad, existen herramientas moleculares que permiten realizar la ingeniería genética molecular o tecnología del ADN recombinante (Bolívar, 2004). Con ella es posible el aislamiento, la modificación y la caracterización del ADN de cualquier organismo. Sin embargo, se requiere de equipos bastante sofisticados y métodos costosos, por lo que es importante desarrollar técnicas con las que se puedan cultivar bacterias viables no cultivables sin necesidad de recurrir a técnicas moleculares (Torsvik *et al.*, 2002).

2. Técnicas de Cultivo y Aislamiento de Bacterias Termófilas Anaerobias

Los métodos tradicionales para obtener nuevos biocatalizadores a través cultivo directo de cepas puras de microorganismos, es aún una estrategia estándar y potente. De esta forma, grandes compañías tienen una amplia colección de microorganismos que utilizan como productores no sólo de biocatalizadores, sino también de metabolitos primarios o secundarios utilizados en la industria (Ferrer, 2005). Pero dichos métodos requieren de tecnología sofisticada, además que la mayoría de ellos están desarrollados para el cultivo y aislamiento de organismos mesófilos aerobios, y no así para aquellos que viven en ambientes extremos.

2.1. Técnica de Roller Tubes

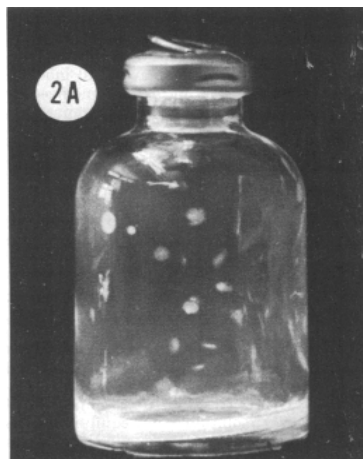
Uno de los métodos más utilizados es el de Hungate este método se caracteriza por ser un método simple, flexible, fiable, y además que no requiere reactivos, ni instrumentos complejos, este método es bastante utilizado para bacterias anaerobias estrictas ya que evita la posible existencia de oxígeno en el medio a comparación de otros que extremadamente sensibles al oxígeno (T. Miller y M.J. Wolin, 1973).



*Figura 2. Gasificación del medio con nitrógeno en la Técnica de Hungate
(Extraído de T. Miller y M.J. Wolin, 1973)*

Fundamentalmente se basa en el uso de botellas de 100 mL, cerradas con tapones de caucho de butil selladas con anillas de aluminio. El medio está compuesto básicamente por minerales con la adición de un agente reductor, posteriormente es gasificado con un gas inerte libre de O_2 . Una vez que el medio ya está embotellado y sellado, puede esterilizarse (Figura 2). La inoculación posterior y la adición de algunos compuestos se agregan con una jeringa y aguja hipodérmica estéril.

Existen variaciones de la técnica original descrita por Hungate para el cultivo de microorganismos anaerobios estrictos. En este trabajo se utilizó una modificación de la técnica, denominada “Técnica Roller-tubes”, la misma que incluye el crecimiento de colonias dentro de una matriz de agar-agar que es esparcido por las paredes de la botella (Figura 3).



*Figura 3. Desarrollo de colonias en el agar, dentro de la botella
(Extraído de T. Miller y M.J. Wolin, 1973)*

2.2. Cultivo Bifásico

Por otro lado, también se tiene la técnica de cultivo en dos fases, o cultivo bifásico en botellas de castañeda, que es bastante utilizado principalmente en hemocultivos. Esta técnica fue desarrollada por Ruiz Castañeda para el cultivo de *Brucella* la principal ventaja que presenta la técnica es que permite el desarrollo del inóculo primero en su fase líquida, enriqueciendo el cultivo de esta manera, y luego el aislamiento en su fase sólida. Para esto el cultivo debe realizarse primero de forma vertical, y posteriormente al desarrollo microbiano la botella se cultiva de forma horizontal, como se indica en la Fig. 4, hasta la formación de colonias sobre el agar.

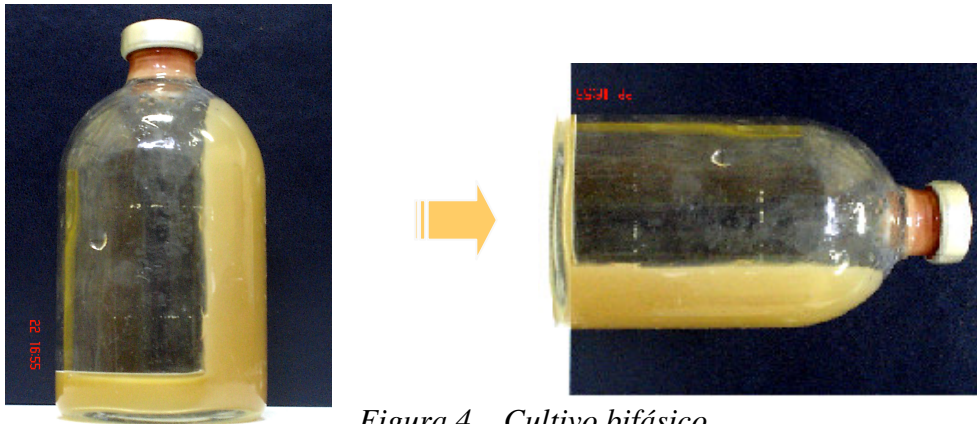


Figura 4. Cultivo bifásico

2.3. Encapsulación en Alginato de Calcio

La inmovilización biológica es una técnica mediante la cual moléculas, enzimas, organismos o células son fijados a superficies o atrapados en matrices. La inmovilización protege el material biológico frágil y permite que sea reutilizado. Entre los métodos más importantes de inmovilización de células está la: Microencapsulación, la cual consiste en la retención física de células en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por polímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poli(acrilamida, colágeno, alginato, carragenato o resinas de poliuretano, etc. (Arroyo, 1998).

El alginato es uno de los biopolímeros más utilizados en el procedimiento de encapsulación, el cual tiene la propiedad de gelificarse en presencia de iones divalentes como el Ca^{2+} (Ruminot C. *et al.*). El alginato es un polisacárido que se obtiene de algunas "algas marrones", algas de gran tamaño, entre las que se encuentran fundamentalmente *Laminaria hyperborea*, que prolifera en las costas de Noruega (Calvo M.).

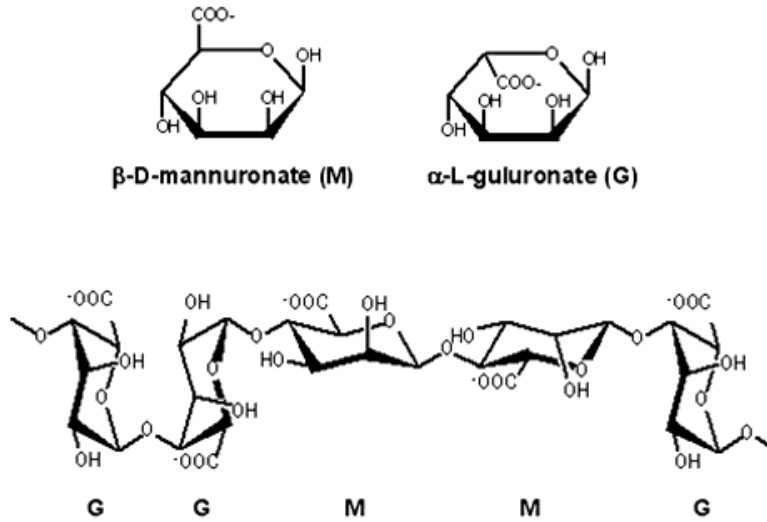


Figura 5. Composición del polímero alginato
(Extraído de Sriamomsak et al., 2007)

El alginato está formado por dos tipos de monosacáridos, los dos con un grupo ácido, el ácido glucorónico y el ácido manurónico (Calvo Miguel)

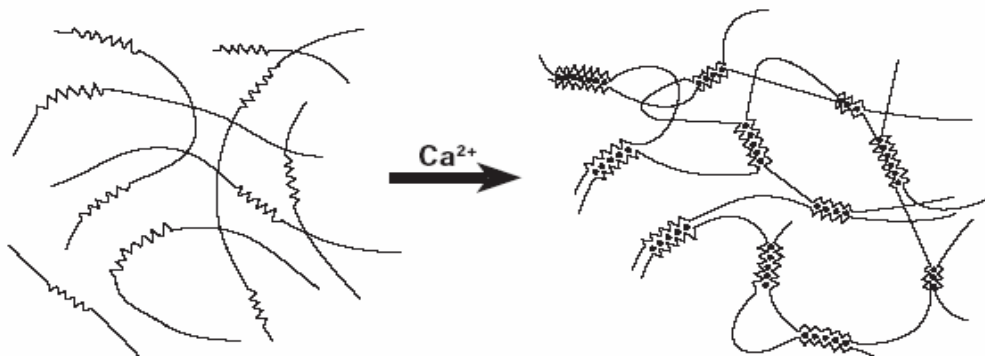


Figura 6. Polimerización del alginato en presencia de Ca^{2+}
(Extraído de Microbios y Moléculas, 2000)

Las células que van a ser atrapadas se mezclan con una solución de alginato de sodio, esta mezcla es añadida a otra disolución que contiene cationes multivalentes normalmente Ca^{2+} en cuanto las gotas entran en contacto con la solución catiónica se forman esferas debido a la polimerización del alginato (Smidsrod y Brack, 1990).

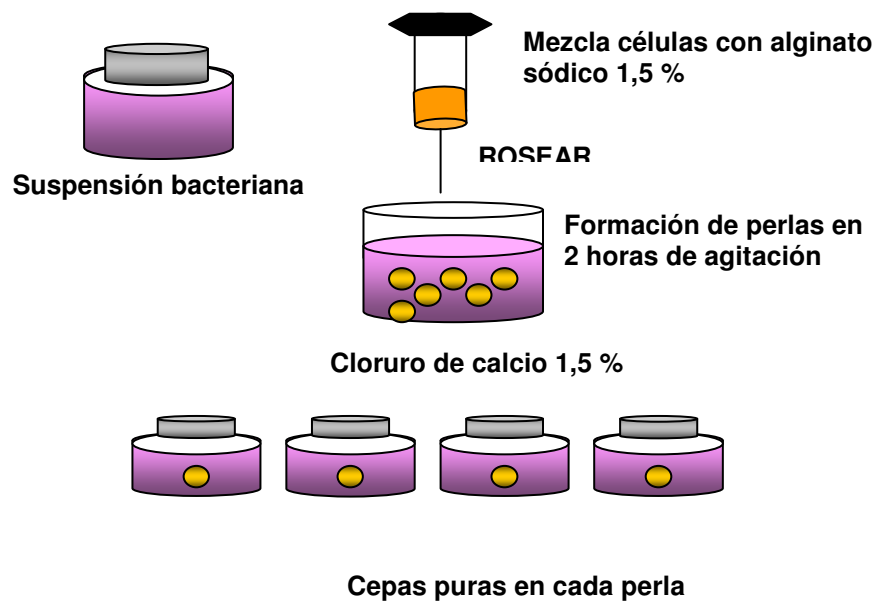


Figura 7. Esquema general de la Técnica de Encapsulación en alginato de calcio

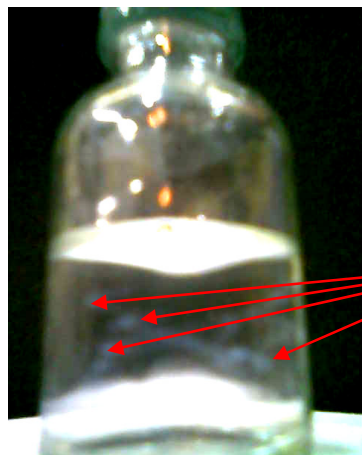


Figura 8. Formación de perlas de alginato, en constante agitación

3. Digestión Anaeróbica y su aplicación en Biorremediación y Bioenergía

La digestión anaerobia es un proceso complejo en el que intervienen diversos grupos de bacterias que actúan unos de forma simultánea y otros de forma consecutiva (Campos, 2001). Este proceso se caracteriza por tener tres fases diferenciadas durante el proceso de degradación del sustrato, en el que intervienen diversas poblaciones de bacterias, siendo la naturaleza y composición química del sustrato la que define la población bacteriana.

El primer paso en la digestión anaerobia implica la transformación del material orgánico insoluble y compuestos de alto peso molecular tales como lípidos, polisacáridos, proteínas,

grasas, ácidos nucleicos, etc. este paso se llama la hidrólisis se lleva a cabo a través de enzimas hidrolíticas como se enzimas ligninolíticas, celulolíticas y hemicelulolíticas, este proceso es realizado por los anaerobios estrictos tales como *Bacterioides*, *Clostridia* y las bacterias facultativas como *Streptococcus*, etc. En el segundo paso, la acidogénesis, otro grupo de microorganismos fermenta los productos de la hidrólisis en ácido acético, hidrógeno, bióxido de carbono y otros ácidos orgánicos volátiles simples de bajo peso molecular como el ácido propiónico y el ácido butírico que alternadamente se conviertan a ácido acético. El tercer paso comprende la conversión de los ácidos volátiles en una mezcla de gases compuesta principalmente por metano y dióxido de carbono, es te paso es realizado por bacterias metanogénicas (Yadvicka *et al.*, 2004)

Los principales sustratos que se pueden utilizar en la digestión anaerobia son residuos agrícolas y ganaderos, cultivos energéticos, residuos industriales orgánicos, aguas residuales urbanas e industriales, lodos de depuradoras y fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (Flotats *et al.*, 1997). Los residuos agrícolas son la mayor fuente de residuos y de potencial contaminante a nivel mundial, y dentro de éstos, los residuos ganaderos constituyen el principal problema ambiental (Hobson, 1990). Es en la actualidad la acumulación de éstos uno de los problemas preocupantes, por lo que se viene planteando diferentes soluciones biológicas que permitan al mismo tiempo su disminución y aplicación, es por eso la importancia que ha desarrollado la biorremediación.

3.1. Residuos Agrícolas e Industriales como sustratos potenciales de la Digestión Anaeróbica

Se define como residuos a aquellos productos de desecho generados en las actividades de producción y consumo que no alcanzan, ningún valor económico, lo que puede ser debido tanto a la falta de tecnología adecuada para su aprovechamiento como a la inexistencia de un mercado para los productos recuperados (Ingenieroambiental.com). El tratamiento de los mismos consiste en trasladar la contaminación de un medio a otro.

La biorremediación se puede definir como el uso intencional de procesos de degradación biológicos para eliminar sustancias contaminantes ambientales que han sido vertidos con conocimiento o accidentalmente en el medio ambiente. Los procesos de remediación pueden efectuarse en el mismo lugar donde ha ocurrido el derrame, o bien separando la porción contaminada y trasladándola a un reactor (D. Yullo, 2003). Tal es el caso de efluentes industriales o domiciliarios que se tratan previamente al vertido hacia el medio ambiente.

El uso de los materiales crudos renovables principalmente residuos agroindustriales y ganaderos es en la actualidad de gran interés durante el desarrollo de procesos sostenibles de energía alternativa, para reemplazar a los hidrocarburos, ya que además de representar una fuente renovable existe una disminución de contaminantes ambientales producidos por los hidrocarburos, y es en ese sentido que se propone a diseñar bioprocesos, y técnicas moleculares que coadyuven en la investigación.

El agotamiento de los recursos energéticos basados principalmente en combustibles no renovables, el consumo de energía incrementado a nivel mundial, así también la formación

enormes cantidades de gases contaminantes que son liberados a la atmósfera a raíz del consumo de estos combustibles (FNB, 2004), es sin duda uno de los problemas que impera en la sociedad.

Se sabe que este tipo de contaminación ha causado cambios en el clima del planeta, por lo que se ha convertido en una de las problemáticas que más preocupan a los gobiernos, las comunidades y la opinión pública en general (FNB, 2004). La única forma de enfrentar esta problemática es mediante recursos energéticos renovables. Para ello, la biotecnología ofrece múltiples alternativas tecnológicas, una solución renovable es el uso de energía solar en forma de biomasa, la cual está representada en los materiales lignocelulósicos y los cultivos de plantas ricas en energía. Las emisiones de CO₂ generadas por la producción y uso de biocombustibles son compensadas por la absorción de CO₂ durante el crecimiento de las plantas y de otros materiales vegetales, a partir de los cuales dichos combustibles se producen. (Cannell, 2003) destaca que una hectárea de cultivos ricos en energía usada para la producción de biocombustibles líquidos (bioetanol, biodiesel) puede evitar la emisión de 0,2-2,0 ton de carbono a la atmósfera en comparación con el empleo de combustibles fósiles (Sánchez y Cardona, 2005).

3.2. Paja de trigo como Residuo Agrícola

La paja de trigo es uno de los desechos agroindustriales más abundante, este no tiene ninguna utilización en forrajes, o abono en la agricultura, es decir no tiene ninguna aplicabilidad. Posee gran cantidad de hemicelulosas y celulosas, y un bajo porcentaje de ligninas (Tabla 1), por lo que puede brindar grandes cantidades de fuente de carbono además de ser fácilmente degradado por bacterias con capacidad de hidrolizar dichos componentes.

Tabla 1. Composición de paja de trigo

(Extraído de Forrajes)

COMPOSICIÓN QUIMICA- PAJA DE TRIGO

MS%	91,4
MO %	83,3
PC %	4
FDN %	70,5
FDA %	48,8
HEMI %	21,7
CELU %	31,1
LIG %	8,3

MS= Materia seca en su estado natural
 MO= Materia orgánica PC= Proteína cruda
 FDN= Fibra detergente neutro
 FDA= Fibra detergente ácido
 HEMI= Hemicelulosa CELU= Celulosa
 LIG= Lignina

3.3. Melaza de Caña como sustrato crudo

Otro de los desechos que se genera en la industria es la melaza de caña, este es un líquido denso y negrozco constituido por el residuo que permanece en las cubas después de la extracción de la

mayor parte de los azúcares de remolacha y caña por cristalización y centrifugación. Las melazas son esencialmente concentrados de hidratos de carbono (Tabla 2).

Tabla 2. Composición Melaza de caña
(Extraído de FEDNA, 2003)

COMPOSICIÓN	MELAZA DE CAÑA
Humedad	23.6 %
Cenizas	10.1 %
Grasa verdadera	16.2 %
Azúcares	43.5 %
Calcio	0.74 %
Sodio	0.18 %
Cloro	1.85 %
Magnesio	0.36 %
Potasio	3.02 %
Azufre	0.45 %

4. Enzimas implicadas en la Digestión Anaeróbica dirigida a la producción de Etanol

La celulosa es un polímero bastante abundante en la naturaleza, está formada por residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,4 glucosídicos y es el constituyente principal de la pared celular de las plantas, puede estar en estado puro o asociado a otros compuestos tales como la hemicelulosa y ligninas, (Hernández *et al.*, 1999) también puede encontrarse como constituyente de las algas y además puede ser sintetizado por algunos microorganismos. Este polímero tiene gran importancia ecológica, industrial y económica dado precisamente que se requiere bastantes procedimientos, para su despolimerización.

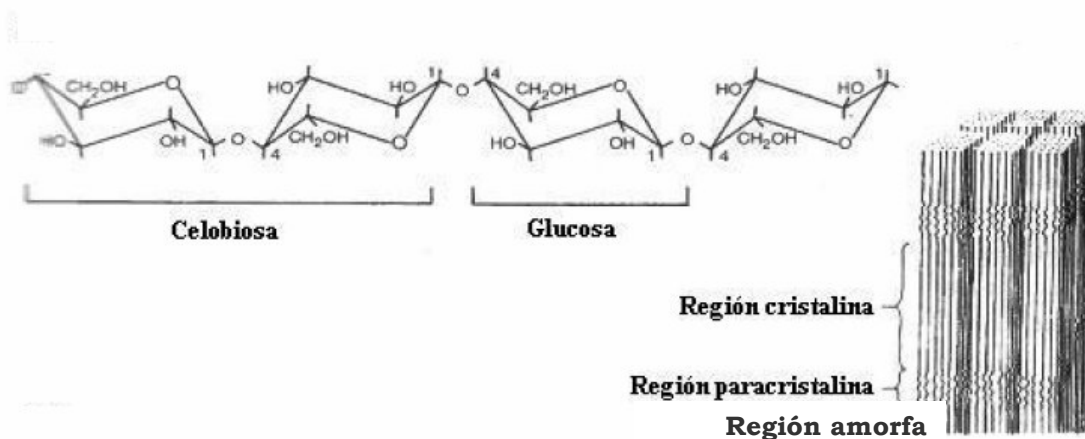


Figura 9. Estructura de la celulosa, componentes de la celulosa: glucosa y celobiososa, y microfibrillas de celulosa
(Extraído de Gonzalez, 2004)

Es así, que para su hidrólisis se han utilizados por lo general ácidos que permitan su degradación sin embargo en procesos biotecnológicos ofrece una hidrólisis utilizando enzimas producidas por microorganismos, entre las enzimas más estudiadas por su gran aplicación están aquellas que se ven implicadas en la hidrólisis de los principales componentes de la pared vegetal son las celulasas, hemicelulasas y ligninolíticas.

Las celulasas son enzimas complejas que se encargan de la degradación de la celulosa denominadas también glicosil hidrolasas o glicohidrolasas, pueden hidrolizar oligosacáridos o polisacáridos de glucosa, consta de dos unidades importantes una que rompe los enlaces de hidrogeno liberando de esta manera cadenas de glucosa susceptibles a una segunda hidrólisis, y la otra unidad que se encarga de hidrolizar estas cadenas hasta celobiosa y glucosa. (González, 2004.)

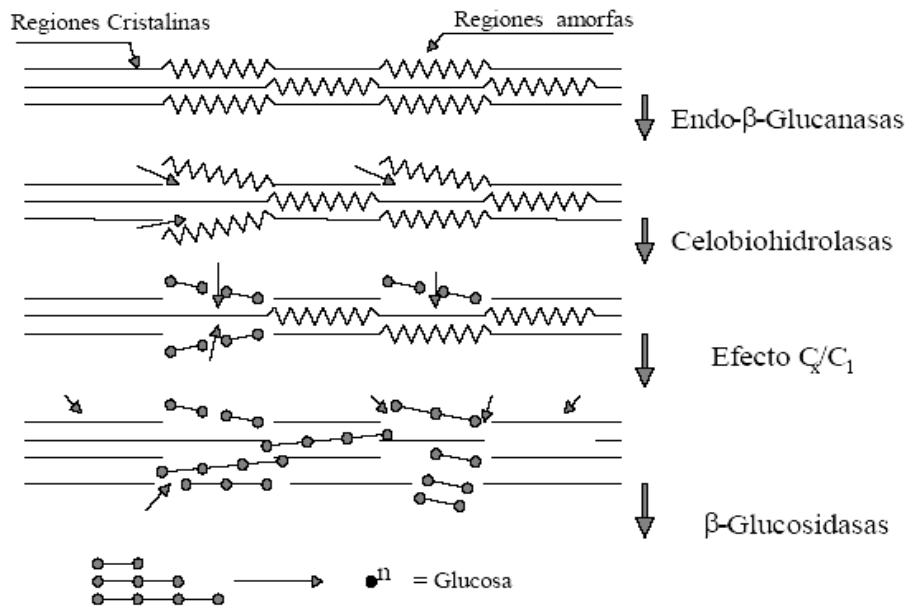


Figura 10. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa

(Extraído de Capítulo IV Estudio del Comportamiento de la Fibra Lyocell frente a la hidrólisis enzimática con celulasas)

Se sabe que existen bacterias y hongos productores de celulasas, en un principio se pensaba que los sistemas celulolíticos estaban formados por varios tipos de celulasas que actuaban de forma sinérgica actualmente se sabe que son un complejo multienzimático denominado celulosoma, aunque cabe señalar que en sistemas aerobios se ha demostrado que actúan enzimas libres (Hernández *et al.*...).

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en plantas es soluble en álcali y está estrechamente relacionado a la celulosa. Está compuesta por unidades de glucosa, galactosa, manosa, xilosa y arabinosa (Bhat y Hazlewood, 2001). Las hemicelulasas contienen dos tipos de polisacáridos unos de cadena corta que forman parte de la estructura de la celulosa y otros amorfos incrustados asociados con la lignina (González, 2004).

Estas enzimas (celulasas y hemicelulasas) han sido ampliamente estudiadas en hongos mesófilos, tales como *Trichoderma* y *Phanaerochaete*, bacterias como *Clostridium thermocellum* (González, 2004; Lynd *et al.*, 2002). Sin embargo, sus actividades hidrolíticas son afectadas por una serie de factores físicos y químicos que limitan su aplicación a nivel industrial. Por ello, existe necesidad de aislar cepas con mejores rendimientos en la cantidad de enzimas liberadas al medio extracelular y que mantengan la calidad de dichas enzimas, además que expresen una elevada estabilidad de su actividad a pH extremos, solventes orgánicos, detergentes iónicos y principalmente la de mantener sus actividades enzimáticas a elevadas temperaturas de reacción (Ramírez y Cocha, 2003). Por esta razón, los microorganismos termófilos han sido sugeridos como fuentes alternativas de celulasas por la termoestabilidad de sus enzimas, propiedad ventajosa en aplicaciones industriales

La hidrólisis enzimática de la celulosa es un proceso catalítico heterogéneo que involucra la catálisis de celulosa soluble e insoluble el mecanismo aceptado para esta reacción consiste principalmente en tres pasos fundamentales:

- a) Formación de componentes intermediarios con cadenas de celulosa y entonces la hidrólisis al azar dando una cadena polimerizada y azúcares reductores solubles con un grado de degradación de polimerización de menos de seis. La celobiosa y la glucosa son los más usualmente presentes en la fracción soluble, esto a través de las endoglucanasas
- b) Los enlaces no reducidos de los extremos de las cadenas y otros derivados oligosacáridos, se rompen a través de las exoglucanasas
- c) Finalmente la celobiosa se hidroliza en glucosa en una fase homogénea, por la β -1,4 glucosidasa exo celulasas β -D- glicosidasa (Hernández, 2003)

La hidrólisis de la celulosa genera moléculas de glucosa que pueden ser llevadas a través de una fermentación alcohólica hasta etanol. La hemicelulosa puede ser hidrolizada hasta azúcares como la xilosa que en presencia de enzimas xilanasas y xilosidasas también pueden ser fermentables con rendimientos bastante altos de etanol (CANMET Energy Technology Centre, 2004).

Es así que la β -glucosidasa o glucohidrolasa se ha usado ampliamente en producción del etanol usando varios sustratos celulósicos de residuos agrícolas como residuo de maíz, paja y bagazo. Así también estas enzimas son utilizadas en los procesos de fermentación de frutas y sus productos, también es útil en el proceso de deinking de tinta de impresión de los desechos del papel. Se ha demostrado que muchas bacterias, hongos y levadura pueden producir esta enzima por ejemplo: bacterias como *Bretlanomyces bruxellensis*, *Oenococcus oeni* y *Clostridium thermocellum*, hongos como *Aspergillus oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma reesei*, y levaduras como *Candida peltata* y *Candida curvata* (Rabinovich, 2006)

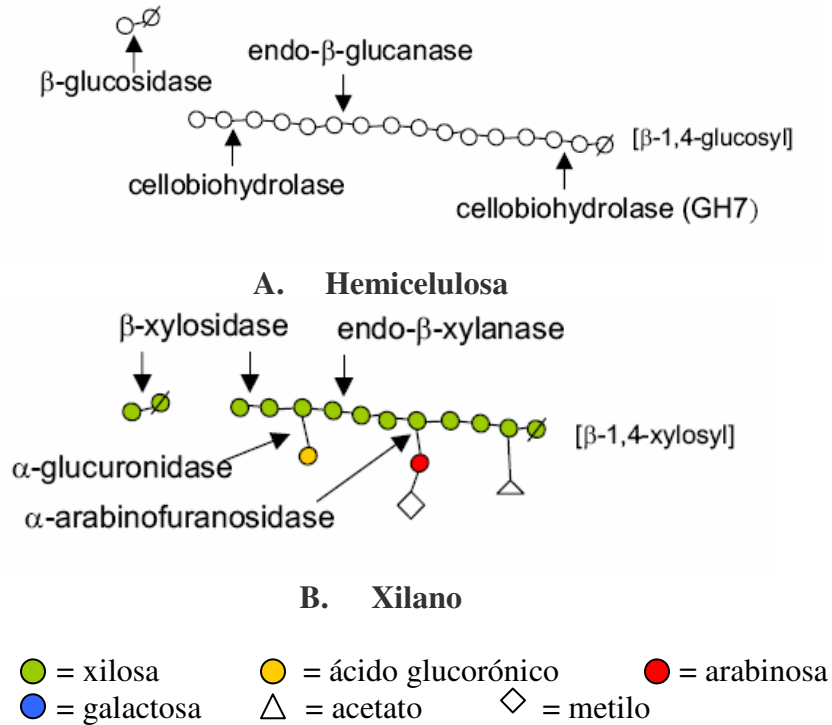


Figura 11. Sitios de ataque enzimático

La conversión eficaz de material del lignocelulósico a azúcares fermentables es necesaria, pero requiere condiciones extremas o sistemas enzimáticos que pueden convertir pentosas y hexosas, y además puedan tolerar las condiciones extremas. El uso de celulasas y hemicelulasas termostables, de microorganismos termofílicos para la degradación de material celulósico presenta ciertas ventajas ya que minimiza el riesgo de contaminación y podría habilitar un proceso en un solo paso de hidrólisis enzimática, fermentación, y destilación del etanol formado (Turner et al , 2007)

La β -xilosidasa es utilizada para la hidrólisis de compuestos amargos de la uva durante el extracto de jugo y liberación de aroma en la industria del vino. Además de ello ejerce acción sinérgica con las endoxilanasas, y tienen gran aplicación en la producción de biocombustibles y en el procesamiento de alimentos. Así también, las celulasas y xilanasas tienen un papel importante reduciendo la utilización de cloro y dióxido del cloro en la industria del papel (Rajoka, 2005).

CAP III. JUSTIFICACION

El presente estudio esta dirigido, al aislamiento de cepas termófilas anaeróbicas productoras de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, como potenciales fuentes de producción de dichas enzimas, a través de técnicas tradicionales y no tradicionales. Además se pretende contribuir a los procesos de biorremediación utilizando como fuente de carbono, para los cultivos primarios, residuos agroindustriales como ser paja de trigo y melaza de caña como desecho de las plantas azucareras.

Como ya se había mencionado existe gran interés en aislar, caracterizar e identificar el 99% restante de la diversidad microbiana ya estudiada; por lo que, en este trabajo se pretende lograr el cultivo de BVNC termófilas anaerobias con el fin de Explotar la Biodiversidad Microbiana como parte del Proyecto ASDI-SAREC.

Para el aislamiento de cepas se realizó de muestras tomadas de regiones en condiciones geotérmicas extremas, como las aguas termales de la región altiplánica de nuestro país. Dicho aislamiento se llevo a cabo mediante técnicas tradicionales como la Técnica de Hungate Modificada en Tubos Roller (Ljungdahl y Wiegel, 1987) y Cultivo Bifásico (Botellas Castañeda); y técnicas no tradicionales como la Técnica de Encapsulación en Alginato de calcio (Smidsrod, y Skjak ,1990).

CAP IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General

✓ Aislar cepas anaerobias termófilas con capacidad de producir celulasas y hemicelulasas, provenientes de la región altiplánica de Bolivia, implicadas en la producción de etanol mediante técnicas de cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales.

2. Objetivos Específicos

✓ Seleccionar consorcios bacterianos capaces de degradar residuos agroindustriales como paja de trigo y melaza de caña.

✓ Seleccionar consorcios bacterianos capaces de crecer en glucosa y xilosa para la producción de etanol.

✓ Estandarizar la Técnica de Encapsulación con Alginato Cálcico para el aislamiento y cultivo de bacterias viables no cultivables.

✓ Seleccionar cepas con actividad celulolítica y hemicelulolítica, con capacidad de producir etanol.

CAP VIII. MATERIALES Y METODOS

1. Determinaciones Analíticas

1.1 Determinación de la Velocidad de Crecimiento

La velocidad de crecimiento se determino a través de la densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Cintra 5.

1.2 Determinación del Consumo de Sustrato

La determinación del consumo de los sustratos utilizados en los medios específicos, glucosa y xilosa se realizo mediante la determinación de azúcares reductores a través de la técnica de DNS. Se establecieron curvas de calibración con cada azúcar a diferentes diluciones.

1.3 Determinación Enzimática

Determinación de celulasas y xilanasas por la técnica de DNS (Jirovetz y Bucchbaver): El método de DNS es utilizado para la determinación de endocelulasas y endoxilanasas y esta basado fundamentalmente en la determinación de presencia de grupos carbonilos libres (C=O), de los llamados azúcares reductores. Se basa en la utilización de ácido 3,5-dinitrosalicílico para producir la oxidación de los azúcares.

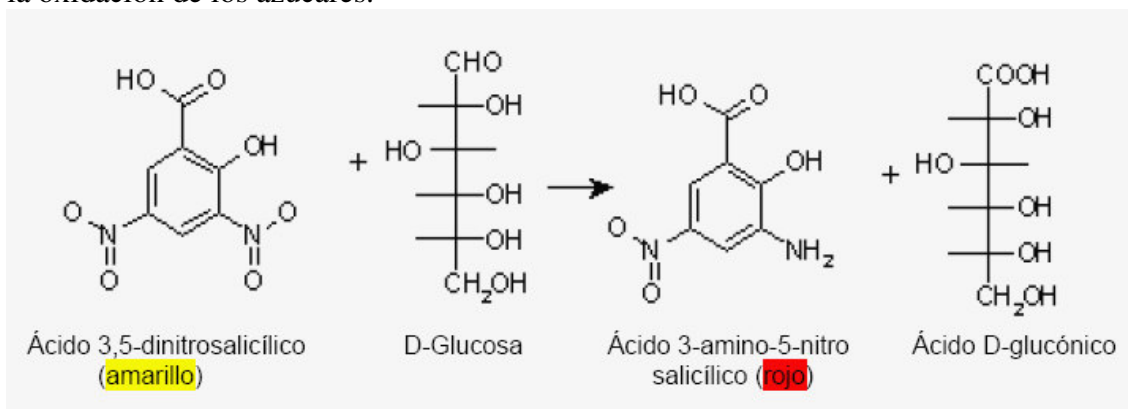


Figura 12. Reacción del ácido dinitrosalicílico, azúcares reductores

El procedimiento consiste en lo siguiente:

	Muestra	Sustrato	Agua	DNS
Blanco		450 uL	50 uL	
Control		450 uL		
Test	50 uL	450 uL		
Incubar a 50° C por 60 min.				
Blanco				750 uL
Control	50 uL			750 uL
Test				750 uL
Incubar a 100° C por 5 min.				

Dejar enfriar a temperatura ambiente

Leer al espectrofotómetro 540 nm. Para determinar la concentración se interpolaron los datos obtenidos, en la curva de calibración (Anexos). Los datos obtenidos se llevaron a UI/mL, según el tiempo de incubación y el sustrato utilizado.

1.4 Determinación de β -D-glucosidasa y β -D-xilosidasa

Este método determina las exocelulasas y exoxilanasas y principalmente se define como: la unidad enzimática β -D-glucosidasa y β -D-xilosidasa es expresada como la capacidad de liberar un μ mol de p-nitrofenol por minuto bajo condiciones estandarizadas. (Therese Hansson, 2003)

Para esta técnica se deben mezclar: 50 mM buffer citrato (0.5 mL), con 2.8 mM sustrato (0.46 mL) y 40 uL de la muestra (0.040 mL), para un volumen final de 1 mL, esta mezcla se debe incubar a 80°C por 60 minutos. Una vez enfriada a temperatura ambiente la lectura se debe realizar a una longitud de 405 nm.

Se debe realizar una curva de calibración con p-nitrofenol a un pH y una longitud de onda determinada, para luego interpolar los datos obtenidos en la curva y posteriormente expresarlos en UI/mL, tomando en cuenta el tiempo de incubación.

1.5 Determinación de Proteínas Totales

La determinación de proteínas se realizó según la técnica de Lowry (1999), usando albúmina sérica bovina como estándar.

El procedimiento para esta determinación es:

	Muestra	Reactivo A	Agua
Blanco		1000 uL	100 uL
Test	100 uL	1000 uL	
Mezclar e incubar a 37° C por 20 min.			
Añadir 100 uL del Reactivo B			
Mezclar e incubar a 37° C por 20 min.			
Leer a 660 nm.			

Para la interpretación de los datos estos se deben extrapolar en una curva de calibración realizada con albúmina sérica bovina (Anexos).

1.6 Determinación de la Producción de Etanol

La determinación de etanol se realizó en la fase gaseosa mediante Cromatógrafo de Gases Clarus 500, se utilizó la columna Elite 1, bajo las siguientes condiciones: el horno a una temperatura de 80° C, la temperatura de inyección a 200° C, utilizando el detector FID a una temperatura de 250° C (Alvarez *et al.* 2006).

Se evaluó la producción de etanol ya que este es un metabolito primario por lo que nos da una referencia del crecimiento, además de ello este es uno de los productos en los que las enzimas estudiadas están implicadas, y finalmente tomando en cuenta que los cultivos crecen a una

temperatura de 60 °C el etanol se encuentra en fase gaseosa, por lo que es factible en cuanto a su detección empleando Cromatografía de Gases

El volumen de inyección tanto de los estándares como de las muestras fue de 500 uL de gas, éste fue colectado con jeringas de vidrio.

Para la detección de etanol en fase gaseosa se preparó una serie de estándares de etanol absoluto a diferentes concentraciones, las diluciones fueron realizadas con agua destilada que fueron llevados a la misma temperatura de incubación de los cultivos, con los datos obtenidos se construyó una curva de calibración, en la cual se puede determinar según el área de los picos, la concentración de etanol resultante.

2. Toma de Muestras y Condiciones de Cultivo

Se colectaron muestras de agua, lodo y tierra de ambientes geotérmicos de la región altiplánica de Bolivia, cuya condición climática es extrema, considerando en cada toma la presencia de materia orgánica en descomposición.

Tabla 3. Muestras colectadas, IIFB 2007

Muestra	ORIGEN
0B	Aguas Termales Capachos
1K	Aguas Termales Viscachani
2K	Aguas Termales Viscachani
3K	Aguas Termales Viscachani
4K	Aguas Termales Viscachani
5K	Aguas Termales Viscachani
1B	Aguas Termales Capachos
2B	Aguas Termales Capachos
3B	Aguas Termales Capachos
6K	Aguas Termales Capachos
A 10	Laguna Chaiviri
Lsc	Sol de mañana

Se tomó 2 mL de aguas termales que fueron inoculados en viales de 100 mL de capacidad con 80 mL de medio basal mineral, e incubados a una temperatura de 60° C, por el lapso de 7 – 8 días.

El medio basal mineral (Medio 11) contiene Solución 1 10ml/L (g/L): 100 NH₄Cl; 10 NaCl, 10 MgCl₂.6H₂O , 5 CaCl₂H₂O, 200 K₂HPO₄•3 H₂O; Solución 2 1ml/L (g/L): 1.5 FeCl₂.4H₂O, 0.006 H₃BO₃, 6.5 mL HCl 25%, 0,12 CoCl₂.6H₂O, 0,1 MnCl₂.4H₂O, 25 Na₂MoO₄.2H₂O, 25 NiCl₂.6H₂O, 70 ZnCl₂ , 0,0015 CuCl₂.2H₂O, 0,0003 Na₂SeO₃, 0,5 NaOH; Solución 3 30 mL/L (g/L): 85 NaHCO₃; el medio fue suplementado con solución de Vitaminas 10mL/L (Biotina 1 mg, PABA 5 mg, B12 5 mg, Tiamina 10 mg, csp 1000 mL), como agente reductor se utilizó sulfuro de sodio (solución 10 %), 2 mL/L (Anexo...); y como fuente de carbono (10 - 20 %) se utilizaron residuos agroindustriales como ser paja de trigo y melaza de caña.

El pH fue ajustado a 7.2; estableciendo cálculos para la proporción de paja de trigo y melaza de caña se tuvo que eran necesarios 1,6 gramos de paja de trigo; y 1,6 mL de melaza de caña para 80 mL de medio. La materia cruda fue esterilizada dos veces utilizando autoclave, a una presión de 1,5 atm a 120 °C por 15 minutos, para evitar cualquier contaminación que podría llevar la materia consigo misma.

Una vez seleccionados aquellos consorcios capaces de hidrolizar la paja de trigo y/o melaza se cultivaron en medios más específicos que contenían glucosa 0,5 % y xilosa 0,5 % como fuente de carbono en el mismo medio basal mineral (Medio 11).

Para crear un ambiente de anaerobiosis, el aire existente en los viales fue remplazado por gas nitrógeno antes de la inoculación de acuerdo a la técnica de Hungate modificada.

3. Selección de Consorcios Termófilos Hidrolíticos con capacidad de Producción de Etanol

Se cultivaron los consorcios de las muestras recolectadas dándoles como única fuente de carbono paja de trigo y melaza de caña, siendo este el parámetro que nos indicó que los cultivos que presentaron desarrollo microbiano (incremento de la biomasa) tenían la capacidad de hidrolizar esta materia prima hasta moléculas más sencillas y utilizarlas como fuente de carbono para su desarrollo. Además la producción de etanol fue determinada por cromatografía de gases.

4. Aislamiento Primario a través de las Técnicas Tradicionales y no Tradicionales

El Medio mineral basal fue utilizado para el cultivo primario de enriquecimiento con paja de trigo y melaza de caña como fuente de carbono. Se repicó en medios con glucosa y xilosa y una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a inocular en medios sólidos para el aislamiento primario aplicando técnicas tradicionales y no tradicionales

Para las técnicas de aislamiento tradicionales: Roller-tubes y Cultivo bifásico, se utilizó el mismo medio mineral basal, usando como solidificante agar-agar al 3%, tomando en cuenta que la temperatura de cultivo fue 60°C.

Para el método no tradicional se utilizó alginato de mediana viscosidad al 1,5 %, mezclado con una suspensión bacteriana previamente diluida, en una proporción de 10:1, y posteriormente dispersado sobre una solución de cloruro de calcio al 1,5 %. Para rosear o dispersar la mezcla de alginato y bacterias se usó jeringas con agujas 27G. La formación de las perlas se favoreció gracias a una constante agitación con agitador magnético a 12 revoluciones por minuto (r.p.m.) por un tiempo aproximado de 2 horas. Posteriormente cada perla fue transferida en condiciones anaeróbicas (trabajo dentro de cámara de anaerobiosis) a medio mineral basal líquido con glucosa o xilosa como fuente de carbono.

CAP IX. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Selección de Consorcios Anaerobios Termófilos Hidrolíticos con capacidad de producción de Etanol

Una vez que las muestras crecieron en medio mineral con fuente de carbono paja de trigo y melaza de caña (ver Anexo 1), se realizó una primera selección para determinar aquellos consorcios con capacidad hidrolítica (Tabla 4), a través de la determinación de las actividades carboximetil celulasa y endoxilanasas.

Tabla 4. Consorcios anaerobios termófilos hidrolíticos de acuerdo a su capacidad de expresión de actividades Carboximetil celulasa y endoxilanasas, IIFB 2007

Consorcio	Origen	Actividades enzimáticas UI/mL	
		CMCasa	Endoxilanasas
Paja de trigo			
0B	Aguas Termales Capachos	0,03	0,1
1K	Aguas Termales Viscachani	0,09	0,12
2K	Aguas Termales Viscachani	0,09	0,08
3K	Aguas Termales Viscachani	0,48	0,29
4K	Aguas Termales Viscachani	0,15	0,01
5K	Aguas Termales Viscachani	0,12	0,4
1B	Aguas Termales Capachos	-	0,07
2B	Aguas Termales Capachos	0,1	0,61
3B	Aguas Termales Capachos	0,13	0,87
6K	Aguas Termales Capachos	0,05	0,41
A 10	Laguna Chaiviri	0,09	0,45
Lsc	Sol de mañana	0,08	0,44
Melaza de caña			
0B	Aguas Termales Capachos	-	0,05
1K	Aguas Termales Viscachani	0,31	0,11
2K	Aguas Termales Viscachani	0,33	0,08
3K	Aguas Termales Viscachani	0,49	0,06
4K	Aguas Termales Viscachani	0,46	0,1
5K	Aguas Termales Viscachani	0,38	0,07
1B	Aguas Termales Capachos	0,4	0,03
2B	Aguas Termales Capachos	1,03	-
3B	Aguas Termales Capachos	-	-
6K	Aguas Termales Capachos	0,26	0,12
A 10	Laguna Chaiviri	0,54	-
Lsc	Sol de mañana	0,39	-

Se han desarrollado varios procesos para la producción de celulasas provenientes de hongos tales como *Neocallimastix frontalis*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum* y *Phanerochaete chrysosporium*, entre los más importantes. Pero los estudios de enzimas celulasas de bacterias es más escaso, salvo algunos informes acerca de *Bacteroides succinogenes*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermocopraie*, *Acetovibrio cellulolyticus* y *Cellulomonas fimi*. Se sabe que las celulasas bacterianas tienen actividades bastante altas y más termoestables

comparadas con las celulasas fúngicas (D. Swaroopa Rani *et al.*, 2004). Es así, que en este trabajo se ha seleccionado aquellos consorcios bacterianos que mayor actividad celulolítica, y/o xilanolítica presentaron, de un total de 24 consorcios crecidos en paja de trigo y melaza de caña se seleccionaron 10 consorcios (Tabla 5). Siendo el consorcio 2B el que mostró mayor actividad con 1 UI/mL de actividad CMCasa, y el consorcio 3B con una actividad endoxilanolítica de 0.9 UI/mL, aproximadamente.

Tabla 5. Consorcios anaeróbicos termófilos hidrolíticos seleccionados de acuerdo a su capacidad de expresión de actividades CMCasa y endoxilanolítica, IIFB 2007

Conorcios	Actividad Enzimática UI/mL	
	CMCasas	Endoxilasas
<i>Paja de trigo</i>		
3K	0,2	0,3
3B	0	0,9
A10	0,3	0,5
Lsc	0	0,4
<i>Melaza de caña</i>		
3K	0,2	0,1
4K	0,1	0,1
6K	0,2	0,1
A10	0,2	0
2B	0,5	0
Lsc	0,5	0

Las bacterias anaerobias han demostrado ser productoras de etanol es así que el *Clostridium thermocellum*, bacteria anaeróbica es capaz de convertir la celulosa directamente en etanol. La degradación de celulosa se lleva a cabo por un sistema extracelular de celulasas denominado celulosoma (CANMET Energy Technology Centre, 2004).

Con el fin de dar una aplicación a las enzimas estudiadas se ha evaluado la capacidad de producción de etanol, (Tabla 6) tomando en cuenta que estas enzimas están directamente relacionadas con este metabolito primario, (Capítulo VI) las enzimas celulolíticas y xilanolíticas permiten obtener azúcares más fácilmente fermentables para la obtención de etanol, mediante fermentación alcohólica. Es por eso que de las cepas seleccionadas se determinó la producción de etanol en su fase gaseosa. Es así, que los consorcios FT3 y 2B fueron los que demostraron mayor producción de etanol 0.5 g/L.

Tabla 6. Producción de etanol y expresión de actividad CMCasa y endoxilanolítica en consorcios microbianos anaerobios termófilos seleccionados, IIFB 2007

MUESTRA	SUSTRATO	Etanol g/L	Actividades Enzimáticas UI/L	
			CMCasa	Endoxilanasas
A 10	Paja de trigo	0,01	0,33	0,45
Lsc	Paja de trigo	0,01	0,00	0,44
FT 3	Paja de trigo	0,05	1,12	0,55
4K	Melaza	0,01	0,11	0,10
A10	Melaza	0,02	0,17	0,00
2B	Melaza	0,05	0,53	0,00
Lsc	Melaza	0,03	0,46	0,00

Aunque se sabe que los hongos son mas estudiados, ya que tienen la capacidad de excretar las celulasas al medio y así ser aisladas del medio de cultivo así como del micelio, las bacterias no excretan celulasas al medio, pero se adhieren a las fibras de celulosa para digerirlas, dando así una ventaja en cuanto al crecimiento. Así también se sabe que en los ambientes anaeróbicos la celulosa es degradada por eubacterias meso y termofílicas, por ejemplo *Clostridium thermocellum*.(Carrillo, 2003)

2. Determinación de la Actividad Enzimática específica de consorcios Anaerobios Termófilos de acuerdo a su cultivo en Medio basal Mineral con CMC, Xilano y Almidón como fuentes de carbono

Una vez seleccionados los dos mejores consorcios: 2B y FT3 se determinó la actividad enzimática celulolítica, xilanolítica y amilolítica, utilizando sustratos más específicos como ser CMC, xilano, almidón; es así que se determino la producción de dichas enzimas en el tiempo.

En la figura 13 se observa que las actividades endoxilanolíticas y endoglucanolíticas no son significativas. Sin embargo la actividad celulolítica llega hasta 0,45 UI/mL a las 100 horas aproximadamente. Esto puede deberse a que en la composición de la paja de trigo (Capitulo VI) se tiene mayor porcentaje de celulosa y menor cantidad de hemicelulosa.

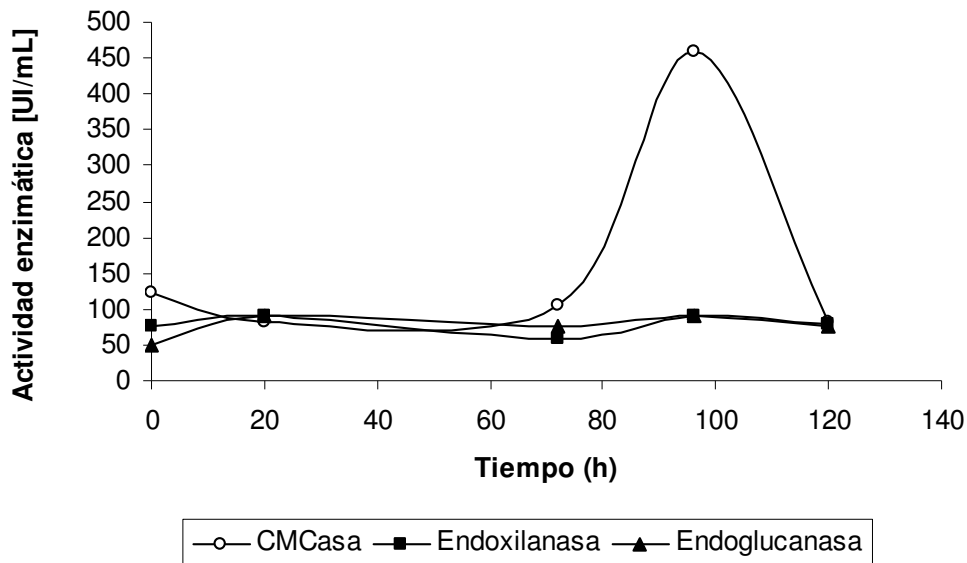


Figura 13. Actividad CMCasa, endoxilanasas y endoglucanasas del consorcio 2B crecido en paja de trigo, I.I.F.B. 2007

Sin embargo en la figura 14, se observa que el consorcio 2B desarrolla actividades tanto CMCasa, endoxilanasas y endoglucanasas, en comparación a las actividades del consorcio crecido en paja de trigo como sustrato, si bien la cantidad de celulosa y hemicelulosa de la melaza de caña es semejante al de la paja, éstos se encuentran de forma disuelta por lo que facilita la utilización de los mismos, mientras que en la paja de trigo éste cuenta con cierto porcentaje de

ligninas que podría ser la razón por la que se impide el uso directo de la celulosa y hemicelulosa, además de que las bacterias deben adherirse al sustrato sólido primero por lo que su tiempo de adaptación también es más prolongado.

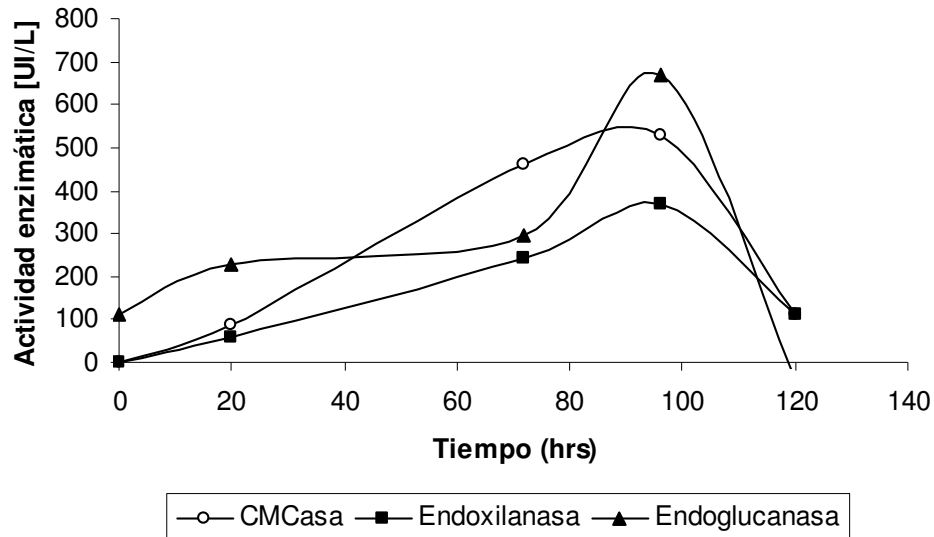


Figura 14. Actividad CMCasa, endoxilanasas y endoglucanasas del consorcio 2B crecido en melaza, I.I.F.B. 2007

En la figura 15, la actividad celulolítica del consorcio 2B crecido en CMC es semejante a la actividad mostrada con el sustrato paja de trigo, se esperaba una mayor actividad ya que este sustrato además de ser específico esta de forma disuelta, esto puede deberse a que las enzimas celulolíticas del consorcio necesitan de algún inductor para expresarse y no sólo afecta el hecho de que el sustrato se encuentre disuelto en el medio. Como inductor se podría añadir un pequeño porcentaje de glucosa para facilitar su crecimiento y así también la utilización del sustrato.

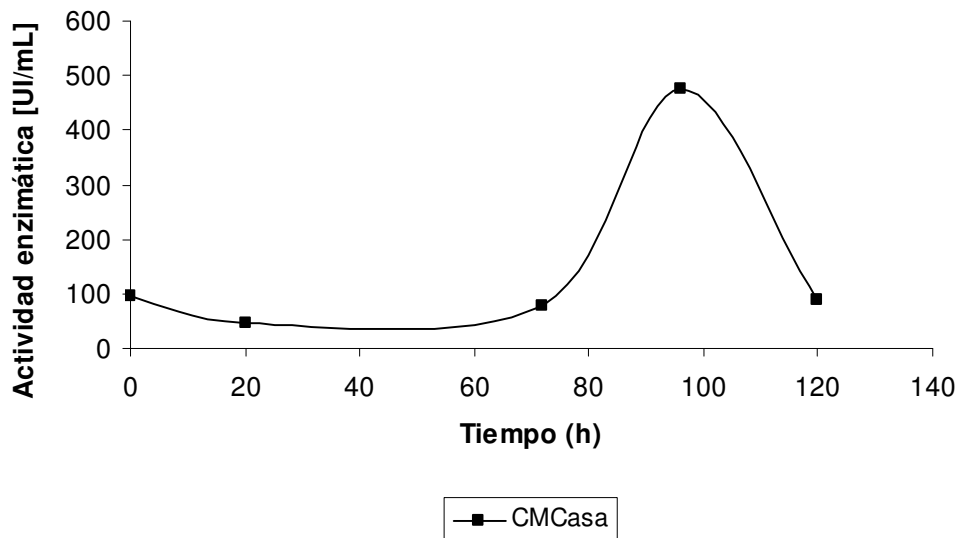


Figura 15. Actividad celulolítica, del consorcio 2B crecido en Carboximetil- celulosa, I.I.F.B. 2007

La actividad endoxilanasas, observada en la figura 16, es menor que la que muestra el consorcio 2B cultivado con melaza de caña como sustrato, tal vez habría que considerar que como éste es un sustrato específico no permitió la expresión de otras enzimas glucanasas, mientras el cultivo en melaza de caña al desarrollar las actividades CMCasa, endoxilanasas y endoglucanasas permitió un sinergismo entre éstas por lo que su actividad se ve incrementada.

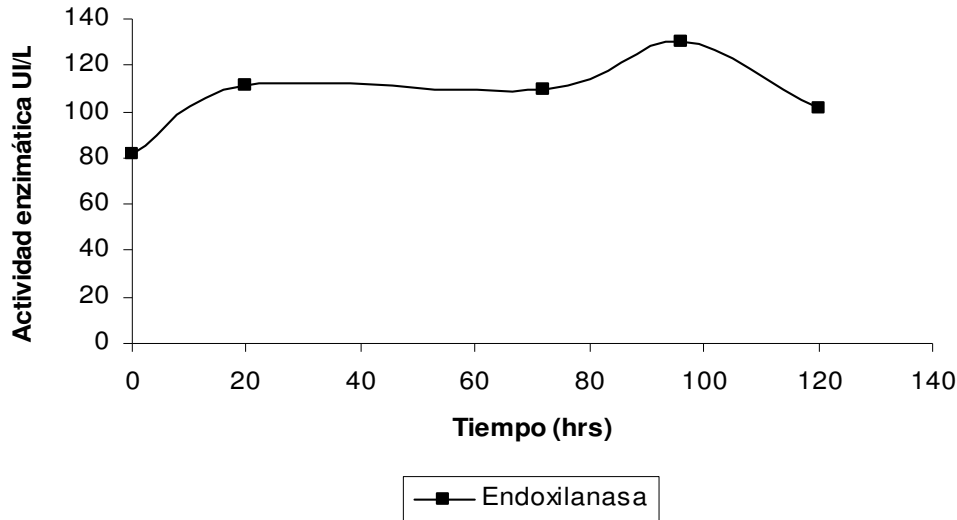


Figura 16. Actividad endoxilanasas, del consorcio 2B crecido en Xilano, I.I.F.B. 2007

Según los datos obtenidos el consorcio 2B presenta mayor actividad CMCasa, endoxilanasas y endoglucanasas en los diferentes sustratos aproximadamente a las 100 horas, en todos los casos, por lo que se puede deducir que el crecimiento del consorcio llega hasta ese tiempo y luego entra en fase estacionaria. Así también este consorcio mostró mayor actividad enzimática con el sustrato melaza de por lo que este será el criterio para su selección.

3. Cinética de Crecimiento, Consumo de sustrato y producción de Etanol de los consorcios 2B y FT3 crecidos en Glucosa y Xilosa

En una tercera fase se ha enfocado en determinar el crecimiento del consorcio por lo que se midió la producción de etanol, es así que se ha realizado una curva de crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de los consorcios seleccionados 2B y FT3 en medio suplementado con glucosa y xilosa.

Como ya se había mencionado el etanol puede producirse mediante reacciones biológicamente catalizadas (Johansson, 1993), ya que diversos azúcares pueden ser fermentados a etanol por enzimas de distintos microorganismos tales como levaduras o bacterias (CANMET Energy Technology Centre, 2004).

En la figura 17 se observa que la producción de etanol acompaña al crecimiento del consorcio, debido a que este es un metabolito primario, por otro lado el consumo de sustrato va directamente relacionado con el crecimiento, en tanto que a mayor crecimiento hay mayor consumo de sustrato. La mayor producción se alcanzó a las 27 horas con 0.25 g/L de etanol.

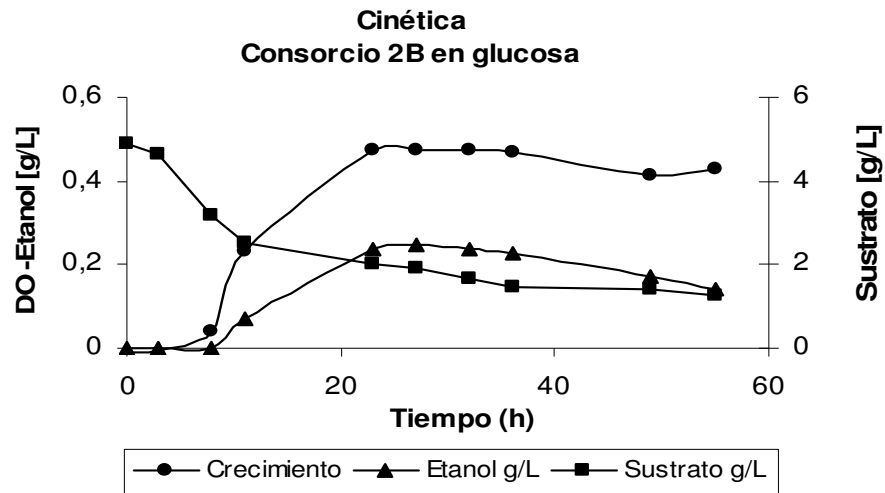


Figura 17. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol del consorcio 2B inoculado en medio con glucosa, I.I.F.B. 2007

El consorcio 2B en xilosa (Figura 18) tiene menor producción de etanol comparada con el consorcio cuando crece en glucosa, llegando a obtener 0.09 g/L de etanol a las 36 horas, mientras que el tiempo de crecimiento llega un máximo a las 24 horas. Sin embargo la producción de etanol del consorcio crecido en glucosa es menor en comparación que cuando se suplementa con xilosa. También se observa que no existe un buen consumo de sustrato por lo que la producción no es alta.

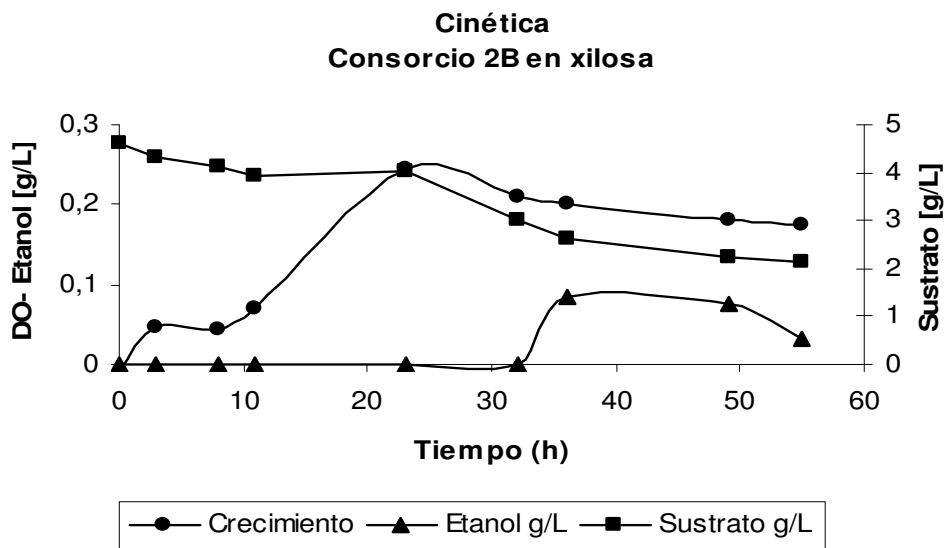


Figura 18. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol del consorcio 2B inoculado en medio con xilosa, I.I.F.B. 2007

La figura 19 muestra que en el consorcio FT3, la producción de etanol acompaña el crecimiento con una producción de 0.24 g/L a las 24 horas. Así también se observa que no se llega a

consumir el sustrato por completo, es posible que exista un inhibidor o se produzca alguna toxicidad por la que el crecimiento del consorcio se detenga y deje de producir etanol.

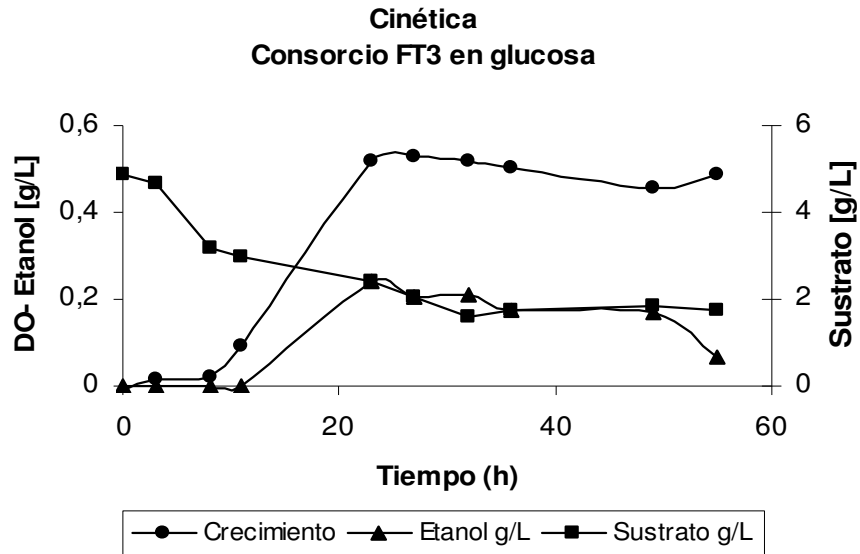


Figura 19. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol del consorcio FT3 crecido en glucosa, I.I.F.B. 2007

En la Figura 20 se muestra que al igual que el comportamiento mostrado con el consorcio 2B existe menor producción de etanol cuando el medio es suplementado con xilosa como fuente de carbono, en este caso se tiene una producción máxima de 0.09 g/L de etanol aproximadamente a las 39 horas. Así también el sustrato no llega a consumirse por lo que el consorcio al parecer carece del sistema enzimático para la utilización de xilosa como fuente de carbono.

Por otro lado se sabe que cuando un medio está suplementado con xilosa altas concentraciones se puede inhibir el crecimiento y por ende la producción de etanol.

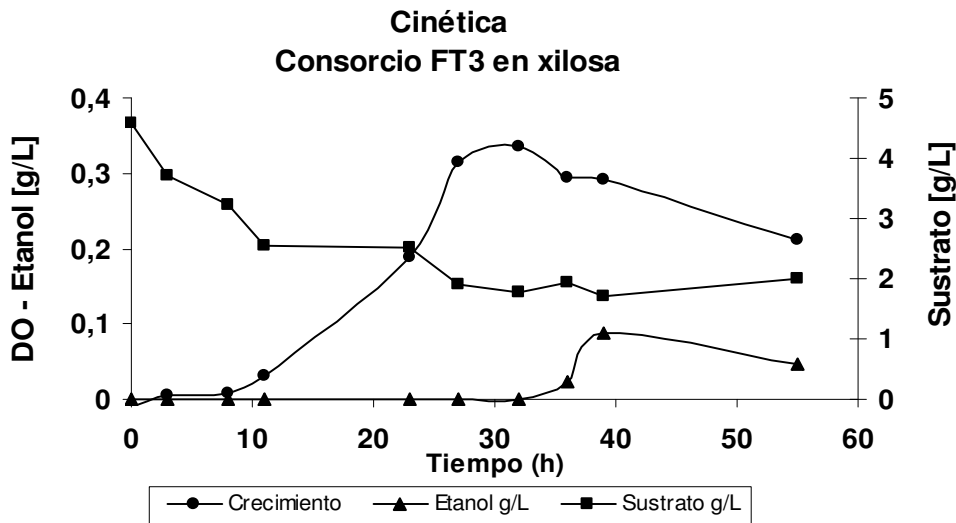


Figura 20. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol del consorcio FT3 crecido en xilosa, I.I.F.B. 2007

Se ha determinado los parámetros de crecimiento, consumo y producción de los consorcios 2B y FT3 (Tabla 7), teniendo el consorcio 2B crecido en glucosa una velocidad de crecimiento (μ) de 0.1335 h^{-1} , es decir que en este consorcio la duplicación es de 0.13 bacteria por hora, mientras que el consumo de sustrato (q_s) es de 0.264 g de glucosa por hora, siendo de esta manera el rendimiento de producción de 0.481 g/L de etanol por cada gramo consumido de glucosa. El mismo consorcio pero crecido en xilosa presenta una velocidad de crecimiento de 0.1106 h^{-1} , esta velocidad es menor en relación al anterior, mientras que el consumo de sustrato fue de 0.114 g de xilosa consumida por hora, y el rendimiento de producción mostró un valor de 0.319 g/l de etanol producido por cada gramo de xilosa consumida.

Tabla 7. Parámetros de crecimiento, consumo y producción, I.I.F.B. 2007

Consortio	Sustrato	μ (h-1)	q_s (g/g h)	Yp/s (g/g)
2B	Glucosa	0,1335	0,264	0,481
2B	Xilosa	0,1106	0,114	0,319
FT3	Glucosa	0,1917	0,098	0,616
FT3	Xilosa	0,1445	0,141	0,125

Para el consorcio FT 3 crecido en glucosa se tiene que la velocidad de crecimiento es de 0.1917 h^{-1} , en este caso no existe relación entre el consumo de sustrato ya que el consorcio muestra que por cada hora consume 0.098 g de glucosa, mientras que el rendimiento es de 0.616 g/l de etanol por gramo de sustrato consumido este valor es bastante alto, el consumo y el rendimiento de producción están relacionados de forma directamente proporcional. Es así, que este consorcio crecido en xilosa presenta una velocidad de crecimiento de 0.14454 h^{-1} , teniendo un consumo de sustrato de 0.141 g de xilosa por hora y el rendimiento de 0.125 g/L de etanol por cada gramo de xilosa consumida.

4. Selección de cepas puras por Métodos Tradicionales y No Tradicionales

4.1 Cultivo Bifásico

Para el cultivo bifásico se inocularon los consorcios 2B y FT3 crecidos en glucosa y xilosa, una vez que se desarrollaron colonias en la fase sólida, éstas fueron aisladas usando un asa, hacia un medio líquido con el sustrato correspondiente. Se seleccionaron las cepas que mayor producción de etanol mostraron, para la determinación de su cinética de crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol. Todo el procedimiento fue realizado en cámara de anaerobiosis

La cepa 2B 1b (Fig. 21) muestra un periodo de adaptación hasta las 24 horas y un punto máximo de producción a las 146 horas con una producción de 0.23 g/L, comparado con el consorcio presenta un periodo de adaptación mas largo y aunque la producción de etanol no es significativamente alta, es mayor y además que muestra mayor estabilidad en el tiempo.

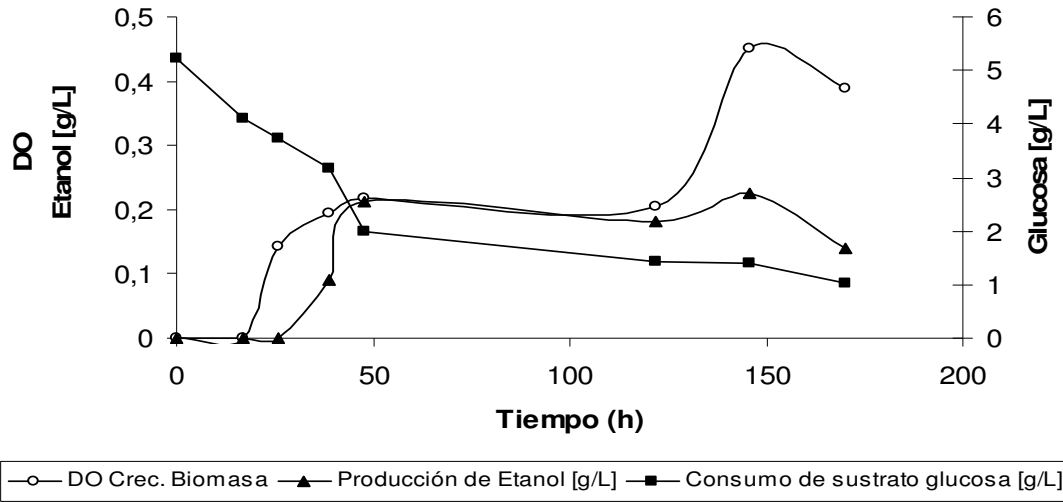


Figura 21. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa 2B-1b crecido en glucosa, I.I.F.B. 2007

Se observa en la figura 22 que la cepa FT3-1b aislada a partir del cultivo bifásico del consorcio FT3 muestra un desarrollo activo hasta las 120 horas, con un máximo de producción de 0.24 g/L de etanol a las 48 horas. Comparando esta producción con la del consorcio es similar pero de mayor estabilidad en el tiempo.

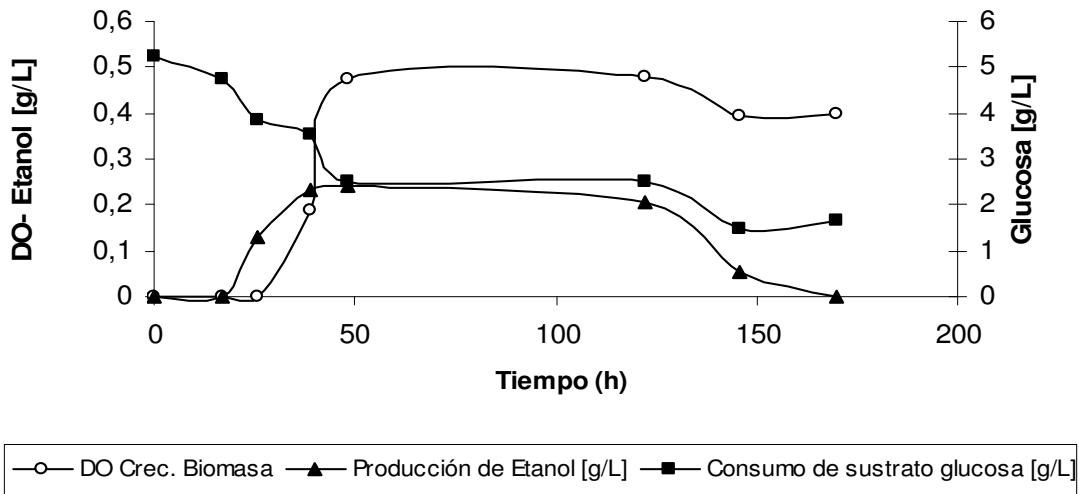


Figura 22. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa FT3-1b crecido en glucosa, I.I.F.B. 2007

La figura 23 correspondiente a la cepa 2B-2b, muestra una producción de 0.06 g/L de etanol a las 122 horas la producción es menor que la del consorcio, y el incremento de su biomasa se da en mayor tiempo. Por otro lado cabe recalcar también que en el consorcio la producción no estaba relacionada con el crecimiento como se observa en esta cepa.

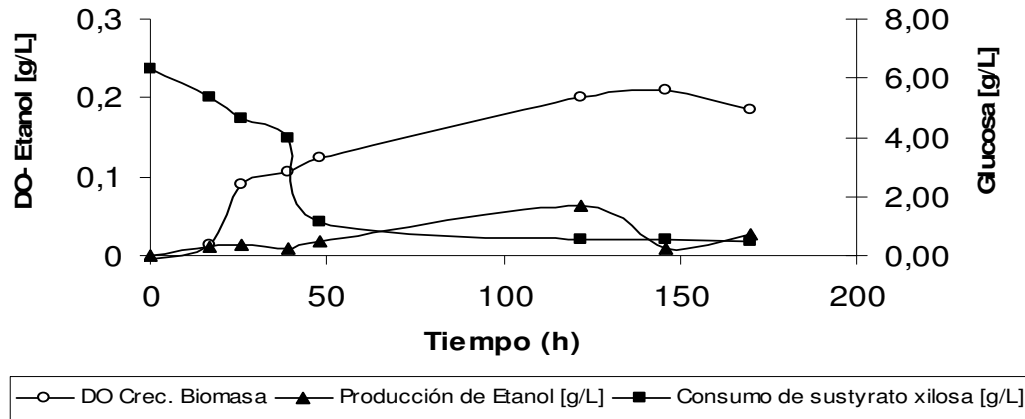


Figura 23. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa 2B-2b crecido en xilosa, I.I.F.B. 2007

En la figura 24 se observa que la producción de la cepa FT3-2b, es significativamente mayor que la del consorcio mostrando 0.25 g/L de etanol a las 122 horas, así también la estabilidad de estas producción es mayor en comparación al consorcio del que proviene.

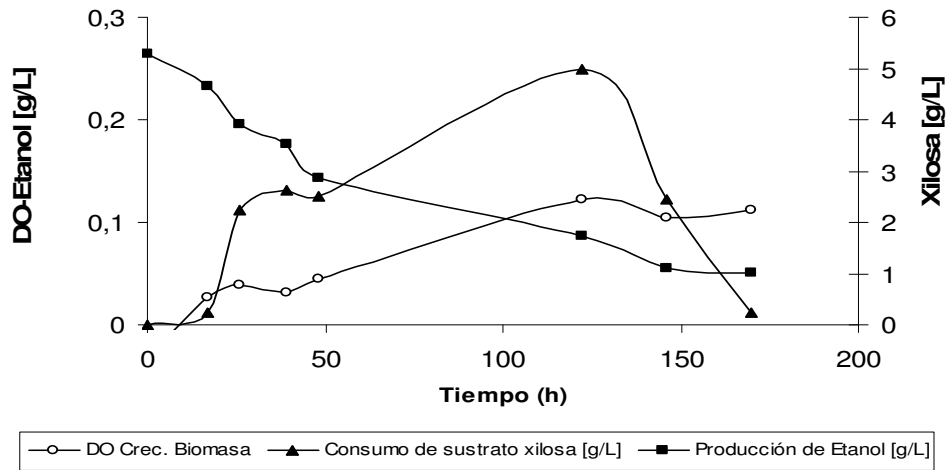


Figura 24. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa FT3- 2b crecido en xilosa, I.I.F.B. 2007

En todos los casos se observa que la producción de etanol es mayor en comparación a los consorcios de los que provienen las cepas, aunque lo mas resaltante es que presentan mayor estabilidad, esto puede deberse a que cuando crecen en forma de consorcio existen cierta competencia por los nutrientes, por lo que existe la probabilidad de que algunas bacterias puedan oxidar el etanol a ácido acético, y éste ser utilizado por las bacterias metanogénicas etanol para la producción de metano, mientras que cuando se tiene cepas etánolicas aisladas, se asegura la producción de etanol así como la estabilidad de éste.

En cuanto a los parámetros de crecimiento, consumo y producción (Tabla 8), la cepa 2B-1 crecida en glucosa se tiene que la velocidad de crecimiento es de 0.009 h⁻¹, el consumo de sustrato por cada hora es de 0.062 g de glucosa, mientras que el rendimiento es de 0.013 g/l de etanol por gramo de sustrato consumido. En la cepa FT3-1 crecida en el mismo sustrato se tiene que la velocidad de crecimiento es de 0.007 h⁻¹, con un consumo de sustrato de 0.065, y un rendimiento de producción de 0.049 g/L de etanol por gramo de sustrato consumido. Las cepas 2B-2 crecida en xilosa muestra mayor velocidad de crecimiento con 0.017 h⁻¹, mayor consumo de sustrato 0.096 gramos de xilosa consumida por hora y el rendimiento del producto es de 0.1 g/L de etanol por gramo de xilosa consumida. Finalmente la cepa FT3-2 presentó una velocidad de crecimiento de 0.014 h⁻¹ ligeramente menor a la anterior cepa crecida en el mismo sustrato, así también el consumo de sustrato es menor con 0.054 gramos de xilosa por hora, pero el rendimiento de producción resulto mayor con 0.132 g/l de etanol por gramo de sustrato consumido.

En todos los casos se observa que las cepas en comparación al consorcio del que provenían la velocidad de crecimiento es mas lenta, el consumo de sustrato es menor y por ende la producción es menor, en relación a los datos obtenidos con los consorcios, esto puede deberse a que estas cepas al parecer necesitaban de la ayuda de otras bacterias presentes en el consorcio para desarrollarse, y sin duda esto se debe a que en el consorcio existía un sinergismo para la producción de etanol.

Tabla 8. Parámetros de crecimiento, consumo y producción, IIFB 2007

Cepa	Sustrato	μ (h ⁻¹)	qs (g/ h)	Yp/s (g/g)
2B-1	Glucosa	0,009	0,062	0,013
Ft3- 1	Glucosa	0,007	0,065	0,049
2b- 2	Xilosa	0,017	0,096	0,105
Ft3- 2	Xilosa	0,014	0,054	0,134

4.2 Técnica en Tubos Roller

Para la técnica de tubos Roller, al igual que en la técnica de cultivo bifásico se tomó como inóculo los consorcio 2B y FT3 crecido en glucosa y xilosa, las colonias desarrolladas en el agar fueron llevadas a un medio liquido con el sustrato correspondiente, las cepas con mayor producción de etanol fueron seleccionadas para la determinación de su cinética de crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol.

En la figura 25 se muestra que la cepa 2B-1r asilada por la técnica de tubos roller, tiene una producción de 0.22 g/L de etanol a las 48 horas el periodo de adaptación es mayor que en el consorcio, la producción es la misma pero existe mayor estabilidad, ya que no existe la presencia de otros gases como metano en el caso del consorcio.

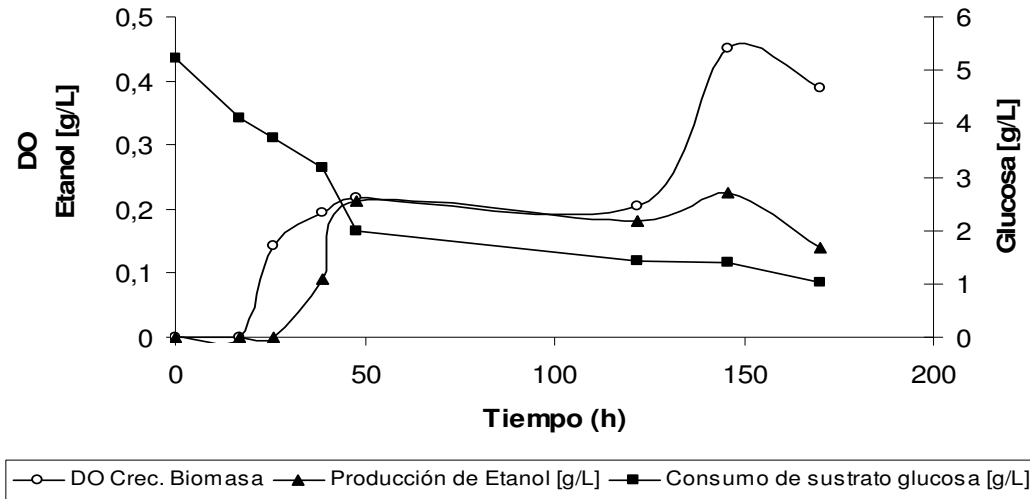


Figura 25. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa 2B-1r crecido en glucosa, I.I.F.B. 2007

En la figura 26 se observa que la cepa FT3- 1r crecida en glucosa tiene un tiempo de adaptación de 24 horas y una máxima producción a las 48 horas con 0.22 g/L de etanol, siendo que el crecimiento entra en fase estacionaria a las 50 horas.

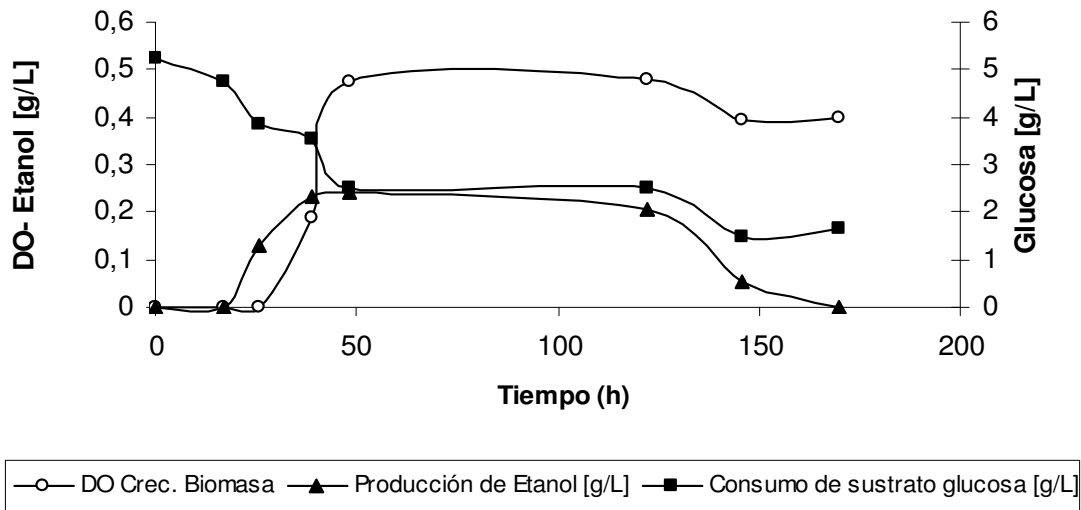


Figura 26. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa FT3-1r crecida en glucosa, I.I.F.B. 2007

Mientras que la cepa FT3 1r crecida en xilosa (figura 27) muestra una menor producción de etanol que cuando crece en glucosa mostrando una producción máxima de 0.08 g/L de etanol, así también el crecimiento y producción se presenta con un pico máximo a las 120 horas, es decir tiene un crecimiento más lento.

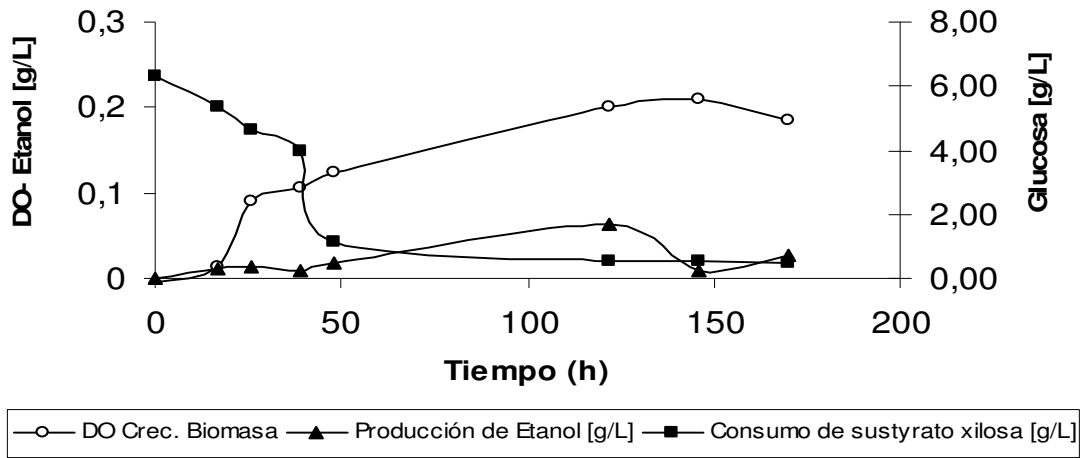


Figura 27. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa FT3-1r crecido en xilosa, I.I.F.B. 2007

En la figura 28 se observa que la cepa FT3 2r, crecida en xilosa, presenta una producción de etanol de 0.23 g/l de etanol a un tiempo de 120 horas aproximadamente, en ese tiempo se muestra que la cepa deja de consumir el sustrato por lo que el crecimiento y la producción también se detiene.

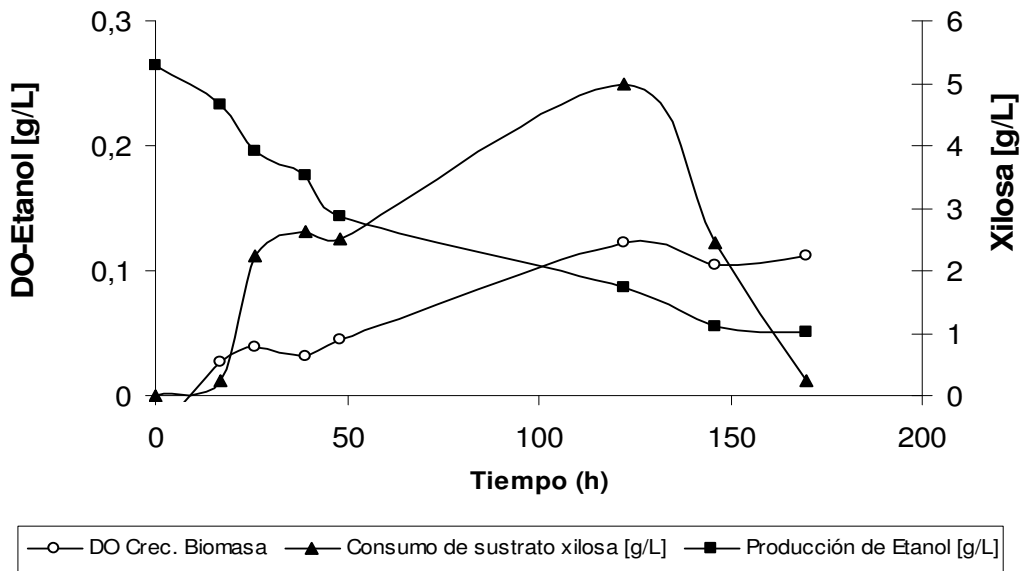


Figura 28. Crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol de la cepa FT3-2r crecido en xilosa, I.I.F.B. 2007

4.3 Encapsulación en Alginato cálcico

Para la técnica de Encapsulación en alginato se realizaron diluciones 10^2 , 10^6 , 10^{12} , tomando en cuenta que el consorcio FT3 crecido en paja de trigo presentaba 96×10^6 UFC/mL, se tomo 0,1 mL de la dilución y se mezcló con 1 mL de alginato sódico con el objetivo de obtener 1 UFC en cada perla formada. Después 2 horas de agitación constante, las perlas formadas fueron llevadas a medio líquido en condiciones de anaerobiosis.

Es así que resultaron 22 perlas de las cuales 16 presentaron producción de etanol (Tabla 8), las restantes presentaron formación de otros gases, se seleccionó la que mayor producción de etanol presentó siendo este de 0.73 g/L de etanol correspondiente a la perla numero 5.

Tabla 9. Producción de Etanol en cepas puras encapsuladas en alginato de calcio del consorcio FT3 crecidos en xilosa, I.I.F.B. 2007

Cepas encapsuladas del consorcio FT3	
Cepa	Etanol g/L
1	0,03
2	0,10
3	0,05
4	0,23
5	0,73
6	0,16
7	-
8	0,17
9	0,28
10	0,10
11	0,01
12	0,23
13	-
14	0,20
15	0,06
16	-
17	0,08
18	0,01
19	-
20	-
21	0,08
22	-

Uno de los métodos más convenientes para la inmovilización celular es el atrapamiento en alginato de calcio, porque esta técnica es simple y barata. El alginato de sodio es de fácil disposición y es un material biológico no tóxico. La inmovilización celular es una de las técnicas comunes por aumentar la concentración celular total y productividad. La separación de productos de las células inmovilizadas es más factible en comparación con los sistemas celulares suspendidos. (Brodelius y Vandamme, 1987; Beshay *et al.*, 2002; Abd-El-Haleem *et al.*, 2003; Usama Beshay, 2003).

La inmovilización de células para la producción de enzimas extracelulares ofrece muchas ventajas entre estas se tiene que puede separarse la masa celular del líquido de cultivo facilitando el funcionamiento continuo, prolongando la productividad (Usama Beshay, 2003). Es así que en este trabajo los datos de producción de etanol, encapsulando las cepas son más altos en comparación con los anteriores métodos (tradicionales). En otros estudios la producción enzimática aumento de 3000 UI/mL de proteasa alcalina a 8000 UI/mL en células inmovilizadas de *Trichoderma turnirae*. Así, la concentración del proteasa alcalina de las células inmovilizadas en alginato era superior en un 176.8% comparadas con su cultivo de células suspendidas (Usama Beshay, 2003).

Así también se tiene a *Pichia stipitis* un hongo que fermenta la xilosa en etanol, y degrada lignina y celulosa para la conversión potencial de biomasa a etanol. Se ha citado la falta de microorganismos de calidad industrial para convertir la biomasa en etanol combustible desarrollando una técnica que permita la producción industrial de etanol (CANMET Energy Technology Centre, 2004).

En la figura 29 se observa el comportamiento de la cepa 5 del consorcio FT3 crecida en xilosa, donde la actividad enzimática β -xilosidasa máxima fue de 4.1 UI/ mL aproximadamente, este dato es comparable con el obtenido en *Klyveromices marxinus* que muestra una producción de 6.8 UI/mL de β -xilosidasa, así también en este caso se observa que la producción de etanol fue alta en relación a los valores obtenidos anteriormente es así que presento un pico máximo de 0.7 g/L de etanol, aunque es te dato no es comparable con los obtenidos con el asilamiento de las técnicas tradicionales, puesto que no corresponden a la misma cepa, nos refiere que con esta técnica se pueden optimizar el rendimiento, ya que como ya se había ,mencionado la producción se incrementa cuando los microorganismos se encuentran inmovilizados.

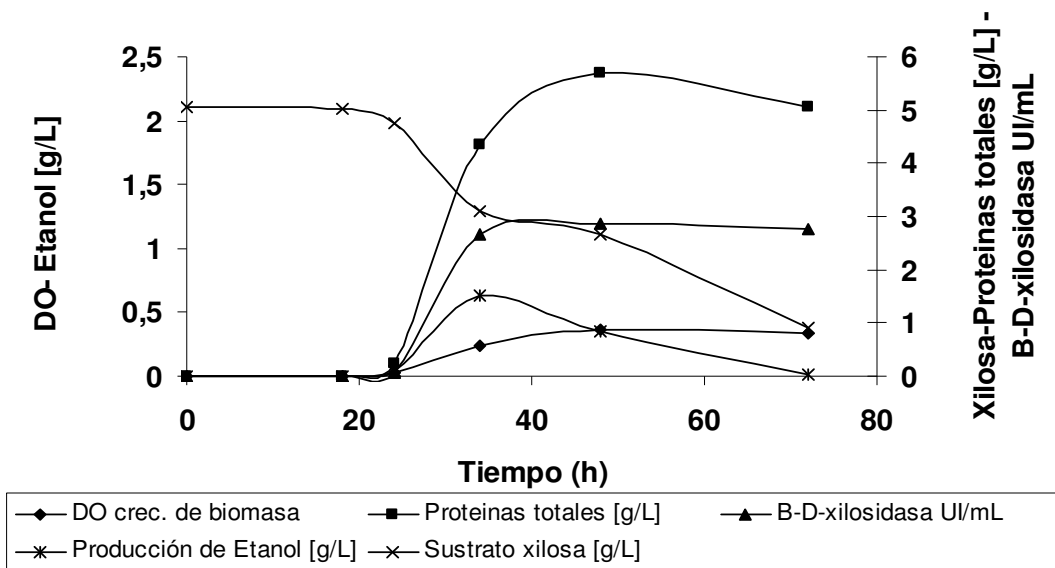


Figura 29. Crecimiento, consumo de sustrato, proteínas totales, β -D-xilosidasa y producción de etanol de la cepa correspondiente a la perla N° 5 crecida en xilosa, I.I.F.B. 2007

CAP X. CONCLUSIONES

En este estudio se ha podido demostrar que los consorcio termófilos son capaces de degradar la paja de trigo y melaza de caña, así mismo uno de los productos finales de esta hidrólisis es el etanol, por lo que los consorcios seleccionados han demostrado producir una actividad enzimática celulolítica de 0.53 UI/L, correspondientes al consorcio 2B crecido en melaza de caña, proveniente de la región de Capachos del Departamento de Oruro, así también su máxima producción de etanol fue de 0.25 g/L; por otro lado el consorcio FT3 crecido en paja de Trigo mostró una producción enzimática celulolítica de 1.12 UI/L y xilanolítica de 0.55 UI/L, con una producción de 0.24 g/L.

Las cepas de mayor producción fueron la cepa FT3-2 crecida en xilosa mostrando un valor de 0.25 [g/L] de etanol aislado mediante cultivo bifásico, y la cepa 2B-1 crecida en glucosa con una producción de 0.22 g/L de etanol aislado mediante la Técnica en Tubos Roller.

En un estudio más específico la cepa FT3-5 asilada a través de la técnica de encapsulamiento en alginato de calcio demostró tener una producción 4.1 UI/mL de β -D-xilosidasa y 0.7 g/L de etanol aproximadamente, siendo así esta la cepa que presentó mayor producción enzimática.

Los valores obtenidos por el método no tradicional fueron más altos comparados con los otros métodos triplicando la producción, es por eso que se concluye que el Método no tradicional de Encapsulamiento en Alginato de calcio es el método más óptimo para el cultivo y aislamiento de cepas anaerobias termofilas productoras de celulasas y hemicelulasas implicadas en la producción de etanol.

Este método tiene como principales ventajas que:

1. Aumenta de la estabilidad de la cepa en este sentido existe un incremento de la biomasa ya que el crecimiento se da sobre un soporte
2. Es posible la reutilización de la cepa encapsulada evitando la contaminación o pérdida y/o muerte de la cepa.
3. Brinda la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada de la bacteria. Estos reactores permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

CAP XI. PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

La composición del polímero alginato le confiere gran utilización en diferentes áreas del medio ambiente la industria y genética, el alginato de sodio es el mayormente utilizado por su alta estabilidad comparada con otros alginatos. Se utiliza en diferentes procesos tales como la preservación de semillas en la agricultura, si también como carriers para el tratamiento de aguas residuales

Este trabajo se ha enfocado en la utilización del alginato de sodio para el aislamiento de cepas mediante encapsulación, sin embargo una de las principales perspectivas para el futuro consiste en:

- Optimizar la técnica de Encapsulación en alginato, como potencial Técnica de aislamiento y cultivo de bacterias anaerobias termófilas.

Así también, se ha visto que si bien existen numerosos trabajos en los que se ha encontrado importantes actividades enzimáticas tanto, celulolíticas como xilanolíticas, estas provienen generalmente organismos mesofílicos, en este trabajo las mayores actividades enzimáticas son comparables con las halladas en otros estudios y tomando en cuenta las condiciones de cultivo estas extremozimas, resultan interesantes por lo que en el futuro se podría realizar:

- Purificación de enzimas, para su uso en la industria

El sistema de encapsulación permite una fácil recuperación en base a este estudio en un futuro se puede enfatizar en la:

- Recuperación del bioetanol, u otros metabolitos secundarios de interés Industrial

Dada las propiedades de encapsulación también otra de las posibilidades que ayudarían a la continuidad de esta investigación resultaría:

- Elaboración de un reactor de lecho fluidizado que permitiría la recuperación de los metabolitos de interés a mayor escala y establecer un nuevo sistema de aplicación para el uso de las enzimas en bulk, es decir que estas pueden usarse sin necesidad de un aislamiento y/o purificación.

REFERENCIAS

1. Adelfo Escalante-Lozada, Guillermo Gosset-Lagarda, Alfredo Martínez-Jiménez y Francisco Bolívar-Zapata. México. Diversity: microbial culture-independent methods of study and biotechnological implications, 2004. Publicado como ENSAYO en *Agrociencia*, 38: 583-592.
2. Ana Sittenfeld, Francisco Hernández-Chavarría, Lorena Uribe-Lorio y Marielos Mora La microbiología y la vida en los extremos. *Revista Colombiana*, 2003
3. Arroyo Miguel. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones
4. Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R. and Shoham, Y. (1998) Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 548–557
5. Bhat y Hazlewood, Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In *Enzymes in farm animal nutrition*. 2001
6. *Biochem. J.* (2005) 385, 581–588 (Printed in Great Britain) 581
7. Birgitte K. Ahring *et al.*. (2001). Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure *Wat. Res.* Vol. 35, No. 10, pp. 2446–2452
8. Blanco Rosa M (2005). Biocatalizadores inmovilizados de interés en Biotransformaciones en el ámbito de tecnología de alimentos. Instituto de Catálisis CSIC *biojournal.net* número 1 / febrero
9. Bourne, Y. and Henrissat, B. (2001) Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 593–600
10. Bullen R.A., Arnot T.C., Lakemanc J.B. and Walsh F.C., *Biofuel cells and their development. Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 2015–2045
11. CANMET Energy Technology Centre (2004). Ethanol: The "Green Gasoline". Retrieved November 2, 2005 from , CANMET Energy
12. Coutinho, P. M. and Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*
13. Gilbert, H. J., Crennell, S. J., Hreggvidsson, G. O. and Nordberg, K. E. (2002) The structure of *Rhodothermus marinus* Cel12A, a highly thermostable family 12 endoglucanase, at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 320, 883–897
14. Davies, G., Henrissat, B. and Svensson, B., eds.), pp. 3–12, The Royal Society of Chemistry, Cambridge

15. D. Swaroopa Rani*, Sharmila Thirumale and Krishna Nand Production of cellulase by *Clostridium papyrosolvens* CFR-703 World Journal of Microbiology & Biotechnology 20: 629–632, 2000
16. E. Campos, A. Bonmatí, M.R. Teira, X. Flotats aprovechamiento energético de lodos residuales y purines. Producción de biogás Jornades tècniques sobre energia. Barcelona Noviembre 2001
17. E. Pennisi. In Industry, Extremophiles Begin to Make their Mark . Science 1997, 276:705-706.
18. Eliel González García. Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas in Vitro. Tesis Doctoral. Universidad Autonoma de Barcelona,2004.
19. Extremophiles 2004 5th International Conference on Extremophiles SEPTEMBER 19 -23, 2004 CAMBRIDGE, MARYLAND
20. FEDNA Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos (2ª ed.). C. de Blas, G.G. Mateos y P.Gª. Rebollar Eds. (2003). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España
21. Flotats, X., Bonmatí, A., Seró, M. (1997). Clasificación de tecnologías de digestión anaerobia. Aplicación en el aprovechamiento energético de residuos ganaderos. 3r curs d'enginyeria ambiental. Aprovechamiento energético de residuos orgánicos. X.Flotsats (ed.). Paperkite edn., Lleida. Pag. 247-267.
22. G. Antranikian, Sr. Extremophilic archaea and bacteria as source of hydrolases of industrial interest .Technical University Hamburg-Harburg, Hamburg, GERMANY
23. Handselman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman, RM (1998) Chem Biol 5:245-249.
24. Henrissat, B. and Davies, G. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Curr. Opin. Struct. Biol. 7, 637–644
25. Hernandez *et al.*. Celulosomas: sistemas multienzimáticos. Revista de la sociedad química de México vol43 n° 3, 4 137-142. 1999
26. Iaz. Jaime Ake Piste,Fernando Peñaranda Ali. Alimentación de cerdos con melaza de caña, Universidad Autonoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Unidad de Posgrado e Investigacion
27. Jornades tècniques sobre energía. Barcelona Noviembre 2001 APROVECHAMIENTO ENERGÉTICO DE LODOS RESIDUALES Y PURINES. PRODUCCIÓN DE BIOGÁS.

28. Kulasingam Thayaananthan Cultivating the uncultured: amylolytic microorganisms from ecological niches. 2005
29. Khademi, S., Zhang, D., Swanson, S. M., Wartenberg, A., Witte, K. and Meyer, E. F. (2002) Determination of the structure of an endoglucanase from *Aspergillus niger* and its mode of inhibition by palladium chloride. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 660–667
30. Kim, J. S., Lee, Y. Y. and Torget, R. W. (2001) Cellulose hydrolysis under extremely low sulfuric acid and high-temperature conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91–93,
31. Koonin EV, Wolf YI, Karen GP (2002) *Nature* 420:218- 223.
32. M.J.J. Litjens, K Quyenle, AJJ Straathof, JA Jongejar, JJ Heijnen. (2001) Diffusion limitation causes decreased enantioselectivity of esterification of 2-butanol by immobilized *Candida antarctica* B Lipase. *Biocatalysis and Biotransformation* 19, 1-19
33. Manuel Ferrer Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables(2005).
34. Manuel Tena Aldave, Jesús V. Jorrín Novo. Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Córdoba
35. Miguel Calvo, Bioquímica de los alimentos. Alginato.
36. Ogawa J, Shimizu S (1999) *Trends Biotechnol* 17:13-21.
37. Óscar Julián Sánchez Y Carlos Ariel cardona Producción biotecnológica de alcohol Carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas
38. P. L. Rogers, Y. J. Jeon and C. J. Svenson (2005). Application of biotechnology to industrial sustainability *Trans IChemE, Part B, Process Safety and Environmental Protection*, 83(B6): 499–503
39. Pernilla Turner, Gashaw Mamo and Eva Nordberg Karlsson* Potential and utilization of Thermophiles and thermostable enzymes in biorefining *Microbial Cell Factories* 2007, 6:9
40. Posada *et al.* , Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas de un manantial termomineral de Paipa (Boyacá) *Revista Colombiana de Biotecnología* Vol. VI No. 2 Diciembre 2004 90-100
41. Rabinovich ML: Ethanol production from materials containing cellulose: The potential of Russian research and development. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2006, 42:1-26.
42. Rajoka Muhammad Ibrahim Hyper-production of a thermotolerant β -xylosidase by a deoxy-D-glucose and cycloheximide resistant mutant derivative of *Kluyveromyces marxianus* PPY 125 *Process Biotechnology* Vol. 8 No. 2, Issue of August 15, 2005 .

43. Ramírez y Juana Maria Cocha. Degradación enzimático de celulosa por actinomicetos termófilos aislamiento caracterización y determinación de la actividad celulolítica pablo Rev. peru.biol.10 (1); 67-77 (2003)
44. Ruminot, C. *et al.*. Encapsulación de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas antagonistas en contra de *Listeria monocytogenes*
45. Therese Hansson and Patrick Adlercreutz Optimization of Galactoligosaccharide production from lactose using B- glycosidases from Hyperthermophiles. Food Biotechnology 2:15,2001
46. Sandgren, M., Gualfetti, P. J., Shaw, A., Gross, L. S., Saldajeno, M., Day, A. G., Jones, T. A. and Mitchinson, C. (2003) Comparison of family 12 glycoside hydrolases and recruited substitutions important for thermal stability. Protein Sci. 12, 848–860
47. Sandgren, M., Shaw, A., Ropp, T. H., Wu, S., Bott, R., Cameron, A. D., Stahlberg, J. Mitchinson, C. and Jones, T. A. (2001) The X-ray crystal structure of the Trichoderma reeseifamily 12 endoglucanase 3, Cel12A, at 1.9 Å resolution. J. Mol. Biol. 308, 295–310
48. Sriamornsak P, Sungthongjeen S. Modification of Theophylline Release With Alginate Gel Formed in Hard Capsules structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy. . AAPS PharmSciTech. 2007; 8(3)
49. Sulzenbacher, G., Mackenzie, L. F., Wilson, K. S., Withers, S. G., Dupont, C. and Davies, G. J. (1999) The crystal structure of a 2-fluorocellotriosyl complex of the *Streptomyces lividans* endoglucanase CelB2 at 1.2 Å resolution. Biochemistry 38, 4826–4833
50. Terry I. Miller and M. J. Wolin, A Serum Bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivating Obligate Anaerobes. Applied Microbiology, May 1974, p. 985-987, Vol. 27, No. 5
51. Thomas D. Brock. Microbiology in Yellowstone at first focused on the basic science and ecology but gradually has expanded in scope Volume 64, Number 3, 1998568
52. Universidad Nacional de Quilmas Departamento de Ciencia y Tecnología Monografía Proteínas en el Infierno: Extremozimas Alumno: Juan Cruz Casabona Bernal, Julio de 2001
53. Usama Beshay Production of alkaline protease by *Teredinobacter turnirae* cells immobilized in Ca-alginate beads. Biotechnology Vol. 2 (3), pp. 60-65, March 2003
54. Vullo Diana L.. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente, Revista Química Viva Vol. 2, número 3, 2003 White, A. and Rose, D. R. (1997)
55. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Mechanism of catalysis by retaining β-glycosyl
56. Wood, T. M. and Garcia-Campayo, V. (1990) Enzymology of cellulose degradation. In Biodegradation, pp. 147–161, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

-
57. Y Mei, L Miller, W Gao, RA Gross. (2003). Imaging the distribution and secondary
58. Yadvika a, Santosh a,* , T.R. Sreekrishnan b, Sangeeta Kohli c, Vineet Rana a) Bioresource Technology 95 (2004) 1–10
59. Yiwei HUANG *et al.*. A highly acid-stable and thermostable endo- β -glucanase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*
60. http://ceniap.inia.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/Agronomia%20Tropical/at2803/arti/angulo_i.htm
61. <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/alginato.html>
62. <http://www.bolivia.com/noticias/AutoNoticias/DetalleNoticia28197.asp>
63. <http://www.ingenieroambiental.com/?pagina=902>
64. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm>

ANEXOS

Anexo.1 Medios de cultivo

Médico mineral basal 11

Solución	Composición	Cantidad
Solución A	NH ₄ Cl NaCl MgCl ₂ *6H ₂ O CaCl ₂ *2H ₂ O	200 g/L 10 g/L 10 g/L 5 g/L
Solución B	K ₂ HPO ₄ *3 H ₂ O	200 g/L
Solución 2	FeCl ₂ *4H ₂ O H ₃ BO ₃ HCl (25 %) CoCl ₂ *6H ₂ O MnCl ₂ *4H ₂ O Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O NiCl ₂ *6H ₂ O ZnCl ₂ CuCl ₂ *2H ₂ O Agua destilada csp 1000 mL	1.5 g 60 mg 6.5 mL 120 mg 100 mg 25 mg 25 mg 70 mg 15 mg
Solución 3	Na ₂ SeO ₃ NaOH Agua destilada csp 1000 mL	3 mg 0.5 g
Solución 4	NaHCO ₃	8.5 g/100 mL
Solución 7	Biotina PABA Vit. B ₁₂ Tiamina Agua destilada csp 1000 mL	1 mg 5 mg 5 mg 10 mg
Solución reductora	Sulfuro de sodio *9 H ₂ O	2 %

Anexo.2 Técnicas analíticas

Determinación de celulasas y xilanasas por la técnica de DNS

Preparación del buffer citrato:

Solución A: 0.05 M citrato sódico monohidratado (1.05g/100mL)

Solución B: 0.05 M citrato trisódico (1.47 g/ 100 mL)

Para el buffer mezclar 220 mL de la solución A, con 330 mL de la solución B. Ajustar el pH a 4.8

Preparación del buffer fosfato:

Solución A: 0.2 M hidróxido de sodio (2g/250 mL)

Solución B: 0.2 M fosfato ácido de sodio (6g/250mL)

Para el buffer fosfato mezclar 5.8 mL de la solución A, con 50 mL de la solución B, enrasar a un volumen de 100 mL con agua destilada. Ajustar el pH a 6

Preparación de la solución de DNS:

Disolver 10 g de hidróxido de sodio y 0.5 g de sulfato de sodio

Añadir 0.2 g de fenol, diluir y añadir 200g de tartrato de sodio y potasio, finalmente añadir 10 g de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico), para un volumen final de 1L

Preparación de sustratos:

El sustrato CMC se utiliza para la determinación de celulasas, se disuelve 0.2 g de CMC en 100ml de buffer citrato, luego ajustar a pH 4.8

El sustrato xilano se utiliza para la determinación de xilanasas, disolver 0.2 g de xilano en 100mL de buffer fosfato, ajustar a pH 6

Interpretación de resultados.-

Test- Control = Abs real

Para determinar la concentración interpolar el dato obtenido en la recta de la curva de calibración. Se debe realizar curva de calibración para celulasas y xilanasas

Curva de calibración:

Preparar estándares de glucosa y xilosa para celulasas y xilanasas respectivamente, de concentraciones de 10 a 1000 ug/mL

	Buffer	Estándar	DNS	Agua
Blanco	450 uL		750 uL	50 uL
Test	450 uL	50 uL	750 uL	

Incubar a 100 °C por 5 minutos

Dejar enfriar a temperatura ambiente

Leer al espectrofotómetro 540 nm

La concentración se debe expresar en UI/mL

Gail Lorenz Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. Vol. 31. March. 1959

Determinación de β – D-glucosidasa y β – D-xilosidasa

Preparación del buffer:

Preparar 50mM de citrato de sodio y ajustar el pH a 5

Interpretación de resultados.-

Se debe realizar una curva de calibración con p-nitrofenol a un pH y una longitud de onda determinada luego se debe interpolar los datos en la curva y posteriormente expresa en UI/mL

$$E_{405 \text{ nm pH } 5} = 0.0002 \mu\text{M cm}^{-1}$$

Therese Hansson and Patrrick Adlercreutz, Optimization of Galactoligosaccharide production from lactose using B- glycosidases from Hyperthermophiles. Food Biotechnology 15(2), 2001

Determinación de proteínas totales

Reactivo A o Lowry

1. Carbonato sódico 2% en 0.1 N de NaOH
2. Sulfato cúprico 1% en agua destilada
3. Tartrato de sodio y potasio 1% en agua destilada

Mezclar estas soluciones en la siguiente proporción:

$$10 (1) : 0,1 (2) : 0,1(3)$$

Reactivo B o Folin

Ciacaltea diluido en agua destilada en una proporción 1:1

Se recomienda preparar al momento de utilizar, y solo preparar el volumen que se requiere

Determinación de etanol

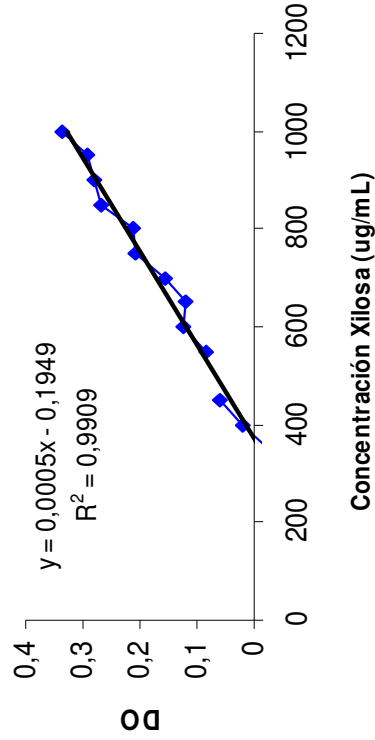
La curva de calibración de etanol en su fase gaseosa se realizó mediante diluciones de etanol absoluto en agua, las diluciones se llevaron a una temperatura de 60° C por 2 horas, después de las cuales se prosiguió a su medición en su fase gaseosa, a través de cromatografía de gases.

Los resultados obtenidos expresados en mV, se graficaron en función de la concentración, obteniendo así una ecuación lineal con la obtenemos los datos expresados en g/L de etanol.

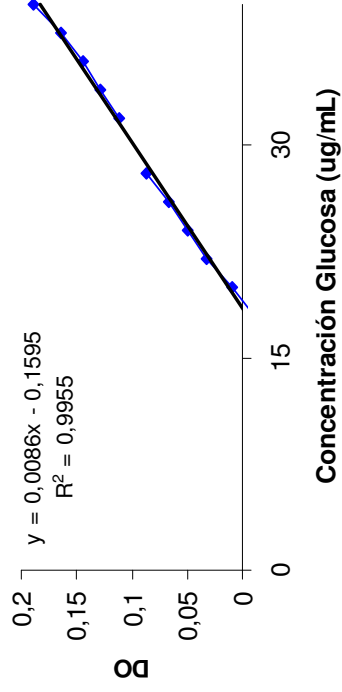
Anexo.3

Curvas de calibración

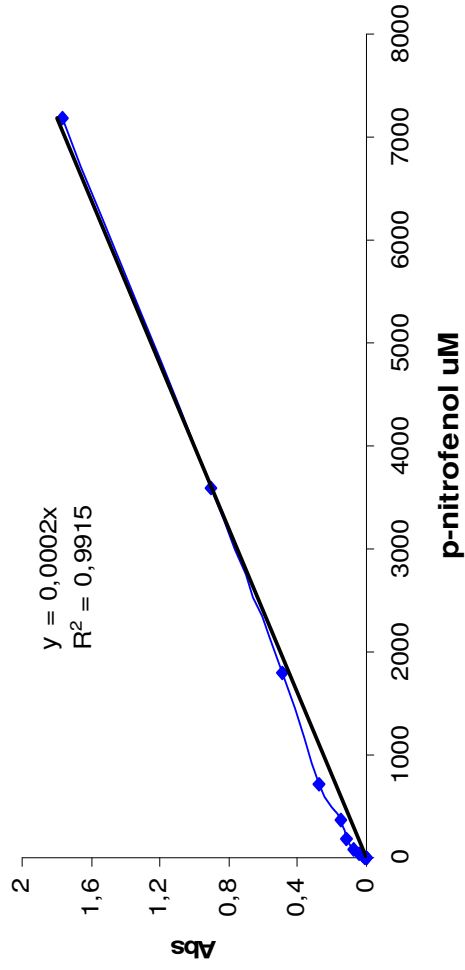
CURVA DE CALIBRACION XILOSA



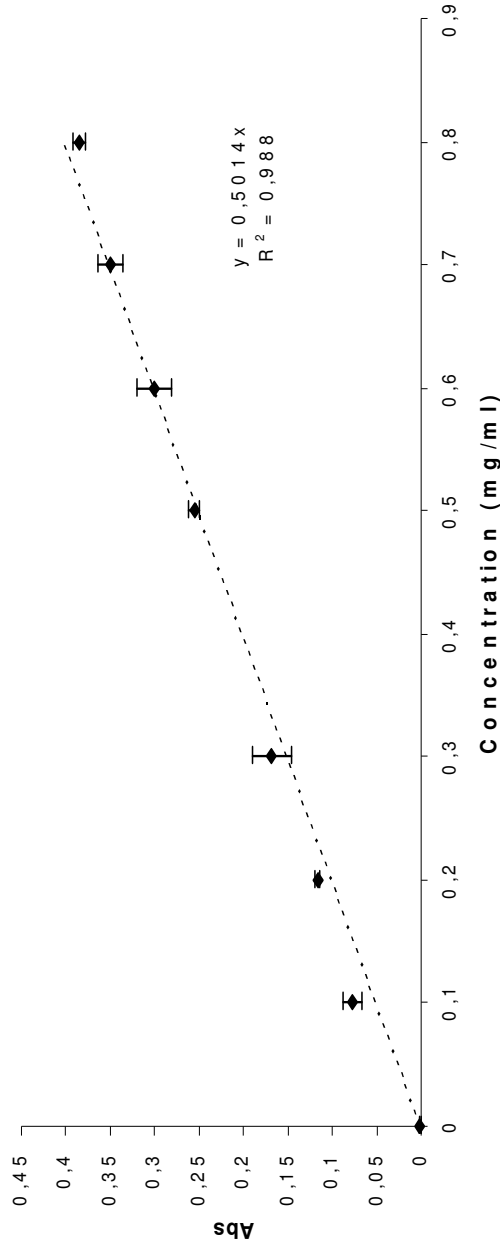
CURVA DE CALIBRACION GLUCOSA



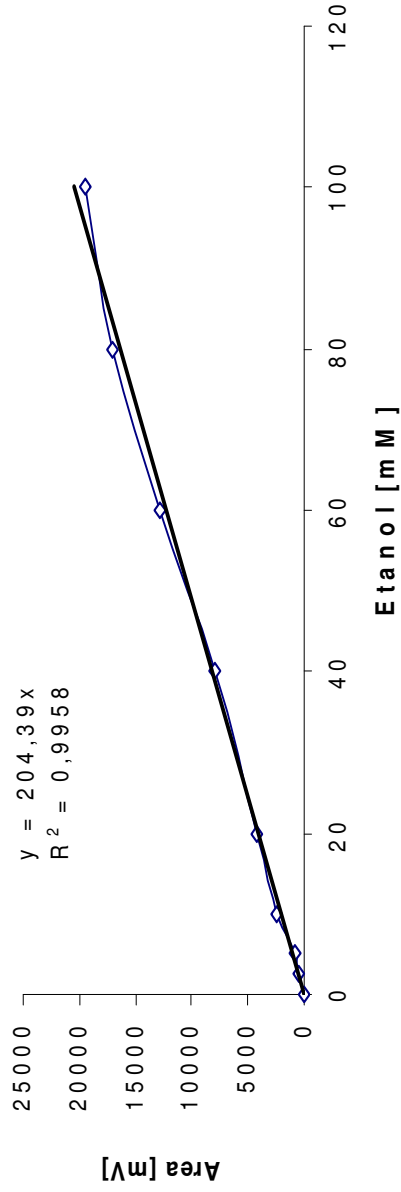
CURVA DE CALIBRACION p-NITROFENOL



Standard Curve for Protein quantification using Albumin as a Standard



CURVA DE CALIBRACION ETANOL



Anexo.4 Cultivo primario

CULTIVOS DE LAS MUESTRAS CON FUENTE DE CARBONO RESIDUOS AGRICOLAS,
INCUBACION A 60°C



DESARROLLO MICROBIANO EN AMBOS CULTIVOS CON FUENTE DE CARBONO
RESIDUOS AGRICOLAS



CULTIVO EN PAJA DE TRIGO



CULTIVO EN MELAZA DE CAÑA

Anexo.5 Cultivo secundario

DESARROLLO MICROBIANO EN SUSTRATOS ESPECIFICOS



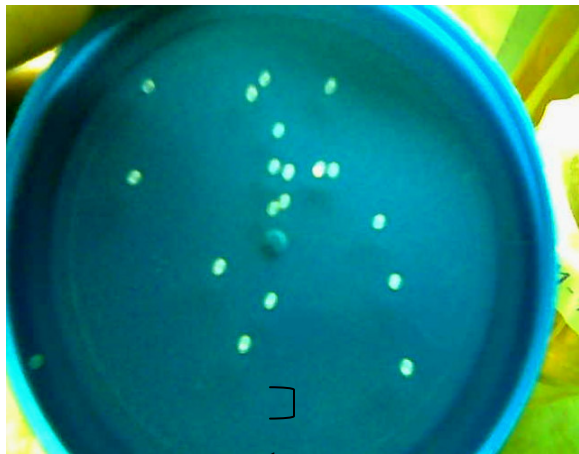
XILANO

CMC

Anexo 6. Encapsulación en Alginato de calcio



Agitación para la formación de microperlas



1 mm

