

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



**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO
ANAEROBICO TERMÓFILO PARA AUMENTAR LA
PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE XILANASAS Y
β-GLUCOSIDASAS, CON CEPAS BACTERIANAS
ENCAPSULADAS Y LIBRES**

ELABORADO POR:

UNIV. ESTHER CASABLANCA ALARCÓN

ASESORES:

LIC. NEIDA RIOS MANRRIQUEZ
MARÍA TERESA ÁLVAREZ ALIAGA PhD.
ENRIQUE TERRAZAS SILES PhD.

La Paz – Bolivia
2009

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por su infinito amor, por haber guiado mi vida durante todo este tiempo, por las bendiciones que me dio y que me sigue dando.

Agradezco a toda mi familia por su apoyo incondicional, a mi madre Francisca por enseñarme que en la vida no existe nada imposible si uno se lo propone, a mi padre Venancio por enseñarme que la fuerza esta en pensar y por creer siempre en mí, a mis dos hermanos por su cariño. A mis tíos Demetrio y Eva quienes fueron y son un gran apoyo para mi vida.

A mi asesora doctora Teresa Álvarez Aliaga por encaminarme en la línea de la investigación, a Neida Ríos por haberme guiado durante todo mi trabajo brindándome conocimiento y en especial su amistad.

A mi asesor doctor Enrique Terrazas Siles por sus consejos, motivación y por su seguimiento a lo largo del trabajo.

A la Dra. Esther Ninoska Flores y al Dr. Pablo Irahola por las contribuciones que realizaron en mi trabajo.

A mis amigas Sandra y Rossie por enseñarme que en la tristeza uno debe de sonreír.

A todos mis amigos del instituto por brindarme su amistad.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAP. I INTRODUCCIÓN.....	3
CAP. II ANTECEDENTES.....	4
1. BACTERIAS ANAEROBIAS.....	5
1.1 MATABOLISMO DE BACTERIAS ANAEROBIAS.....	5
2. DEGRADACION DE XILANO Y OTRAS HEMICELULOSAS.....	9
3. BACTERIAS EXTREMÓFILAS.....	12
3.1 BACTERIAS TERMÓFILAS.....	14
4. ENZIMAS.....	15
4.1 ENZIMAS TERMOESTABLES.....	17
4.1.1 XILANASAS.....	17
4.1.2 β -GLUCOSIDASAS.....	19
5. ENCAPSULACIÓN DE BACTERIAS.....	20
6. RESIDUOS AGRICOLAS.....	22
7. HIDROLIZADOS.....	24
7.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	24
7.2 HIDRÓLISIS ALCALINA.....	25
7.3 HIDRÓLISIS CON AMONIO.....	25
7.4 HIDRÓLISIS TÉRMICA.....	25
CAP. III JUSTIFICACIÓN.....	26
CAP. IV OBJETIVOS.....	28
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
CAP. V MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
1. MICROORGANISMOS.....	29
1.1 MEDIO DE CULTIVO.....	29
2. ENCAPSULACIÓN EN PERLAS DE ALGINATO.....	29
3. OPTIMIZACIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO.....	31
4. OPTIMIZACIÓN DEP pH DEL MEDIO DE CULTIVO.....	31
5. PRE-TRATAMIENTO DE RESIDUOS AGRÍCOLAS.....	32
6. OPTIMIZACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO.....	33
7. MEDICIÓN DE ENZIMAS INTRACELULARES.....	35
8. CONDICIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	35
9. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	35
CAP. VI RESULTADOS.....	40
1. SELECCIÓN DE LA CEPA CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	40
2. OPTIMIZACIÓN DE XILANASAS.....	41
2.1 OPTIMIZACIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO.....	41
2.2 OPTIMIZACIÓN DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO.....	44
2.3 OPTIMIZACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO.....	45
2.3.1 PROCESOS DE PRE-TRATAMIENTO DE RESIDUOS AGRÍCOLAS.....	46
2.4 CONDICIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	49
3. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN β -GLUCOSIDASAS.....	50

3.1 OPTIMIZACIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO.....	50
3.2 OPTIMIZACIÓN DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO.....	51
3.3 OPTIMIZACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO.....	53
3.4 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR β -GLUCOSIDASAS.....	55
3.5 CONDICIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	57
CAP. VII DISCUSIÓN.....	59
CAP. VIII CONCLUSIÓN.....	61
CAP. IX PERSPECTIVAS FUTURAS.....	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS.....	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujo de carbono y energía en el metabolismo anaerobio.....	8
Figura 2. Vías de incorporación del nitrógeno.....	8
Figura 3. Esquema del modo de interacción de los componentes de la pared celular. Las barreras paralelas representan fibras de celulosa entrelazadas por las cadenas de hemicelulosa(unidas entre sí por puentes diferúlicos) y proteínas estructurales	9
Figura 4 Esquema de la estructura de una molécula de xilano y sus ramificaciones.....	12
Figura 5. Enzimas necesarias para la degradación del xilano y lugares sobre los que actúan.....	18
Figura 6. Enzima β -glucosidasas hidroliza los enlaces β 1-4 de los oligosacáridos.....	20
Figura 7. Estructura y características del alginato:(a) monómeros de alginato, (b) conformación química, (c) bloque de distribución.....	21
Figura 8. Formación de la caja de huevo y la ubicación de los iones polivalentes que sirven de enlace de dos moléculas de polímero.....	21
Figura 9. Principio de la encapsulación, transporte extracelular de metabolitos y nutrientes.....	22
Figura 10. Composición genérica de residuos agroindustriales (biomasa o lignocelulosa).....	23
Figura 11. Representación esquemática del efecto de los pre-tratamientos.....	24
Figura 12. Formación de las perlas de alginato.....	30
Figura 13. Reacción enzimática de las xilanasas, oxidación de azúcares reductores.....	36
Figura 14. Reacción enzimática de las β -glucosidasas.....	37
Figura 15. Curva de crecimiento de la cepa FT3.....	40
Figura 16. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad de las xilanasas en células libres (NH ₄ Cl 0, NaNO ₃ -2, Extracto de Levadura -1, Urea 1).....	42
Figura 17. Comparación de la optimización de Fuente de Nitrógeno (NH ₄ Cl 1, NaNO ₃ 2, Extracto de Levadura 3, Urea 4) en células libres y encapsuladas	43

Figura 18. Crecimiento de bacterias encapsuladas, se observa la coloración blanquecina de la perla lo que demuestra la biomasa.....	43
Figura 19. Efecto del pH en el medio de cultivo de células encapsuladas sobre la actividad xilanolítica de la cepa FT3 inmovilizadas cultivadas en xilano como fuente carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno.....	44
Figura 20. Actividad xilanolítica de la cepa FT3 libre en distintos pH de medio de cultivo con extracto de levadura como fuente de nitrógeno, xilano como fuente de carbono.....	45
Figura 21. Pretratamiento de material cruda por distintos métodos de hidrólisis (hidrólisis acida 1, termal 2, con amonio 3, alcalina NaOH 4, alcalina KOH 5).....	46
Figura 22. Actividad xilanolítica, cepa FT3 libre cultivada en extracto de levadura como fuente de nitrógeno con distintos fuentes de carbono a pH neutro.....	47
Figura 23. Efecto de las distintas fuentes de carbono (materia cruda) sobre la actividad xilanolítica de la cepa FT3 con extracto de levadura a pH neutro (cascarilla de arroz 1, paja de quinua 2, paja de trigo 3, paja de soya 4, xilano 5).....	48
Figura 24. Optimización de concentraciones de fuente de Nitrógeno y fuente de Carbono.....	49
Figura 25. Estabilidad de la enzima a distintos pH de sustrato de la reacción enzimática.....	50
Figura 26. Estabilidad de la enzima a distintas temperaturas de la reacción enzimática.....	50
Figura 27. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el incremento de la actividad enzimática de β -glucosidasas en células libres (NH_4Cl 1, NaNO_3 2, Extracto de Levadura 3, Urea4).....	51
Figura 28. Efecto del pH en el medio de cultivo de células encapsuladas sobre la actividad enzimática de las β -glucosidasas, el rango del pH es de 5-10.....	52
Figura 29. Efecto del pH en el medio de cultivo de células libres sobre la actividad enzimática de las β -glucosidasas, el rango del pH es de 5-10.....	53
Figura 30. Efecto de las distintas fuentes de carbono (arroz 1, quinua 2, trigo 3, soya 4, xilano 5) sobre la actividad de las β -glucosidasas.....	54

Figura 31. Optimización de la concentración de la fuente de nitrógeno y fuente de carbono.....	55
Figura 32. Lisis de la bacteria por sonicación para la obtención de β -glucosidasas intracelulares.....	56
Figura 33. Actividad intracelular β -glucosidasas intra-celulares, extracelulares y β -glucosidasas totales.....	57
Figura 34. Estabilidad de la enzima a distintos pH de sustrato de la reacción enzimática.....	57
Figura 35. Estabilidad de la enzima a distintas temperaturas de la reacción enzimática.....	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hemicelulosas.....	10
Tabla 2. Composición de los residuos lignocelulósicos (hemicelulosa, celulosa, lignina).....	23
Tabla 3. Origen de las cepas bacterianas.....	29
Tabla 4. Diseño factorial para la optimización de la fuente de nitrógeno.....	31
Tabla 5. Diseño factorial para la optimización del pH del medio de cultivo.....	31
Tabla 6. Diseño experimental para el pre-tratamiento.....	33
Tabla 7. Diseño factorial para la optimización de la fuente de carbono.....	33
Tabla 8. Concentraciones de extracto de levadura (fuente de nitrógeno) paja de soya como materia cruda (fuente de carbono).....	34
Tabla 9. Diseño experimental para la optimización de la concentración de fuente de nitrógeno y fuente de carbono.....	34
Tabla 10. Procedimiento analítico colorimétrico para la determinación de la actividad enzimática de xilanasas.....	36
Tabla 11. Procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática de la β - glucosidasa.....	37
Tabla 12. Procedimiento analítico colorimétrico para la determinación de proteínas totales.....	38
Tabla 13. Procedimiento para la determinación de la cantidad de materia orgánica oxidable.....	39
Tabla 14. Actividad enzimática β -glucosidasas de distintas cepas bacterianas anaerobias termofilas de muestras obtenidas de la región altiplánica de Bolivia.....	40
Tabla 15. Cantidad de la fuente de nitrógeno en la solución A.....	41
Tabla 16. Actividad xilanolítica de bacterias libres e inmovilizadas.....	41
Tabla 17. Cálculo de la concentración de hidrolizado requerido.....	47
Tabla 18. Concentración de paja de trigo hidrolizado, utilizando de referencia el COD del xilano.....	54

RESUMEN

Las bacterias productoras de enzimas termófilas son de gran interés en la biotecnología debido a que tienen diversas aplicaciones en la industria por su estabilidad extrema. Estos biocatalizadores pueden ser empleados en la preparación de la pulpa del papel, procesamiento de alimentos agroindustriales, conversión de la hemicelulosa a biomasa, etc.. Las xilanasas y β -glucosidasas tienen gran importancia en el campo de la industria. Es por eso que el propósito de este trabajo es aumentar la producción enzimática de las xilanasas y β -glucosidasas de tres cepas bacterianas FT3, 2B y P5 anaerobias termófilas; aisladas de muestras obtenidas del altiplano boliviano. La cepa bacteriana FT3 mostró la mayor actividad xilanólítica de 2.0 UI/mL y β -glucosidasa de 48 UI/mL. Se optimizaron la fuente de nitrógeno, la fuente de carbono y el pH, del medio de cultivo tanto en células encapsuladas como en libres. La mejor fuente de nitrógeno fue el extracto de levadura llegándose a obtener una actividad xilanólítica y β -glucosidasa de 2.46 UI/mL y 85 UI/mL respectivamente; y como mejor fuente de carbono la paja de soya (*Glycine max*) como materia cruda obteniéndose una actividad xilanólítica de hasta 2.51 UI/mL. Del mismo modo en la optimización de β -glucosidasas la mejor fuente de carbono fue paja de trigo (*Paja Triticum spp.*) como materia hidrolizada, llegando a obtenerse una actividad de hasta 228 UI/mL, y la mejor fuente de nitrógeno fue extracto de levadura cuando se trabajó con bacterias libres y encapsuladas. En la optimización del pH del medio de cultivo las mejores actividades fueron de 3.39 y 144 UI/mL de xilanasas y β -D-glucosidasas, obtenidas a pH de 8 y 9 respectivamente.

Palabras clave: Xilanasas, β -glucosidasas, inmovilización, hidrolizados.

ABSTRACT

The thermophilic enzyme producing bacteria are in biotechnology of great interest for their extrem stability and different industry applications. Biocatalyst can be used in the paper pulp preparation, agroindustrial processing food, biomass conversion of hemicellulose, etc.. Xylanases and β -glucosidases are important in the industry field. The purpose of this work is to increase the enzymatic production of Xylanases and β -glucosidases on three cultures of thermophilic anaerobic bacteria FT3, 2B and P5, which were isolated from samples of the Bolivian Andean region. FT3 culture bacteria showed the best xylanolytic activity of 2.0 IU/mL and β -glucosidase of 48 IU/mL. They were optimized in the culture media: the nitrogen source, carbon source, and pH in free and encapsulated cells. The best nitrogen source was yeast extract obtained 2.46 IU/mL and 85 IU/mL xylanolytic and β -glucosidase activities respectively and the best carbon source was soybean straw (*Glycine max*), as a crude material obtained 2.51 IU/mL xylanolytic activity. While in the optimization for β -glucosidase the best carbon source was wheat straw (*Paja Triticum spp.*) but with hydrolyzed material with 228 IU/mL activity and the best nitrogen source was yeast extract when the culture was with free bacteria in both cases. In the optimization of pH the culture media the best activities were 3.39 and 144 IU/mL of xylanases and β -glucosidases obtained at 8 and 9 pH respectively.

Keywords: xylanases, β -glucosidases, immobilization, hydrolyzed.

CAP. I INTRODUCCION

Los sistemas enzimáticos microbianos suponen actualmente un importante potencial biotecnológico aplicable en numerosas industrias en el ámbito de las denominadas tecnologías limpias o tecnologías sostenibles, disminuyendo los daños en los sistemas biológicos (Gallardo, 2007). Los microorganismos que pueden llevar a cabo casi todo tipo de reacción química, gozan de muchas ventajas frente a los reactivos químicos debido a que las reacciones químicas no biológicas exigen un considerable aporte de energía para calentar o enfriar el tanque donde ocurre la reacción, suelen realizarse en solventes orgánicos, los cuales requieren catalizadores inorgánicos que pueden contaminar el medio y en muchas ocasiones resultan además como producto otras moléculas indeseables que deben retirarse en una etapa posterior de purificación. Los procesos biológicos, al contrario, ocurren a temperatura ambiente, se producen en disolución acuosa, no precisan de catalizadores inorgánicos y no forman productos indeseables ya que llevan a cabo procesos bioquímicos muy específicos; debido todo ello las enzimas tienen importancia en la industria (Ponce *et al.*, 2002)

Los microorganismos extremófilos son aun de mayor interés industrial debido a la estabilidad a condiciones extremas de pH, temperatura, concentraciones de sal, etc. de sus metabolitos. Las enzimas provenientes de bacterias termófilas tienen gran importancia industrial debido a que estas enzimas presentan mayor estabilidad a temperaturas altas, su vida media es prolongada a comparación con los mesófilos, catalizan reacciones específicas produciendo un solo producto el cual no requiere de purificación, reduciendo sus costos en la producción industrial; su aplicación está en las papeleras, textiles, conversión de biomasa y en alimentación, aunque recientemente está aumentando el interés de las enzimas por su otra acción catalítica como ser la actividad transferasa de las β -glucosidasas para la bioconversión y síntesis de nuevos compuestos.

En este sentido, las enzimas bacterianas como las xilanasas y β -Glucosidasas tienen importantes aplicaciones en la industria debido a su enorme potencial para modificar y transformar la lignocelulosa y otros materiales de la pared celular vegetal muy abundantes en la biomasa, los cuales son ampliamente utilizada como materia prima en un gran número de procesos

industriales; dando también un aprovechamiento de los desechos agrícolas, forestales ó industriales, a los que se revaloriza, evitando su acumulación.

Los residuos agrícolas son la mayor contaminante a nivel mundial, la cantidad disponible de estos materiales agrícolas es muy grande en todo el mundo. Es así que si el 5% del residuo agrícola fuera utilizado de manera correcta en la alimentación animal, se podría atender las necesidades de la población humana en términos de energía y proteína. (Sheehan *et al.*, 1999). Siendo en la actualidad uno de los problemas más preocupantes, por lo que se viene planteando diferentes soluciones biológicas que permitan al mismo tiempo su eliminación o disminución de manera que pueda ser utilizado para otros beneficios, estos residuos lignocelulósicos poseen grandes cantidades de hemicelulosas, celulosas y lignina, siendo estas grandes cantidades de fuente de carbono para bacterias (Martínez *et al.*, 2008).

Es en este sentido que el presente trabajo de investigación tiene como objetivo la optimización de las condiciones de cultivo anaeróbico termófilo para aumentar la producción enzimática de xilanasas y β -glucosidasas, con cepas bacterianas libres e inmovilizadas; el cual se conseguirá probando diferentes fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno en el medio y probando el cultivo a diferentes pH; así también se establecerá las condiciones de pH y temperatura para una óptima actividad enzimática. Las grandes posibilidades de aplicación de estas enzimas promueven a la investigación y mejoramiento en la producción de las mismas.

CAP. II ANTECEDENTES

Diferentes estudios han determinado que la importancia de las enzimas producidas por bacterias radica en que estas sean extracelulares debido a que la mayoría de las enzimas permanecen asociadas con las células y no son normalmente excretadas al medio. En algunos casos, como en el caso de lipasa e invertasa, hecho de que la enzima sea intracelular o extracelular depende del microorganismo utilizado (Gacesa *et al.*, 1990). Pocas enzimas intracelulares son producidas en gran escala y las ventas de estas enzimas representan solo un pequeño porcentaje del total de ventas. La mayoría de las enzimas extracelulares son producidas por organismos pertenecientes a dos géneros: *Bacillus* y *Aspergillus* y que la mayoría son del tipo hidrolítico (Godfrey *et al.*, 1983).

La biotecnología de las celulasas y xilanasas empezó al principio de los años 80 primero en la alimentación animal seguida por aplicaciones en la industria de alimentos. Posteriormente estas enzimas empezaron a usarse en las industrias de lavandería, textil y en la pulpa del papel. En las últimas décadas su uso se ha incrementado en forma considerable y actualmente presentan cerca del 20% del mercado mundial de las enzimas.

Actualmente se ha estudiado la producción de xilanasas de distintos microorganismos tales como: *Bacillus pumilus*, *Clostridia* (Marichamy *et al.*, 2004; Asha *et al.*, 2006). Por otro lado uno de los inconvenientes es la frágil naturaleza proteica de las enzimas, que conlleva a una estabilidad limitada de su estructura y funcionalidad, constituye un aspecto importante en un contexto tecnológico. Se considera que una enzima es apropiada para una aplicación comercial, si su estabilidad es suficiente y sus propiedades bioquímicas sean adecuadas para dicha aplicación (Illanes, 1990).

Las enzimas provenientes de microorganismos extremófilos adquieren gran importancia debido a sus aplicaciones industriales como ser: las Arqueas metanogénicas para la producción de metano a partir de residuos urbanos, DNA polimerasas termoestables de *Thermus aquaticus* para ensayos de PCR, Alcohol deshidrogenadas resistentes a los medios orgánicos, y actualmente la enzima xilanasas termófilas que han sido estudiada en un hongo termófilo *Chaetomium thermophilum* (Katapodis *et al.*, 2007).

1. BACTERIAS ANAEROBIAS

Las bacterias anaerobias son microorganismos procariotas unicelulares que presentan una estructura celular muy sencilla, estos difieren de los aerobios en la cadena de transporte de electrones, el último aceptor de electrones en los microorganismos aerobios es el oxígeno y en los anaerobios el último aceptor de electrones son: nitratos, nitritos, anhídrido carbónico, sulfuros, fumarato, Ion Fe^{+3} , etc. esto depende del requerimiento metabólico (Bravo,2007). A la vez que las bacterias anaerobias poseen enzimas que solo tienen actividad cuando hay ausencia de oxígeno.

1.1 METABOLISMO DE LAS BACTERIAS

El metabolismo de las bacterias tiene funciones como ser: el mantenimiento de la vida proveyendo los precursores para los componentes celulares y en la producción de energía por reacciones de oxidación-reducción.

Químicamente la oxidación está definida por la pérdida de electrones (e^-) y la reducción por la ganancia de los mismos. En bioquímica, las reacciones de oxidación-reducción frecuentemente incluyen no sólo la transferencia de electrones sino de átomos enteros de hidrógeno, por lo que se conocen también con el nombre de reacciones de deshidrogenación. En las bacterias los sistemas de oxidación-reducción que transforman la energía química de los nutrientes en una forma biológicamente útil, incluyen la fermentación y la respiración.

En la fermentación, los electrones pasan del dador, un intermediario formado durante la degradación de la molécula de sustrato, hacia un aceptor constituido por algún otro intermediario orgánico, también generado durante el catabolismo del sustrato inicial. Por lo tanto, este proceso de oxidoreducción no requiere el aporte exógeno de un aceptor final de electrones. Hay distintos tipos de fermentaciones, pero todas llevan a una oxidación parcial de los átomos de carbono del sustrato inicial y liberan por lo tanto sólo una pequeña parte de la energía potencial contenida. El rendimiento energético de este proceso es menor que el de la respiración. En las bacterias se encuentran las 3 vías centrales del metabolismo intermediario de los hidratos de carbono:

- la vía glucolítica o de Embden Meyerhof Parnas
- la vía de pentosa fosfato o shunt de las pentosas
- la vía de Entner-Doudoroff.

Los procesos para la obtención energía son: para los procesos de síntesis y otros que requieran energía; los nutrientes son fragmentados durante el catabolismo y luego convertidos por las reacciones del metabolismo intermediario en ácidos orgánicos y ésteres de fosfato. La mayoría de los compuestos de bajo peso molecular que representan las unidades para sintetizar la célula, son aminoácidos, bases púricas y pirimidínicas, fosfatos de azúcares, ácidos orgánicos y otros metabolitos, algunos producidos al final de largas cadenas de reacciones. Estas sustancias sirven para la síntesis de las macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, materiales de reserva, constituyentes de la pared celular) durante el metabolismo. Los carbohidratos constituyen el 5 a 25% de la materia orgánica del suelo. Los restos vegetales contribuyen en forma de azúcares simples, hemicelulosas y celulosa, los que son descompuestos en distinto grado por bacterias, actinomicetos y hongos, la mayoría de estas degradaciones de la materia fibrosa que constituye la mitad de la biomasa vegetal ocurre en condiciones anaerobias. Estas macromoléculas son comúnmente degradadas fuera de las células a unidades mono o diméricas por la acción de exoenzimas y esos productos son absorbidos por las mismas para la nutrición microbiana. Estos organismos a su vez sintetizan sus polisacáridos y otros carbohidratos que constituyen la mayor parte de los glucósidos hallados en el suelo.

Respiración anaeróbica

Es una variación de la respiración en la que los aceptores de electrones utilizados son diferentes al oxígeno, e incluyen nitrato, ión férrico, sulfato, carbonato y ciertos compuestos orgánicos. Los productos de la respiración anaeróbica son fácilmente detectados: las burbujas de N_2 , NO_2 , CH_4 (inflamable); el olor de H_2S ; la formación de óxido de hierro diamagnético (figura 1).

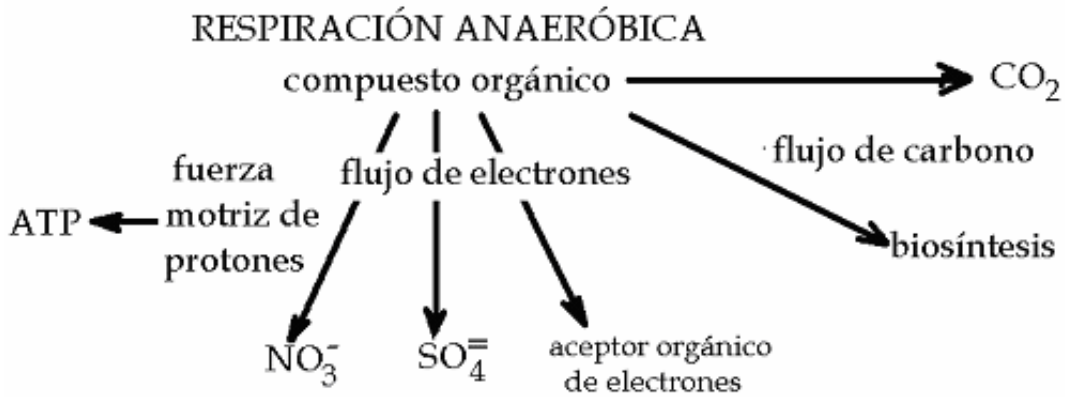


Figura 1. Flujo de carbono y energía en el metabolismo anaerobio

Síntesis de proteínas

Casi todos los organismos están capacitados para convertir el nitrógeno inorgánico en proteínas y ácidos nucleicos. El nitrógeno puede asimilarse en forma de iones amonio y por algunas especies en forma de iones nitrato.

La mayoría de los microorganismos son capaces de sintetizar todos los aminoácidos requeridos para síntesis de proteínas. El grupo amino es introducido por afinación directa o por transaminación. La asimilación del nitrógeno molecular, así como la de nitrato y nitrito implica una reducción a amonio antes de su incorporación al compuesto orgánico

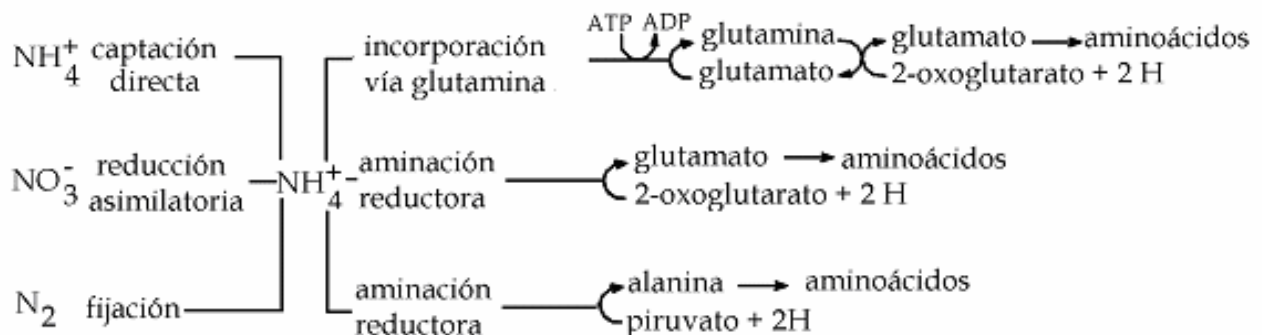


Figura 2. Vías de incorporación del nitrógeno

La figura 2 muestra las rutas más importantes de incorporación de nitrógeno para formar los aminoácidos.

2. DEGRADACIÓN DE XILANOS Y OTRAS HEMICELULOSAS

Las hemicelulosas son polisacáridos heterogéneos, neutros, que presentan una cadena principal con ramificaciones cortas de pentosas (figura 3). Suponen habitualmente el 20 - 35% del peso seco de la pared celular vegetal, donde, juntamente con la pectina, la lignina y las proteínas, constituyen la denominada matriz amorfa de la pared celular, dentro de la cual se encuentra embebida la fase microfibrilar cristalina. Forman uniones entre sí, con otros polisacáridos, como las microfibrillas de celulosa las pectinas, y con la lignina, mediante enlaces tanto covalentes como no covalentes.

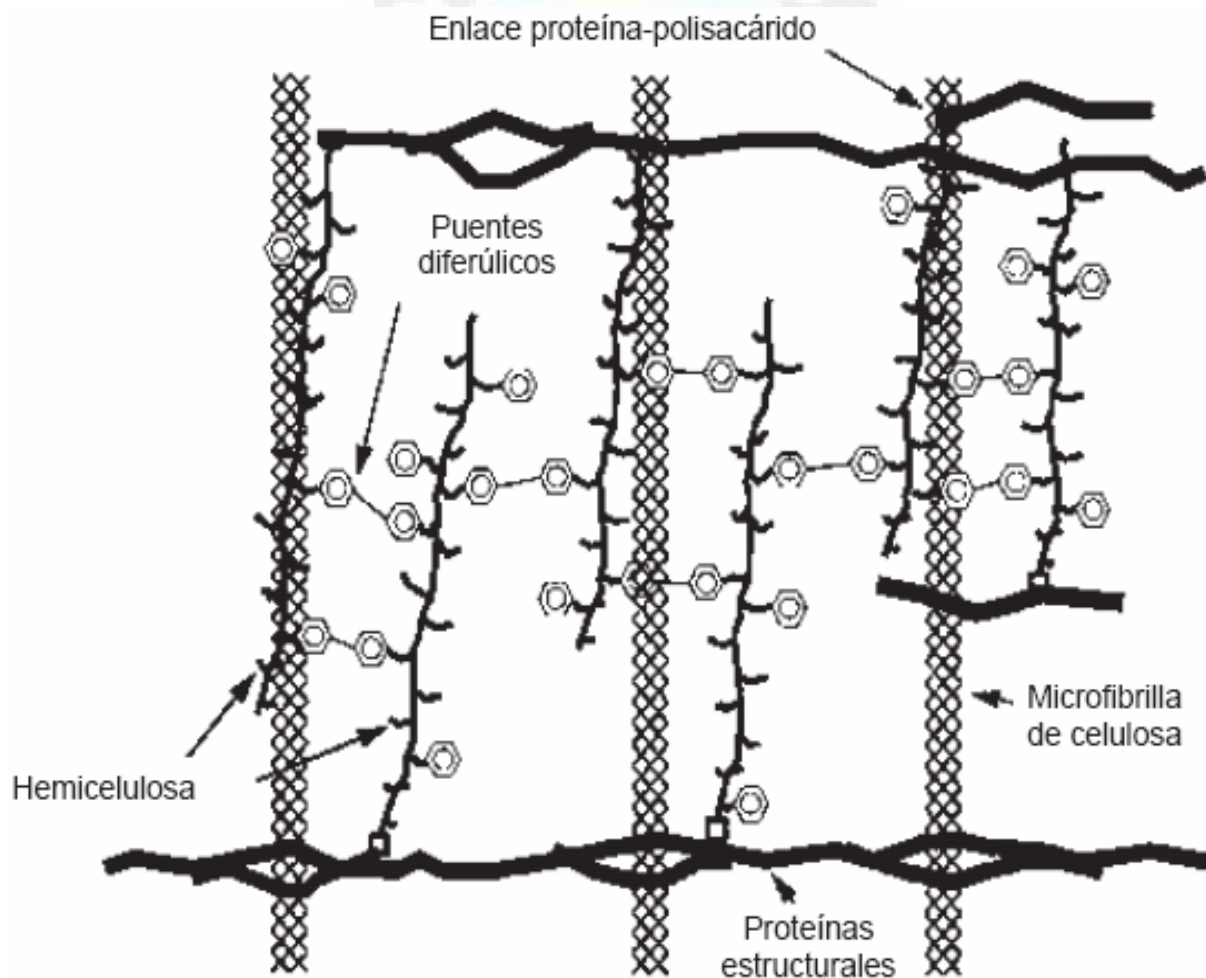


Figura 3. Esquema del modo de interacción de los componentes de la pared celular. Las barreras paralelas representan fibras de celulosa entrelazadas por las cadenas de hemicelulosa unidas entre sí por puentes diferúlicos y proteínas estructurales (Martínez et al 2008).

La hemicelulosa más abundante en los cereales y las maderas duras (angiospermas) es el xilano, mientras que en las maderas blandas (gimnospermas) es el galactoglucomanano. Otras hemicelulosas frecuentes en vegetales son el xiloglucano, el galactomanano, el glucomanano, el manano puro y la calosa (Tabla 1) La hemicelulosa frecuentemente rodea a las fibras de celulosa y aumenta su fuerza de unión y de tensión (Katzen *et al.*, 1999).

Tabla 1. Hemicelulosas

	Xilano	Cadenas de xilosa $\beta(1\rightarrow4)$ con cadenas laterales cortas de otros azúcares unidas a la cadena principal mediante el C2 y el C3 de las xilosas.
	Manano puro	Polímero no ramificado de manosa $\beta(1\rightarrow4)$. Muy compacto debido a la presencia de numerosos puentes de hidrógeno intramoleculares.
Mananos	Glucomanano	Cadenas de manosa $\beta(1\rightarrow4)$ que contienen residuos de glucosa. La relación manosa:glucosa es de 3:1.
	Galactomanano	Cadenas de manosa $\beta(1\rightarrow4)$ con cadenas laterales de residuos de galactosa simples unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ a los residuos de manosa de la cadena principal.
	Galactoglucomanano	Como el glucomanano, pero con cadenas laterales de residuos de galactosa simples unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ a los residuos de glucosa o manosa de la cadena principal.
	Xiloglucano	Cadenas de glucosa $\beta(1\rightarrow4)$ con cadenas laterales cortas de xilosa unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ a los residuos de glucosa de la cadena principal.
	Calosa	Polímero no ramificado de glucosa $\beta(1\rightarrow3)$.

El xilano es un polisacárido muy abundante en la naturaleza; el más abundante después de la celulosa. Forma parte de las hemicelulosas presentes en la matriz amorfa de la pared celular secundaria de los tejidos lignificados de las plantas leñosas, aunque también se puede encontrar en la matriz de paredes primarias de células en crecimiento y de semillas y bulbos, donde tiene función de reserva.

El xilano es la principal hemicelulosa de las maderas duras (angiospermas), representando un 15 - 30% del peso seco de la pared vegetal, y es menos abundante en el caso de las maderas blandas (gimnospermas), donde representa un 7 - 12% del peso seco. Su función es básicamente estructural, manteniendo la integridad de la pared celular junto con otras hemicelulosas, la

celulosa, las pectinas y la lignina. Además, junto con la lignina, ayuda a proteger las microfibrillas de celulosa de la biodegradación.

El xilano está formado por un esqueleto de moléculas de β -D-xilosa unidas entre sí por enlaces β (1 \rightarrow 4), salvo en algas marinas donde estos enlaces son también β (1 \rightarrow 3). Esta cadena de β -D-xilopiranosas puede tener diferente grado de polimerización, siendo éste mayor en el caso de maderas duras (150 – 200 residuos de xilosa) que en el de maderas blandas (70 - 130 residuos) (Kulkarni *et al.*, 1999). Normalmente, la cadena de β -D-xilopiranosas presenta ramificaciones laterales de diferente naturaleza, ya que, aunque en algunas plantas terrestres y algas se han encontrado homoxilanos formados exclusivamente por xilosa, lo más frecuente es que el xilano se encuentre en forma de heteropolisacárido. El número y la naturaleza de estas ramificaciones laterales dependen de la especie vegetal y del tipo de tejido, siendo las más comunes aquellas formadas por: α -L-arabinofuranosa, ácido α -D-glucurónico y/o ácido 4-Ometil- α -D-glucurónico, O-acetilos, ácidos ferúlico y *p*-cumárico (Figura 4).

Las enzimas degradadoras del xilano se clasifican en dos grupos principales:

- Enzimas implicadas en la despolimerización del esqueleto principal de xilosas: Endoxilanasas (β -1,4-D-xilanxilohidrolasas) y β -xilosidasas (β -1,4-D-xilan-xilohidrolasas).
- Enzimas encargadas de la eliminación de las cadenas laterales del xilano, llamadas también accesorias o desramificantes: α -L-arabinofuranosidasas, α -D-glucuronidasas, acetilxilano esterasas, y ferúlico y *p*-cumárico esterasas (hidroxicinámico esterasas).

Entre estas enzimas existe frecuentemente relaciones de sinergismo, de modo que, las enzimas desramificantes permiten una mayor accesibilidad de las xilanasas al esqueleto principal de xilosas, y a su vez estas enzimas accesorias liberan los sustituyentes laterales más fácilmente a partir de fragmentos de xilano y no a partir del xilano polimérico. De esta manera, se ha visto que existe frecuentemente sinergismo entre xilanasas y enzimas desramificantes, xilanasas y β -xilosidasas.

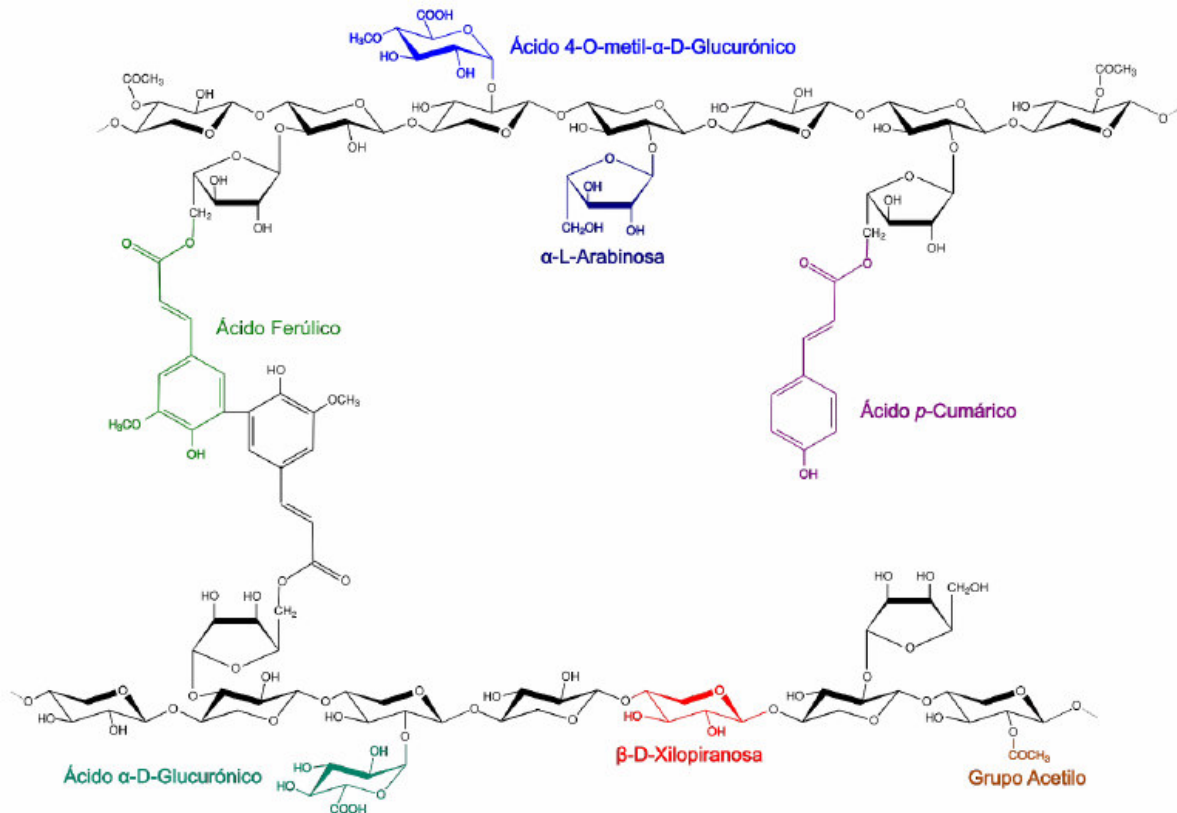


Figura 4. Esquema de la estructura de una molécula de xilano y sus ramificaciones.

3. BACTERIAS EXTREMÓFILAS

Son microorganismos que viven en condiciones extremas, inhabitables para la gran mayoría de los organismos conocidos como ser aquellos que viven en anhidrobiosis seres que viven en ausencia de agua; barófilos, seres que viven en ambientes con presión muy alta; hipertermófilos, con temperaturas óptimas de crecimiento por encima de los 60° C, etc. y pueden ser eucariotas, procariontes en el dominio Archaea y de extremófilos en el dominio bacteria.

Los hiperextremófilos se encuentran en los géiseres o chimeneas negras de los fondos de los océanos, donde se expulsa agua a más de 200°C a una profundidad tal que soportan una presión extrema; también en las salinas o el Mar Muerto, donde la concentración de sal supera varias veces la concentración “normal” para el desarrollo de vida. Otros extremófilos son los que viven en minas o plantas de desechos industriales, y que pueden obtener energía a partir de compuestos inorgánicos con azufre o hierro.

Clasificación de microorganismos extremófilos:

- Anhidrobiosis: Viven en ausencia de agua. Ejemplo: *Selaginella lepidophylla*
- Acidófilo: Se desarrollan en ambientes de alta acidez, como el *Picrophilus*.
- Alcalófilo: Se desarrollan en ambientes muy alcalinos (básicos).
- Barófilo: Se desarrollan en ambientes con presión muy alta.
- Halófilo: Se desarrollan en ambientes hipersalinos, como las del género *Halobacterium*, que viven en entornos como el Mar Muerto.
- Organismo de suelos profundos: Viven a muchos metros bajo el suelo, incluso en medio de rocas.
- Psicrófilo: Se desarrollan en ambientes de temperatura muy fría, como la *Polaromonas vacuolata*.
- Radiófilo: Soportan gran cantidad de radiación, como la bacteria *Deinococcus radiodurans*.
- Termófilo: Se desarrollan en ambientes a temperaturas superiores a 45°C, algunos de ellos, los hipertermófilos tienen su temperatura óptima de crecimiento por encima de los 80°C., como el *Pyrococcus furiosus*.
- Xerófilo: Se desarrollan en ambientes con muy baja humedad.

Características de los extremófilos:

Los extremófilos son mayoritariamente microorganismos procariontes pertenecientes a las Eubacterias y las Archaeobacterias (o Arqueas). La supervivencia de los extremófilos es posible debido a que sus células tienen componentes y propiedades particulares que les permiten mantenerse estables en el entorno en el que viven. Algunas de estas propiedades se detallan a continuación:

- Contienen enzimas estables que no se desnaturalizan a altas temperaturas y protegen al DNA para evitar su degradación. Estas enzimas, al igual que las que funcionan a bajas temperaturas o a pH extremos, son conocidas como extremozimas.

- La membrana celular no es una bicapa de lípidos, como en el resto de los seres vivos, sino una monocapa, con uniones químicas distintas a las de las membranas convencionales, que le otorga mayor estabilidad.
- Los que habitan en sitios muy salinos (halófilos) acumulan sales también intracelularmente, y así mantienen un equilibrio osmótico con el medio que los rodea sin deshidratarse.
- Los que habitan en glaciares acumulan solutos que impiden que se congelen (similar a la función que cumple el anticongelante en un auto).
- Los que metabolizan compuestos inorgánicos tienen enzimas que le permiten hacerlo.

3.1 BACTERIAS TERMÓFILAS

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, lo que se consigue si la presión es elevada como ocurre en las profundidades oceánicas.

El estudio de los termófilos se inició hace cuarenta años aproximadamente, pero se ha ido intensificando cada vez más ya que poseen enzimas diferentes que les permiten trabajar en condiciones extremas y que tienen multitud de aplicaciones industriales. Se han aislado enzimas como α -amilasas, DNAsas, proteasas y xilanasas, etc. termoestables bacterianas (Sánchez Elena). Estos microorganismos termófilos se caracterizan por su composición lipídica de sus membranas tiene mayor contenido de uniones éteres y permeabilidad controlada de su membrana, entre otros factores, permiten la vida en esas aguas que no sólo pueden ser hirvientes sino cáusticas. Los fosfolípidos con uniones éter son difíciles de degradar y en algunas arqueobacterias sus cadenas hidrofóbicas se unen entre sí formando una capa monolipídica en lugar de la bicapa que encontramos en el resto de los tipos celulares. Por otro lado, los ácidos nucleicos tienen una gran cantidad de bases G-C con tres puentes de hidrógeno en lugar de dos, y son uniones más fuertes que las de A-T o A-U. Además, la mayor cantidad de puentes salinos y puentes de hidrógeno adicionales de las proteínas contribuyen a su mayor estabilidad al calor.

Evidentemente, las enzimas y otros metabolitos de termófilos e hipertermófilos son mucho más estables que las de los organismos normales y funcionan perfectamente a elevadas temperaturas. Parece ser que las diferencias en las secuencias de sus aminoácidos no son demasiado grandes, pero algún pequeño cambio en ciertos puntos clave, consigue diferencias en los plegamientos de las cadenas de polipéptidos que son fundamentales en la resistencia al calor. Los ribosomas y otros orgánulos encargados de las síntesis de proteínas son mucho más estables a altas temperaturas, al igual que su membrana citoplasmática, que en el caso de los termófilos, es rica en ácidos grasos saturados que las hacen mucho más funcionales y estables al calor. Los termófilos e hipertermófilos tienen un interés económico porque sus enzimas tienen actividad enzimática cuando las habituales dejan de tenerlo y son utilizadas en diversos procesos como ser en la conversión rápida de toneladas de maíz en endulzantes para las gaseosas, síntesis de detergentes y otras aplicaciones industriales como el refinamiento del petróleo, además estas bacterias y arqueobacterias constituyen la fuente de proteínas estables empleadas en investigación y diagnóstico.

4. ENZIMAS

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas específicas sin consumirse en una reacción, aumentando su velocidad de reacción en el ser vivo. Ello hace posible que tengan lugar, en condiciones fisiológicas, reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH. Prácticamente todas las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas. La sustancia sobre la que actúa el enzima se llama sustrato del enzima. El sustrato se une a una región concreta del enzima, llamado centro activo. El centro activo comprende un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción. Las enzimas son catalizadores específicos: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi siempre requiere un sustrato específico.

Las enzimas son actualmente empleadas en las industrias con diversos propósitos los cuales pueden ser de producción como también para reducir los procesos contaminantes producidos por los mismos y son a la vez económicamente rentables.

Propiedades de las enzimas

Todas las enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos COOH ; amino NH_2 ; hidroxilo OH ; tiol SH ; imidazol, etc) en las cadenas laterales de los aminoácidos que las componen. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica, cambios importantes en el pH pueden provocar la desnaturalización de la proteína. La mayoría de los enzimas son muy sensibles a los cambios de pH.

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica pero las proteínas a partir de una determinada temperatura se empiezan a desnaturalizar por el calor. A veces, un enzima requiere para su función la presencia de otras sustancias no proteicas que colaboran en la catálisis que son las coenzimas que son moléculas orgánicas. Muchos de estas coenzimas se sintetizan a partir de vitaminas. A menudo, las coenzimas actúan como aceptores temporales de un fragmento del sustrato. En las reacciones catalizadas por complejos multienzimáticos, incluso pueden llegar a transportar un sustrato de un enzima a otro.

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

1. Oxidorreductasas. Catalizan reacciones de oxidorreducción, es decir, transferencia de hidrógeno (h) o electrones (e-) de un sustrato a otro.
2. Transferasas. Catalizan la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) de un sustrato a otro.
3. Hidrolasas. Catalizan las reacciones de hidrólisis.
4. Liasas. Catalizan reacciones de ruptura o soldadura de sustratos.
5. Isomerasas. Catalizan la interconversión de isómeros.
6. Ligasas. Catalizan la unión de dos sustratos con hidrólisis simultánea de un nucleótido trifosfato (ATP, GTP, etc.).

Modo de acción de los enzimas

La actuación de la enzima permite que los reactantes (sustratos) se unan a su centro activo con una orientación óptima para que la reacción se produzca y modifique las propiedades químicas del sustrato unido a su centro activo, debilitando los enlaces existentes y facilitando la formación de otros.

Una molécula de enzima no actúa siempre a la misma velocidad. La actividad está modulada por cambios de pH o temperatura. La velocidad de reacción depende de las concentraciones de los sustratos y sus cofactores. La presencia de los productos finales puede hacer que la reacción sea más lenta, o incluso invertir su sentido.

Ciertas moléculas pueden inhibir la acción catalítica de un enzima: son los inhibidores. Estos inhibidores bien pueden ocupar temporalmente el centro activo por semejanza estructural con el sustrato original (inhibidor competitivo) o bien alteran la conformación espacial del enzima, impidiendo su unión al sustrato (inhibidor no competitivo). Hay enzimas que pueden adoptar 2 conformaciones interconvertibles llamadas R (relajada) y T (tensa). R es la forma más activa. Las formas R y T se encuentran en equilibrio $R \rightleftharpoons T$. Ciertas sustancias tienden a estabilizar la forma R. Son los llamados moduladores positivos. El propio sustrato es a menudo un modulador positivo. Las moléculas que favorecen la forma R pero que actúan sobre una región de la enzima distinta del centro activo son los activadores alostéricos. Las sustancias que favorecen la forma T y disminuyen la actividad enzimática son los moduladores negativos. Si estos moduladores actúan en lugares distintos del centro activo del enzima se llaman inhibidores alostéricos.

4.1 ENZIMAS TERMOESTABLES

Las enzimas termoestables tienen las siguientes características como ser:

- * Elevada estabilidad térmica
- * Elevada estabilidad en presencia de disolventes orgánicos
- * Temperatura óptima elevada
- * Baja actividad a temperaturas moderadas

Y estas se han convertido atractivas para la industria ya que son estables a condiciones extremas. Por ejemplo, en la industria de los detergentes y jabones para la ropa de uso hogareño se utilizan biocatalizadores que quiten las manchas a baja temperatura, mientras que en tratamientos de esterilización de ropa de quirófano se prefiere un jabón que tenga biocatalizadores que funcionen a altas temperaturas (Vera, 2007)

4.1.1 XILANASAS

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces β -1,4 presentes en los polisacáridos de hemicelulosa (figura 5). Cabe señalar que la lignocelulosa es la fuente de energía renovable más abundante de la tierra y está formada por tres componentes principales que son: celulosa, hemicelulosa y lignina, y su contenido es bajo en cenizas, proteínas, grasas y ceras (Asha, 2007). Las xilanasas son producidas por una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos y bacterias. La producción microbiana de esta enzima está sujeta a diferentes mecanismos de regulación, la inducción que se lleva a cabo por su sustrato natural xilano y la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como la xilobiosa. Este modelo sugiere, además, la existencia de un nivel basal de enzimas; aquí el microorganismo sintetiza y exporta a la superficie celular pequeñas cantidades de enzimas, que inician la hidrólisis del sustrato y producen pequeños oligosacáridos que entran a la célula siendo los verdaderos inductores que encienden la transcripción de los genes.

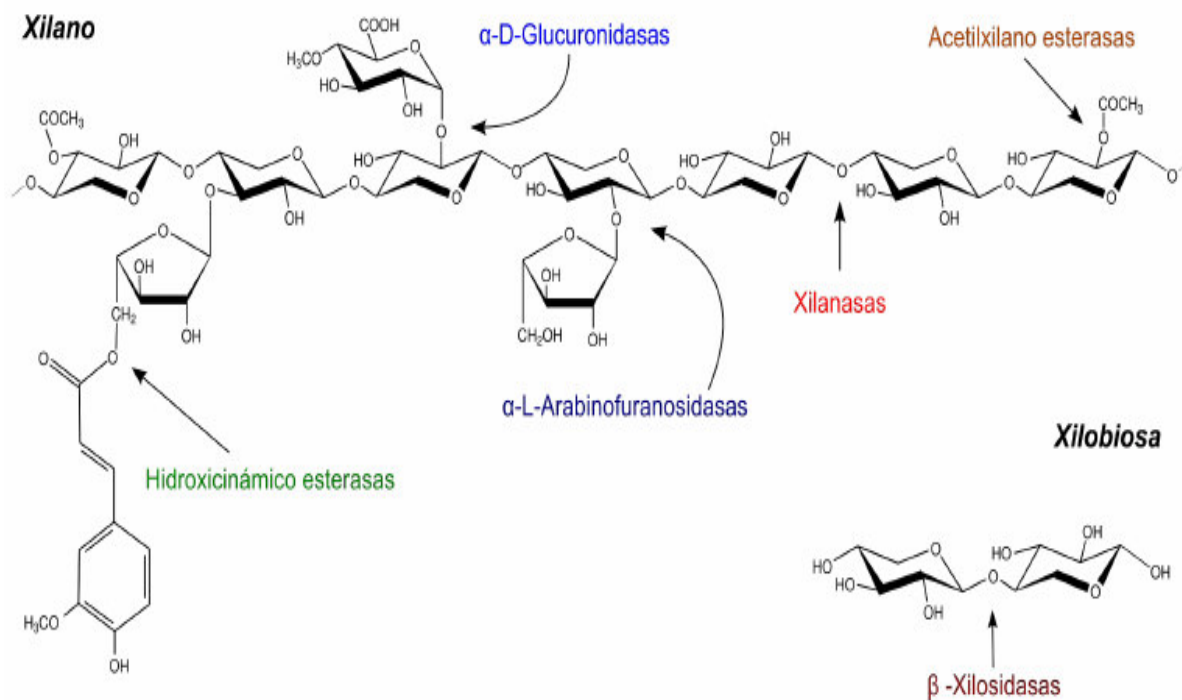


Figura 5. Enzimas necesarias para la degradación del xilano y lugares sobre los que actúan.

La aplicación de las xilanasas en la biotecnología son diversas como ser: uso de la bioconversión de xilano a xilitol, un edulcorante bajo en calorías utilizado también en salud dental y como laxante (Polizeli *et al.* 2005), también se lo emplea como aditivos de detergentes, en la producción de oligosacáridos farmacológicamente activos como antioxidantes, en la preparación de protoplastos a partir de células vegetales, y en la síntesis de nuevos tensioactivos gracias a la actividad transxilosidasa que poseen algunas xilanasas (Collins *et al.*, 2005; Ponce, 2002).

En la industria textil también pueden utilizarse las xilanasas conjuntamente con las pectinasas para degradar la hemicelulosa y pectina de materias primas vegetales como lino o cáñamo, liberándose así las fibras de celulosa para la fabricación del tejido, las xilanasas se utilizan ampliamente como aditivos de piensos para animales monogástricos (como cerdos y gallinas), junto a otras enzimas despolimerizantes (celulasas y pectinasas), para aumentar el valor nutricional de los piensos. En la industria vinícola y de zumos la aplicación de xilanasas junto con pectinasas facilita la extracción y clarificación del producto final, también pueden utilizarse xilanasas en la elaboración de cervezas para reducir la viscosidad y turbidez de éstas, y mejorar a la vez el filtrado de la malta (Polizeli *et al.* 2005). Como aditivos en panificación, las xilanasas degradan las hemicelulosas de la harina, lo que resulta en una redistribución del agua de los

pentosanos al gluten, hecho que acaba comportando un aumento del volumen y de la calidad de la miga, además de un aumento en la durabilidad del pan (Gallardo, 2007).

Actualmente, la principal aplicación industrial de las xilanasas se da en la industria papelera, el tratamiento con xilanasas de la pasta de papel, previo al blanqueo químico, comporta importantes beneficios económicos y ventajas medioambientales. Los prometedores resultados obtenidos están determinando una expansión del uso de xilanasas en la industria, con el consiguiente aumento de la importancia de éstas en el mercado mundial de enzimas. (Ponce Loyola *et al* 2002).

4.1.2 β -GLUCOSIDASAS

Las β -glucosidasas (β -D-glucoside glucohydrolasa, EC 3.2.1.21) constituyen un grupo de estudio de las hidrolasas que está aislado de tres miembros de microorganismos distintos eucariotes, bacteria y archaea (Gueguen *et al.*, 1996). Estas enzimas actúan sobre la celobiosa que es la unidad estructural de la celulosa polimérica lineal no ramificado formado por moléculas de residuos de β -glucosa hidrolizándolo y dando como producto final la glucosa (figura 6).

La actividad de las β -glucosidasas por la celobiosa y otros oligosacaridos disminuye al aumentar la polimerización de estos, no siendo activo sobre la celulosa polimérica.

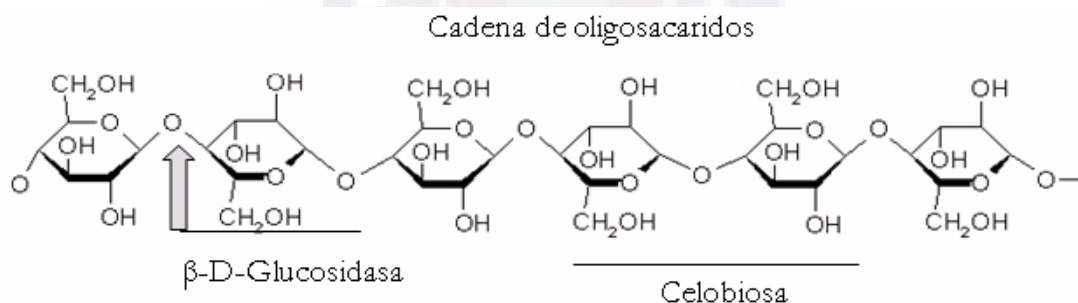


Figura 6. Enzima β -glucosidasas hidroliza los enlaces β 1-4 de los oligosacaridos.

Las aplicaciones de las β -glucosidasas son:

- Muchas β -glucosidasas disponen de actividad hidrolítica y además de actividad transferasa o transglucosidasa por la que pueden generar productos de mayor tamaño sobre los oligosacáridos, lo cual hace de interés para su utilización en la biosíntesis de oligosacáridos.

- Las β -glucosidasas tienen una utilización muy importante en la producción de etanol usando varios residuos agrícolas.
- β -glucosidasas en la industria de vinos y zumos de frutas: Los compuestos responsables de aromas en muchas plantas (terpenos) se encuentran glicosilados y se almacenan como glicoconjugados no volátiles e inodoros. La β -glucosidasa cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos liberando los compuestos volátiles (monoterpenos) por lo que se utilizan en las industrias de zumos de frutas y sus derivados, principalmente vinos, para potenciar el aroma de ellos.

5 ENCAPSULACION DE BACTERIAS

El alginato es un componente abundante en la naturaleza, es extraído del alga (*Macrocystis phaeophyceae*). La aplicación industrial del alginato radica en la habilidad de retener agua, este gel tiene propiedades de viscosidad y estabilidad; la temperatura es independiente de la relación con el gel debido a que presenta una transición de multicaciones (Ca^{2+}) por lo cual tiene una alta estabilidad formando la matriz para encapsular las células (Ingar *et al.*, 2005).

El alginato consiste en polímeros cuyas unidades monoméricas son los ácidos urónicos (azúcares donde el grupo CH_2OH del C6 ha sido reemplazado por un grupo COOH , una de las unidades deriva de la D- manosa y se llama ácido D- manurónico (M) la otra es su epímero en C5, el ácido L- gulurónico (G), si bien estos monómeros solo difieren en la configuración del C5, hay una enorme diferencia entre ellos, ya que las conformaciones espaciales son diferentes lo que provoca una gran diferencia estructural entre los bloques poliédricos (figura 7). Se encuentran bloques de homopolímeros tanto (G) como (M) y también heteropolímeros secuenciales alternados (G-M). La distribución de estos bloques determina las propiedades individuales del compuesto obtenido. Los ácidos algínicos tienen un grado de polimerización variable entre 100 a 3.000 unidades, la relación porcentual entre estos ácidos es uno de los valores que caracteriza a un alginato, oscilando entre 0,4 a 2,4 (Ingar *et al.*, 2005).

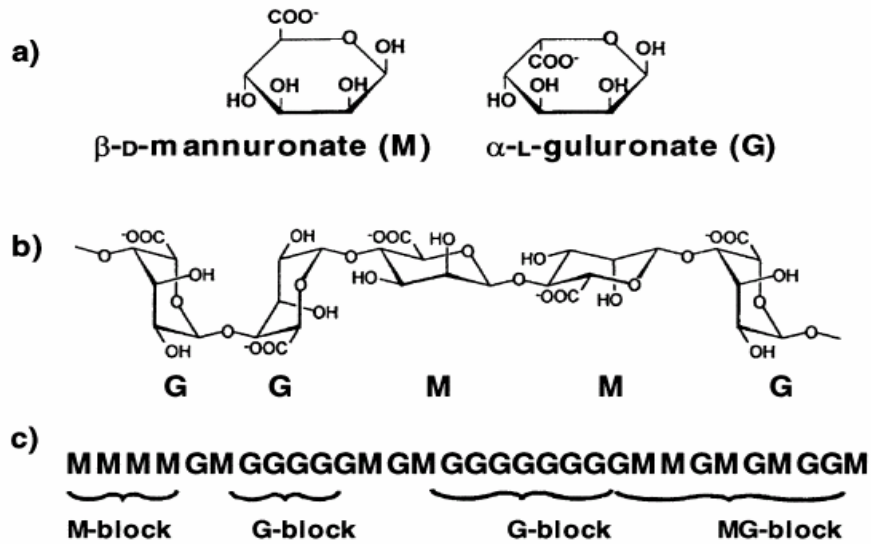


Figura 7. Estructura y características del alginato:(a) monómeros de alginato, (b) conformación química, (c) bloque de distribución (Ingar et al., 2005).

La conformación estructural es una de las características más importantes de los alginatos y del ácido algínico ya que reacciona con cationes polivalentes, por ejemplo el calcio, este se ubica en los espacios formados entre los bloques de ácido glucurónico, estructura conocida como “caja de huevo” figura 8.

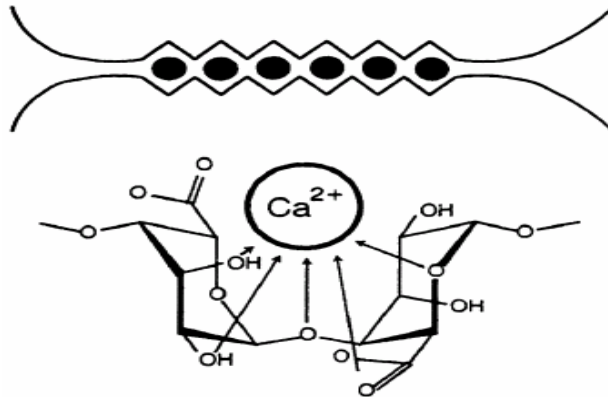


Figura 8. Formación de la caja de huevo y la ubicación de los iones polivalentes que sirven de enlace de dos moléculas de polímero.

Esto permite la unión de dos cadenas de polímero con lo que se consigue aumentar mucho el peso molecular y el volumen de las moléculas, aumentando por consiguiente la viscosidad, dentro del polímero existen las tres clases de bloques (M.M, G.G y M.G) teniendo estos últimos alternancia uniforme, todas las uniones son 1-4 siendo las del ácido manurónico de configuración β y las del gulurónico de configuración α , la reactividad con el calcio para la formación de geles es una función directa de la longitud promedio de los bloques (G), los alginatos que poseen grandes

fracciones (G-G) presentan una fuerte capacidad gelificante. Por lo tanto, la viscosidad de las soluciones de alginatos depende de la longitud de las moléculas cuanto mayor sea la longitud de las cadenas más alta será la viscosidad para una misma concentración, al disolverse en agua las moléculas se hidratan y aumenta su viscosidad. Las moléculas disueltas no son completamente flexibles, la rotación a lo largo de los enlaces glucosídicos en los bloques G, se ve impedida dando lugar a un endurecimiento de la cadena. Estas soluciones son altamente viscosas.

La inmovilización de células en la matriz del gel ayuda a separar, proteger a las células (figura 9) y de que no tenga un contacto directo con el medio de cultivo siendo una forma que las bacterias produzcan enzimas extracelulares (Kailasapathy, 2002).

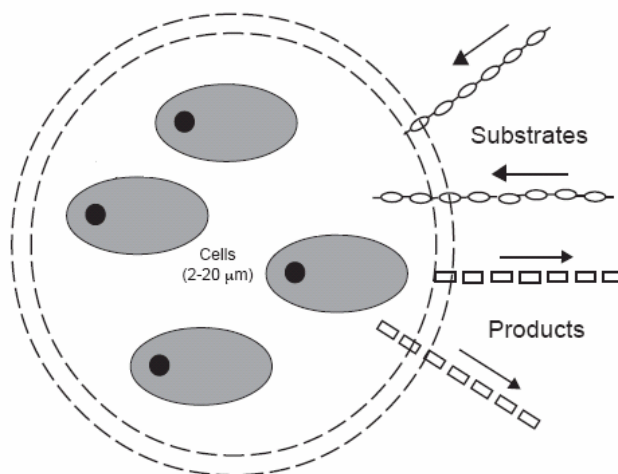


Figura 9. Principio de la encapsulación, transporte extracelular de metabolitos y nutrientes (Kailasapathy 2002)

6 RESIDUOS AGRICOLAS

Son todos aquellos residuos que se generan a partir de cultivos de leña o de hierba y los producidos en el desarrollo de actividades propias de estos sectores. Estos desechos se obtienen de los restos de cultivos o de limpiezas que se hacen del campo para evitar las plagas o los incendios y pueden aparecer en estado sólido, como la leña, pajas de cereales, el bagazo de la caña de azúcar, la cáscara de arroz, etc. o en estado líquido, como los purines u otros elementos residuales obtenidos en actividades agropecuarias (Romero, 2003). Los dos grupos de residuos se generan por necesidades forestales, no energéticas, y son materiales que no tienen calidad suficiente para otras aplicaciones que no sean las energéticas.

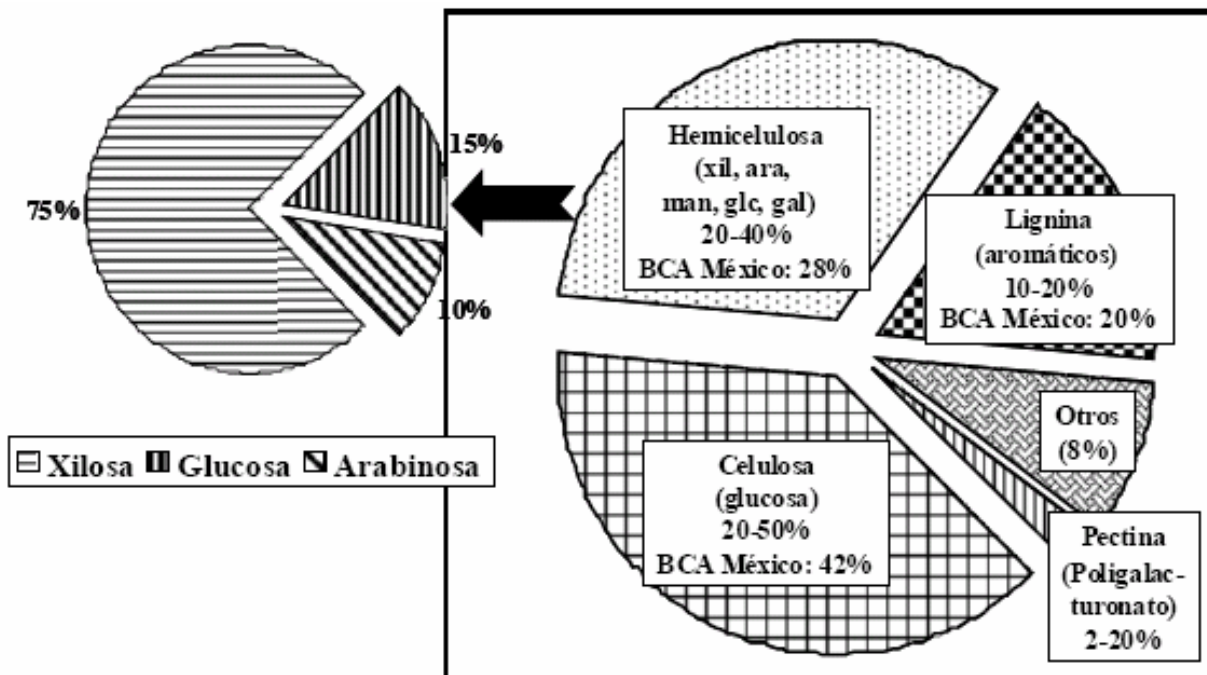


Figura 10. Composición genérica de residuos agroindustriales (biomasa o lignocelulosa).

Estos residuos lignocelulósicos están constituidos principalmente por tres tipos de componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina (figura 10). Los residuos agrícolas, tales como la cascarilla de arroz, paja de quinua, paja del trigo y paja de soya tienen la siguiente composición (tabla 2).

Tabla 2. Composición de los residuos lignocelulósicos (hemicelulosa, celulosa, lignina)

	Composición de los desechos agrícolas			
	cascarilla de arroz	paja de quinua	paja de trigo	paja soya
Hemicelulosa %	25	8	21-25	12,6
Celulosa %	34	73	33-38	39,2
Lignina %	23	6	23	11,9
Proteínas %	8	10,87	13,2	42
Niacina mg/Kg	33	dnc.	61,6	30,36
Ac. Pantoténico mg/Kg	11	dnc.	13,2	14,08
Riboflavina mg/Kg	1,32	dnc.	1,1	3,08
Tiamina mg/Kg	3,08	dnc.	5,06	

Dnc. Dato no conocido

7 HIDROLIZADOS

La hidrólisis de los residuos lignocelulósicos tiene como finalidad la transformación de los polisacáridos que estos están compuestos por azúcares sencillos y que puedan ser fermentables a su vez. También son utilizados en distintos procesos de interés industrial, como en la producción de etanol, acetona, butanol, etc. Esta hidrólisis puede llevarse a cabo tanto por vía química como por vía física.

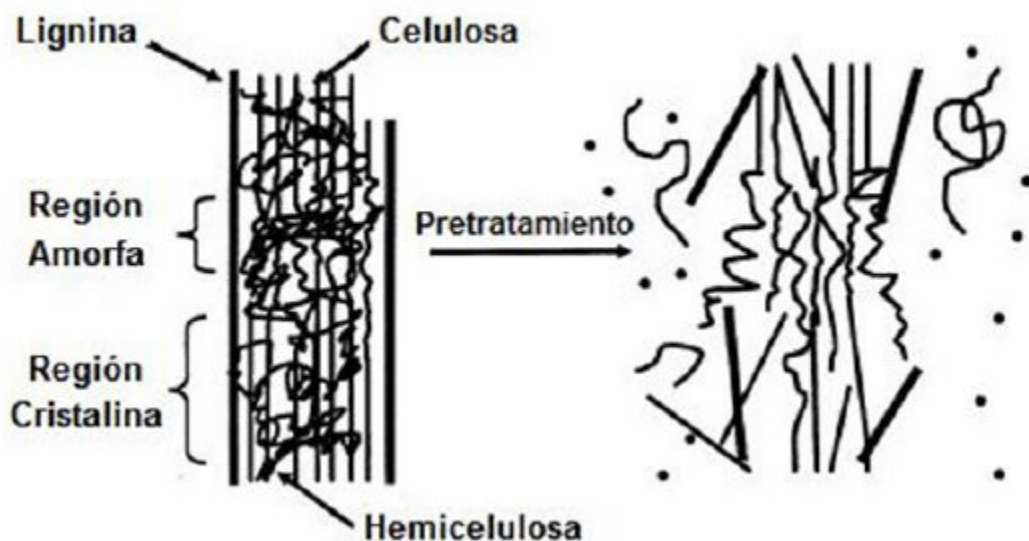


Figura 11. Representación esquemática del efecto de los pre-tratamientos (Moiser et al., 2005)

Durante el pre-tratamiento se somete la biomasa lignocelulósica a una acción directa a determinadas condiciones de temperatura y tiempo de hidrólisis (figura 11). Una vez realizado se obtiene un material pretratado formado por una fracción líquida y una fase sólida, donde se recogen la mayor parte de los productos solubilizados que se encuentran en la fase líquida de la materia prima durante el pretratamiento (extractivos y hemicelulosas) y en la fracción sólida se encuentran los restos de los componentes, principalmente la celulosa y la lignina.

7.1 HIDRÓLISIS ACIDA

La hidrólisis ácida consiste en someter la biomasa (lignocelulosa) a ácidos concentrados o diluidos, a una temperatura relativamente elevada 120—150 °C; con este pretratamiento se solubiliza la hemicelulosa en oligómeros, provocando una hidrólisis del 80-100% y

especialmente existen altas conversiones de xilano a xilosa, glucoronato, monómeros, furfural, HMF y otros; las reacciones de hidrólisis también producen la solubilización de la lignina y su precipitación, siendo más pronunciado durante el pre-tratamiento con ácidos fuerte en comparación con el ácido diluido (Clarkson *et al.*, 1997). El mecanismo de acción de los ácidos sobre la materia lignocelulósica se da por la introducción de hidrógenos en los enlaces de estos polímeros, rompiendo de esta forma los enlaces, a la vez que la temperatura produce una hinchazón de la biomasa llegando a estallar y solubilizarse.

7.2 HIDRÓLISIS ALCALINA

La hidrólisis consiste en someter la biomasa a un álcali, poniéndolos en contacto, a la vez sometiendo esa mezcla a una temperatura elevada por un tiempo de hidrólisis; de tal pre-tratamiento existe una hidrólisis de >50% de la hemicelulosa; en la materia lignocelulósica existe un sustancial hinchamiento de la celulosa para su posterior hidrólisis (Sánchez Elena). Durante el tratamiento alcalino las primeras reacciones que tienen lugar son solvatación y saponificación. Esto provoca un estado de inflamación de la biomasa haciéndole más accesible para las enzimas y las bacterias.

También el xilano puede ser selectivamente eliminado con hidróxido de potasio acuoso. (Gossett *et al.*, 1982), la extracción alcalina también puede causar la solubilización, la redistribución y condensación de la lignina; teniendo también acción sobre la celulosa, provocando que se solubilize y se torne más densa (Pettersen, 1984).

7.3 HIDRÓLISIS CON AMONIO

Este pre-tratamiento es llamado explosión de fibra de amoníaco (AFEX); esta hidrólisis mejora sustancialmente la digestión del material lignocelulósico. En este proceso de hidrólisis la biomasa se trata con amonio el cual es una base débil y que provoca la explosión de la fibra, actúa sobre los puentes diferulicos provocando la lisis. Este pre-tratamiento es necesario para que los carbohidratos estructurales se fraccionen y sean accesibles a las enzimas.

7.4 HIDRÓLISIS TÉRMICA

Este pre-tratamiento físico consiste en someter la materia cruda a temperaturas por encima de 150-180 ° C, Durante este pre-tratamiento la hemicelulosa se solubiliza y poco después la lignina, pero existe un riesgo de formación de grupos fenólicos y compuestos heterocíclicos, como el alcohol vinílico, furfural y el HMF (Ramos, 2003).



CAP. III JUSTIFICACIÓN

La contaminación en el mundo va incrementándose de una forma increíble, siendo las industrias las principales que contribuyen a la contaminación, debido al material que utilizan para la producción de determinados productos como ser compuestos orgánicos e inorgánicos. Por ejemplo en la industria del papel se utiliza compuestos órgano clorados o sus derivados para el blanqueado del papel, algunos de esos compuestos son tóxicos, mutagénicos, persistentes y bioacumulativos que causan numerosos daños en los sistemas biológicos (Gallardo, 2007).

La utilización de compuestos inorgánicos en la industria como catalizadores químicos o para la extracción de ciertas sustancias de interés económico provocan gran contaminación ambiental, siendo estos compuestos no específicos para las reacciones produciendo productos secundarios los cuales requerirán de una etapa de purificación, siendo no económicamente rentables.

Otra fuente de contaminación son los residuos agrícolas, que al no encontrarse alguna aplicabilidad son quemados, contaminando de esta forma el medio ambiente, siendo necesario su control para evitar sus deterioros ambientales.

Una forma de dar una solución a estas problemáticas es a través de procesos biotecnológicos, que pretenden hacer uso de la diversidad microbiana del planeta para producir o modificar sustancias útiles; por ello la relación entre la biodiversidad y biotecnología es bastante estrecha; a mayor conocimiento de la biodiversidad, existirán más oportunidades para el mejor aprovechamiento de los recursos. El desarrollo de nuevos productos y procesos claves en el desarrollo de la biotecnología depende del hallazgo de nuevas fuentes de materiales biológicos y del desarrollo de nuevas fuentes de consumo o en la utilización de nuevos microorganismos.

Los microorganismos extremófilos tiene gran aplicación en la industria por la estabilidad que presentan sus metabolitos, conocidas como la química verde, los cuales empiezan a sustituir a los compuestos orgánicos e inorgánicos disminuyendo de esta forma la contaminación ambiental; las enzimas provenientes de bacterias termófilas tiene un gran interés en la industria por sus diversas aplicaciones en diversos procesos, a la vez que presenta una estabilidad cuando se lo somete a condiciones extremas como ser temperatura, concentraciones de sales, pH.

El interés biotecnológico de las xilanasas y β -Glucosidasas se debe a la amplia utilización. Por ejemplo las xilanasas que son utilizadas en la bioconversión de xilano a xilitol, en la industria textil, son aditivos de piensos para animales monogástricos, en la elaboración de cerveza, en la industria papelera en el proceso de blanqueo para la elaboración del papel, etc. Las β -Glucosidasas son utilizadas en la biosíntesis de oligosacáridos por su actividad transferasa, producción de etanol, en la industria del vino, etc., siendo uno de los pocos motivos por los cuales tiene interés para este estudio.

El propósito de este trabajo es incrementar la producción enzimática extracelular de las xilanasas y β -glucosidasas de bacterias anaerobias termófilas. El incremento de la producción de esta enzima se conseguirá cultivando cepas bacterianas en medio de cultivo batch del cual se realizará una selección de la cepa bacteriana con mayor actividad xilanolítica y β -glucosidasa; la cepa seleccionada se la cultivará dándole condiciones óptimas de cultivo como ser: fuente de carbono, fuente de nitrógeno y probando a diferentes pH de medio de cultivo, tanto en cultivos con bacterias libres e inmovilizadas.

CAP. IV OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Optimizar las condiciones de cultivo anaeróbico termófilo para aumentar la producción enzimática de xilanasas y β -glucosidasas, con cepas bacterianas encapsuladas y libres.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar una cepa bacteriana con mayor producción enzimática de xilanasas y β -glucosidasas.
- Optimizar las condiciones de cultivo en términos de fuente de carbono, fuente de nitrógeno y pH del medio de cultivo en sistemas libres e inmovilizados.
- Evaluar diferentes procesos de pretratamiento de residuos agrícolas utilizados como fuente de carbono.
- Establecer las condiciones de pH y temperatura óptima para actividad enzimática.

CAP. V MATERIAL Y MÉTODOS

1. Microorganismos

Se utilizaron cepas bacterianas anaerobias termófilas aisladas de muestras de lodo de aguas termales obtenidas de la región altiplánica de Bolivia (Tabla 3), mediante técnicas de cultivo: Roller tubes, cultivo bifásico y encapsulación en alginato de calcio, que mostraron tener actividad hidrolítica (Rios *et al.*, 2007).

Tabla 3. Origen de las cepas bacterianas

Cepa	Origen	Localización Geográfica
FT3	Chaquí Potosi- Bolivia	S 19° 37.46,0" W 65° 34.302"
2B	Aguas termales de Capacho	S 17° 53.483" W 67° 02.668"
P5	Chaquí Potosi- Bolivia	S 19° 37.46,0" W 65° 34.302"

1.1. Medio de cultivo

Las cepas bacterianas FT3, 2B, P5 fueron cultivadas en el medio base mineral 11 la cual esta compuesto de sol. A (NH_4Cl 200g/L, NaCl 10g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5g/L), sol. B ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 200g/L), sol 2 ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, HCl 25% 6.5 mL, H_3BO_3 60mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 120mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25mg/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 25mg/L, ZnCl_2 70 mg/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15 mg/L), sol. 3 (Na_2SeO_3 3 mg/L, NaOH 0.5g/L), sol. 4 (NaHCO_3 8.5g/100mL), sol. 7 (Biotina 1mg/L, PABA 5mg/L, Vit. B_{12} 5mg/L, Tiamina 10 mg/L) y sol. Reductora ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 2%), utilizando como fuente de carbono el xilano 0.2%, siendo un cultivo base para la producción de las enzimas xilanasas y β -glucosidasas.

Se estableció un sistema de anaerobiosis en los medios de cultivos a través de la gasificación con nitrógeno de los viales con medios de cultivo según la técnica de hungate para anaerobios (Millar y Wolin, 1973), los cultivos fueron incubados a una temperatura de 60° C.

2. Encapsulación en perlas de alginato

La inmovilización consiste en la retención física de las células en las cavidades de una matriz sólida porosa (Bressel *et al.*, 2008), a la vez que esta técnica fue desarrollada como una forma de

protección del material biológico de factores externos tales como el cambio de pH, metabolitos tóxicos.

La técnica consiste en mezclar alginato de sodio al 1.5% con la muestra, la mezcla fue de una relación de 3:1 respectivamente. La suspensión-mezcla debe ser homogénea, después es dispersada mediante goteo con jeringa 27G en una solución de cloruro de calcio 1.5% en agitación constante en el cual se llegará a polimerizar (figura 12) La muestra fue previamente centrifugada a 12000 rpm. Por un tiempo de 10 minutos, con el propósito de concentrar la muestra y reducir el volumen del mismo de 3 mL a 0.5 mL de muestra.

La polimerización del alginato en el cloruro de calcio se da en constante agitación por el lapso de dos horas para permitir la formación de las perlas (Ivanova *et al.*, 2000-2002); una vez transcurrido ese tiempo se procede al lavado de las perlas formadas con agua destilada estéril varias veces con un promedio de cinco veces, con el propósito de eliminar todo el cloruro de calcio; las perlas se trasvasaron al medio de cultivo en condiciones anaerobias utilizando la cámara de anaerobiosis. Todo material y reactivo usado para la formación de las perlas fue esterilizado por autoclave, excepto el alginato de sodio que fue irradiado con luz ultravioleta por 30 minutos para su esterilización.

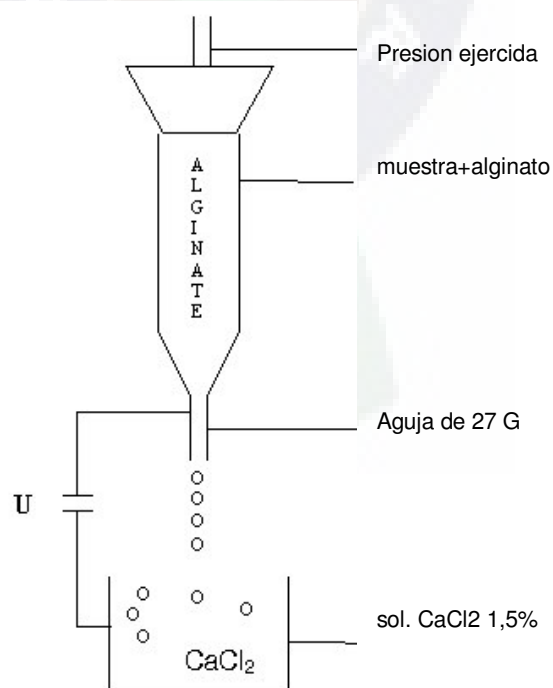


Figura 12. Formación de las perlas de alginato.

3. Optimización de la fuente de nitrógeno

Para la optimización de la fuente de nitrógeno se realizó el siguiente diseño factorial de cuatro niveles dando valores que representan a los compuestos: NaNO_3 representado por el valor -2, Extracto de levadura representado por el valor -1, NH_4Cl representado por el valor 0, urea representado por el valor +1 y tomando dos variables a las cuales también se le asignó un valor: células libres representada por el valor de 1 y células inmovilizadas representada por el valor de 2 (tabla 4). Realizando cada experimento por triplicado.

Tabla 4. Diseño factorial para la optimización de la fuente de nitrógeno

<u>N° Exp.</u>	<u>F. Nitrógeno</u>	<u>Variable</u>
1	-2	1
2	-1	1
3	0	1
4	1	1
5	-2	2
6	-1	2
7	0	2
8	1	2

Se tomó en cuenta la concentración de nitrógeno del medio mineral 11, realizando una variación de la solución A, la cual fue la concentración de referencia para el cálculo de los demás compuestos.

4. Optimización del pH del medio de cultivo

Para la optimización del pH del medio de cultivo se realizó el siguiente diseño factorial de 6 niveles: pH 10, 9, 8, 7, 6, 5. el diseño se lo realizó tanto para células libres e inmovilizadas (tabla 5). Realizando cada experimento por triplicado.

Tabla 5. Diseño factorial para la optimización del pH del medio de cultivo

<u>N° Exp.</u>	<u>pH</u>
1	5
2	6
3	7
4	8
5	9
6	10

5. Pre-tratamiento de residuos agrícolas

Se realizó un pre-tratamiento del material crudo con distintos métodos de hidrólisis:

Hidrólisis alcalina

Para este método la materia cruda fue tratada con NaOH 1% y KOH 1%, en una relación de 2:25 y llevada al proceso de autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos.

Pre-tratamiento con amonio

En este método la materia cruda fue tratada con NH₄ 29.5% en una relación de 5:50 (dejar a temperatura ambiente por 10 días)

Hidrólisis ácida H₂SO₄

Este método consiste en tratar la materia cruda con ácido sulfúrico al 1.1% en una relación de 22:2 de materia cruda llevar al proceso de autoclave a una temperatura de 121°C por un tiempo de 15 minutos.

Hidrólisis térmica

Este proceso se realizó autoclavando dos veces la materia cruda (2 g) con un volumen de agua de 18 ml a 121°C por un tiempo de 15 minutos.

En todos los casos se realizó la valoración de COD (demanda química de oxígeno) para calcular la cantidad de materia orgánica oxidable y determinar la concentración a utilizarse en los experimentos de optimización.

Para la optimización se realizó un diseño factorial del pre-tratamiento asignándoles valores que los representen: hidrólisis ácida 1, hidrólisis térmica 2, pre-tratamiento con amonio 3, hidrólisis alcalina NaOH 4, hidrólisis alcalina KOH 5; asignando también valores a la materia cruda: cascarilla de arroz valor 1, paja de quinua valor 2, paja de trigo valor 3, paja de soya valor 4 (tabla 6).

Tabla 6. Diseño experimental para el pre-tratamiento

Nº Exp.	Materia cruda	Hidrolizado
1	1	1
2	2	1
3	3	1
4	4	1
5	1	2
6	2	2
7	3	2
8	4	2
9	1	3
10	2	3
11	3	3
12	4	3
13	1	4
14	2	4
15	3	4
16	4	4
17	1	5
18	2	5
19	3	5
20	4	5

6. Optimización de la fuente de carbono

Para la optimización de la fuente de carbono se realizó tanto con materia cruda como con hidrolizado; realizando un diseño factorial de cinco niveles representado por valores: cascarilla de arroz valor 1, paja de quinua valor 2, paja de trigo valor 3, paja de soya valor 4, xilano valor 5 (tabla 7).

Tabla 7. Diseño factorial para la optimización de la fuente de carbono

Nº Exp	F. Carbono
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5

Una vez seleccionado la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno, se optimizó la concentración de ambos (tabla 8), asignándoles valores a cada concentración del cual se realizó un diseño experimental (tabla 9), cada experimento se lo realizó por triplicado.

Tabla 8. Concentraciones de extracto de levadura (fuente de nitrógeno) paja de soya como materia cruda (fuente de carbono)

Diseño Factorial		
F. Nitrogeno	Diseño Factorial	F. Carbono[g/80mL]
0,2 g/L	-2	0,5
0,4 g/L	-1	1
1 g/L	0	2
2,5 g/L	1	4
5 g/L	2	6

Tabla 9. Diseño experimental para la optimización de la concentración de fuente de nitrógeno y fuente de carbono.

Nº Experimento	F.Nitrogeno	F.Carbono
1	-2	-2
2	-1	-2
3	0	-2
4	1	-2
5	2	-2
6	-2	-1
7	-1	-1
8	0	-1
9	1	-1
10	2	-1
11	-2	0
12	-1	0
13	0	0
14	1	0
15	2	0
16	-2	1
17	-1	1
18	0	1
19	1	1
20	2	1
21	-2	2
22	-1	2
23	0	2
24	1	2
25	2	2

7. Medición de enzimas intracelulares

Para la medición de enzimas intracelulares se procedió a la lisis de la bacteria por sonicación; el cual requiere de pruebas previas a la sonicación. Primero se tomó 1 mL de muestra la cual fue sonicado 5 minutos pero a distintas amplitudes que son :10%, 15%, 20%, 30% y 40%; a la vez se tenía un control que era una muestra sin sonicar; se midió tanto enzimas intracelulares, extracelulares y totales.

8. Condiciones de actividad enzimática

Se realizó la caracterización de los extractos enzimáticos procedentes de la cepa bacteriana FT3. Los cultivos de bacterias se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos; los sobrenadantes obtenidos contienen los extractos enzimáticos.

La influencia de la temperatura en la actividad enzimática se estudió en un rango de: 30° C a 90° C por medición de la velocidad de reacción a pH 6. el efecto de la temperatura en la estabilidad se estudió incubando el crudo enzimático a varias temperaturas de: 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90° C por un espacio de 30 minutos.

El efecto del pH en la actividad enzimática se estudio a 80° C y se varió el pH del medio de reacción desde 3 hasta 10 consecutivamente; la influencia del pH en la estabilidad de la enzima fue estudiada por la exposición del crudo enzimático a valores de pH de 3 (tampón citrato de sodio 0.05 M), 4, 5 (tampón acetato de sodio 0.05 M), 6, 7, 8 (tampón fosfato de sodio 0.05 M), 9 (tampón cloruro de amonio 0.05 M) y 10 (tampón carbonato de sodio 0.05M) y a 80° C durante 30 minutos.

9. Determinaciones analíticas

Determinación de xilanasas

Se utilizó el método DNS el cual determina la presencia de grupos carbonilos libres (C=O) de los llamados azúcares reductores. Se basa en la utilización de ácido 3,5-dinitrosalicílico para provocar la oxidación de los azúcares y al mismo tiempo su propia reducción (figura 13). Un mol de azúcar reaccionara con un mol de ácido 3,5-dinitrosalicílico, dando lugar a una relación

estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra (Millar y Wolin, 1973).

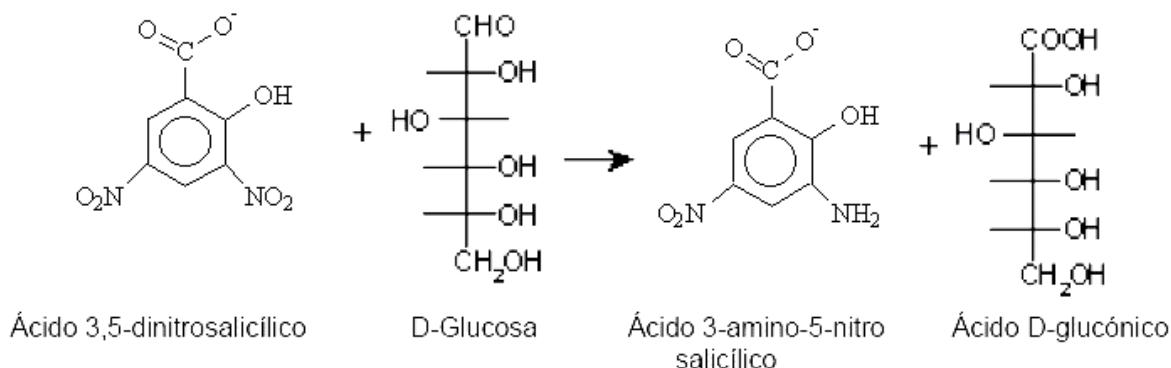


Figura 13. Reacción enzimática de las xilanasas, oxidación de azúcares reductores

Esta reacción es colorimétrica: el ácido 3,5-dinitrosalicílico es de color amarillo, mientras que la aparición del ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico provoca un viraje a pardo oscuro-marrón, cuya intensidad será, proporcional a la cantidad de azúcares reductores.

Tabla 10. Procedimiento analítico colorimétrico para la determinación de la actividad enzimática de xilanasas.

Procedimiento			
	Blanco	Control	Test
Sustrato *	450 uL	450 uL	450 uL
Muestra**			50 uL
Agua destilada	50 uL		
Incubar a 80°C por 30 minutos			
Rvo. DNS	750 uL	750 uL	750 uL
Muestra		50 uL	
Incubar a 100 °C por 5 minutos			
Dejar enfriar a temperatura ambiente			
Leer al espectrofotómetro a 540 nm.			

Sustrato* 0.2% xilano con tampón fosfato pH 6

La muestra** Procedente de un cultivo batch que fue centrifugada a 10000 rpm tiempo 10min.

Para la interpretación de los datos se deben extrapolar en la curva de calibración realizada con xilosa (Anexos).

Determinación de la actividad β -glucosidasa

La determinación de la actividad β -glucosidasa está basada en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol (pNP) liberado por acción catalítica del enzima sobre un sustrato artificial, el p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) ver figura 14. Este método determina la capacidad de liberar un umol de p-nitrofenol por minuto bajo condiciones estandarizadas (Hanson and Patrick Adlercreutz, 2001).

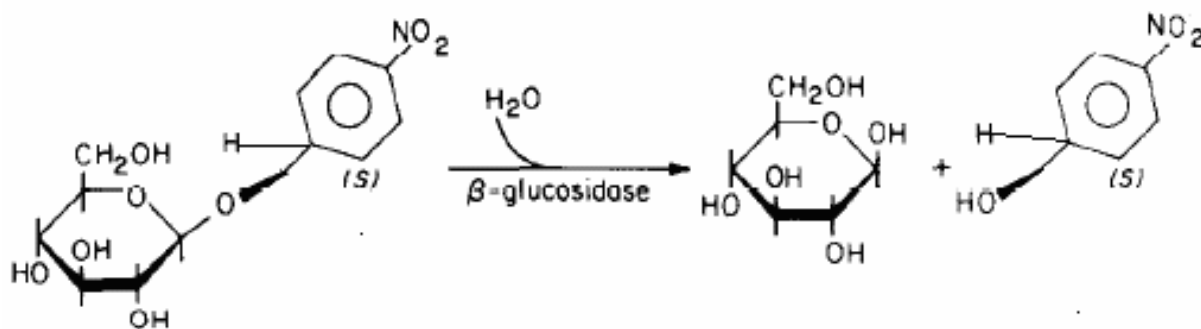


Figura 14. Reacción enzimática de las β -glucosidasas

Tabla 11. Procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática de la β -glucosidasa.

β -Glucosidasas			
	Sustrato *	Muestra **	Agua destilada
Blanco	960 uL		40 uL
Test	960 uL	40 uL	

Incubar a 80 °C por 30 minutos
Dejar enfriar a temperatura ambiente
Leer al espectrofotometro 405 nm.

Sustrato * 2.8 mM PNPG con tampón citrato 0.5 M pH 5

La muestra ** proveniente de un cultivo batch fue centrifugada 10000 rpm tiempo 10 min.

Para la interpretación de los datos se deben interpolar a una curva de calibración de pNP (Anexo).

Determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas totales se realizará por el método de Lowry, usando como estándar albúmina sérica bovina.

Tabla 12. Procedimiento analítico colorimétrico para la determinación de Proteínas Totales

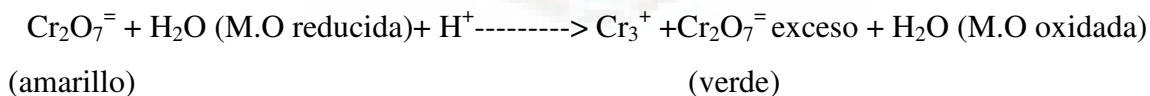
	Blanco	Test
Reactivo A	1000 uL	1000 uL
Muestra		100 uL
Agua destilada	100 uL	
Mezclar e incubar a 37 °C por 20 min.		
Reactivo B	100 uL	100 uL
Mezclar e incubar a 37 °C por 20 min.		
Leer a 660 nm.		

La muestra proveniente de un cultivo batch fue centrifugada a 10000 rpm. por 10 min.

Para la interpretación de los datos obtenidos estos deben ser extrapolados a una curva de calibración realizada con albúmina sérica bovina (Anexos).

Demanda química de oxígeno COD

El COD mide la porción de materia orgánica biodegradable de una muestra que es susceptible a ser oxidada por un fuerte oxidante químico dicromato de potasio. La mayor parte de la materia orgánica resulta oxidada por una mezcla a ebullición del ácido crómico y sulfúrico. La muestra se somete a una solución acida fuerte con un exceso de dicromato potásico. Después de la digestión, el dicromato no reducido sobrante se determina con sulfato ferroso amónico (sal de Morh) $(\text{SO}_4)_2\text{Fe}(\text{NH}_4)_2$ para determinar así la cantidad de dicromato consumido y por lo tanto calcular la materia orgánica oxidable en términos de equivalente de oxígeno.



Para la valoración se utiliza un indicador que es la ferroina que a su vez reacciona con el exceso de Fe +2 que no ha reaccionado con el dicromato dando lugar a un complejo coloreado que nos indica el punto final de la valoración. (Standr Methods, 1992).

Tabla 13. Procedimiento para la determinación de la cantidad de materia orgánica oxidable.

Procedimiento COD

	Muestra (mL)	sol.Digestion (mL)	sol. B (mL)	Volumen Final
Muestra	2,5	1,5	3,5	7,5
Blanco digerido	2,5 (H2O d)	1,5	3,5	7,5
Blanco NO digerido	2,5 (H2O d)	1,5	3,5	7,5

La muestra debe estar previamente diluida

Vortexear

Digerir por 2 horas a 150°C en el termobloque o bloque de digestión

Remover los tubos y enfriar a temperatura ambiente

Titular con la solución FAS(añadir dos gotas del indicador ferroína)

Registrar el volumen gastado para que el color de la muestra vire de azul vedoso a rojo marrón

Los datos de volúmenes obtenidos se deben de colocar a unas ecuaciones para la obtención de mg de O₂ por litro (Anexo)

Determinación de biomasa

La biomasa será determinada por densidad óptica para la cinética de crecimiento microbiano en un espectrofotómetro UV/Vis Cinta 5 a una longitud de onda de 560 nm.

CAP. VI RESULTADOS

3. SELECCIÓN DE LA CEPA

Las cepas bacterianas FT3, 2B y P5 fueron aisladas de muestras de lodo de aguas termales del altiplano Boliviano. Para medir la actividad xilanolítica y β -glucosidasa, de estas cepas, las mismas fueron cultivadas en el medio mineral 11 que tiene como fuente de carbono xilano y como fuente de nitrógeno cloruro de amonio; a una temperatura de incubación de 60° C. La cepa FT3 presentó una actividad xilanolítica de 2 UI/mL y una actividad β -glucosidasa de 48 UI/mL (Tabla 14) mostrando ser la mejor comparada con las cepas P5 y 2B que presentaron una actividad enzimática menor. Por lo tanto la cepa FT3 fue seleccionada para los siguientes experimentos.

Tabla 14. Actividad enzimática xilanasas y β -glucosidasas de cepas bacterianas anaerobias termófilas de muestras obtenidas de la región altiplánica de Bolivia.

Actividad	Cepas		
	FT3	2 B	P 5
Xilanasas	2 UI/mL	0,8 UI/mL	0,64 UI/mL
β -Glucosidasas	48 UI/mL	32 UI/mL	40 UI/mL

La cepa FT3 seleccionada, se la cultivó en las mismas condiciones descrita anteriormente, para determinar su perfil de desarrollo, de la cual se obtuvo la curva de crecimiento (figura 15), que presenta el tiempo de vida de la bacteria, siendo una clásica curva de crecimiento bacteriano, con una fase de adaptación, una fase logarítmica que empieza a las 20 horas hasta las 40 horas, la fase estacionaria empieza de las 40 horas hasta las 78 horas donde empieza la fase de declinación o muerte.

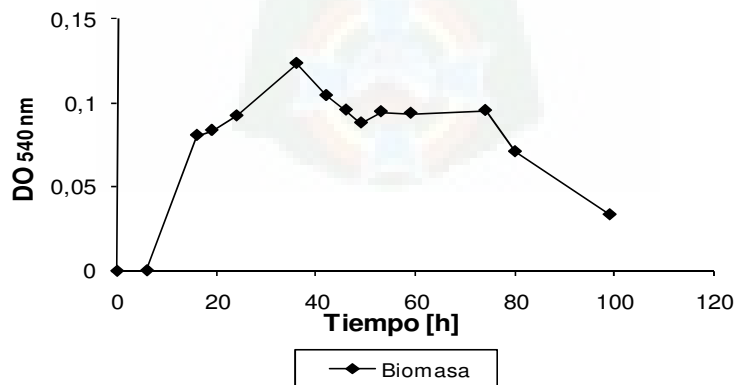


Figura 15. Curva de crecimiento de la cepa FT3

4. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE XILANASAS

2.1 OPTIMIZACIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO

La cepa FT3 fue cultivada en las condiciones basales del medio 11, utilizando xilano como fuente de carbono y variando la fuente de nitrógeno para lo que se realizó el siguiente diseño factorial de cuatro niveles: NH_4Cl , NaNO_3 , Extracto de levadura, urea; tomando en cuenta la concentración de nitrógeno del medio mineral 11 (variación de la Solución A) el cual fue la concentración de referencia para el cálculo de los demás compuestos, tal como se observa en la tabla 15.

Tabla 15. Cantidad de la fuente de nitrógeno en la solución A

Fuente de Nitrogeno		
Compuesto	Cantidad Nitrogeno	Compuesto [g/L]
NH_4Cl	52,336 g	200
NaNO_3	52,336 g	323,82
Extracto de levadura	52,336 g	5,19
Urea	52,336 g	112,15

Por otra parte se ha considerado otra variable que es la inoculación de la cepa bacteriana FT3 en forma libre y encapsulada, los resultados que se obtuvieron en el experimento se muestran en la tabla 16. Observándose la mejor actividad con el extracto de levadura en ambos casos con una actividad de 2.5 UI/mL y 10.2 UI/mL (figura 16).

Tabla 16. Actividad xilanólítica de bacteria libres e inmovilizadas

Actividad Xilanolitica		
F. Nitrógeno	Bacteria libre	Bacteria encapsulada
NH_4Cl	1,6 UI/mL	2 UI/mL
NaNO_3	2,3 UI/mL	1,65 UI/mL
Extracto de Levadura	2,5 UI/mL	10,2 UI/mL
Urea	2,4 UI/mL	2,3 UI/mL

3D Surface Plot of Xilanasas [UI/mL] against Tiempo and Nitrógeno

Spreadsheet7 10v*132c

$$\text{Xilanasas [UI/mL]} = 1,8642 - 0,0101 * x - 0,1578 * y - 8,5353E-6 * x * x + 0,0015 * x * y + 0,0749 * y * y$$

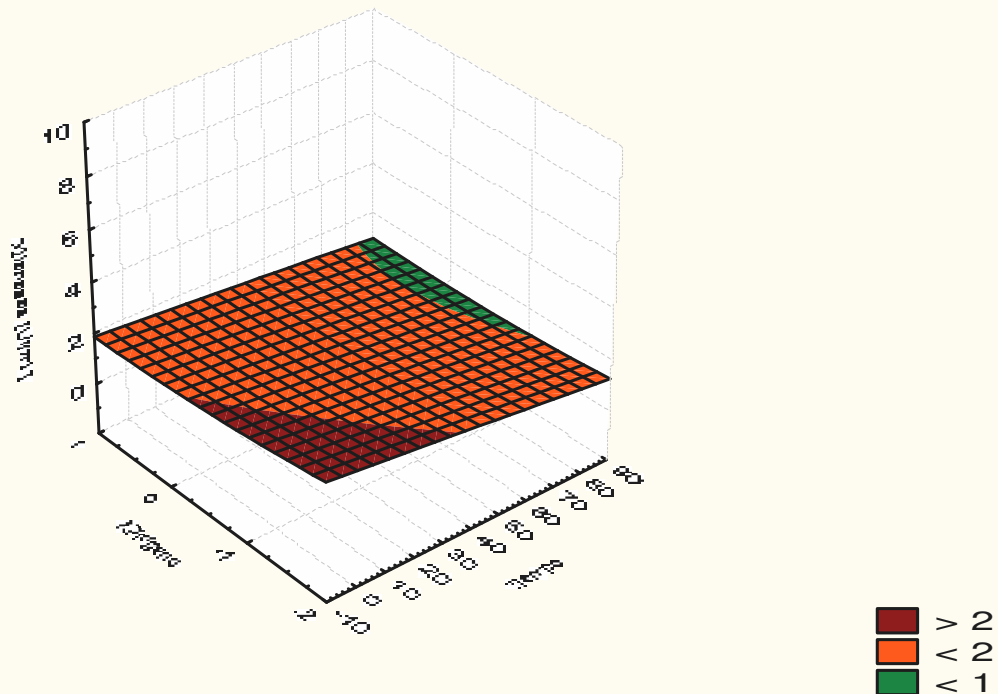


Figura 16. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad de xilanasas en células libres (NaNO_3 -2, Extracto de Levadura -1, NH_4Cl 0, Urea 1).

Los resultados obtenidos nos demuestran que no existe diferencia significativa en la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno, pero si existe diferencia significativa cuando se cultiva las células libres o encapsuladas, tratadas en las mismas condiciones de cultivo; existiendo una alta actividad xilanólítica de 10.2 UI/mL con extracto de levadura con una significancia de $p \leq 0.01$, en las células encapsuladas (figura 17), por lo cual se realizó la comparación de ambas variables (encapsuladas y libres), estos datos nos permiten determinar que la mejor fuente de nitrógeno es el extracto de levadura.

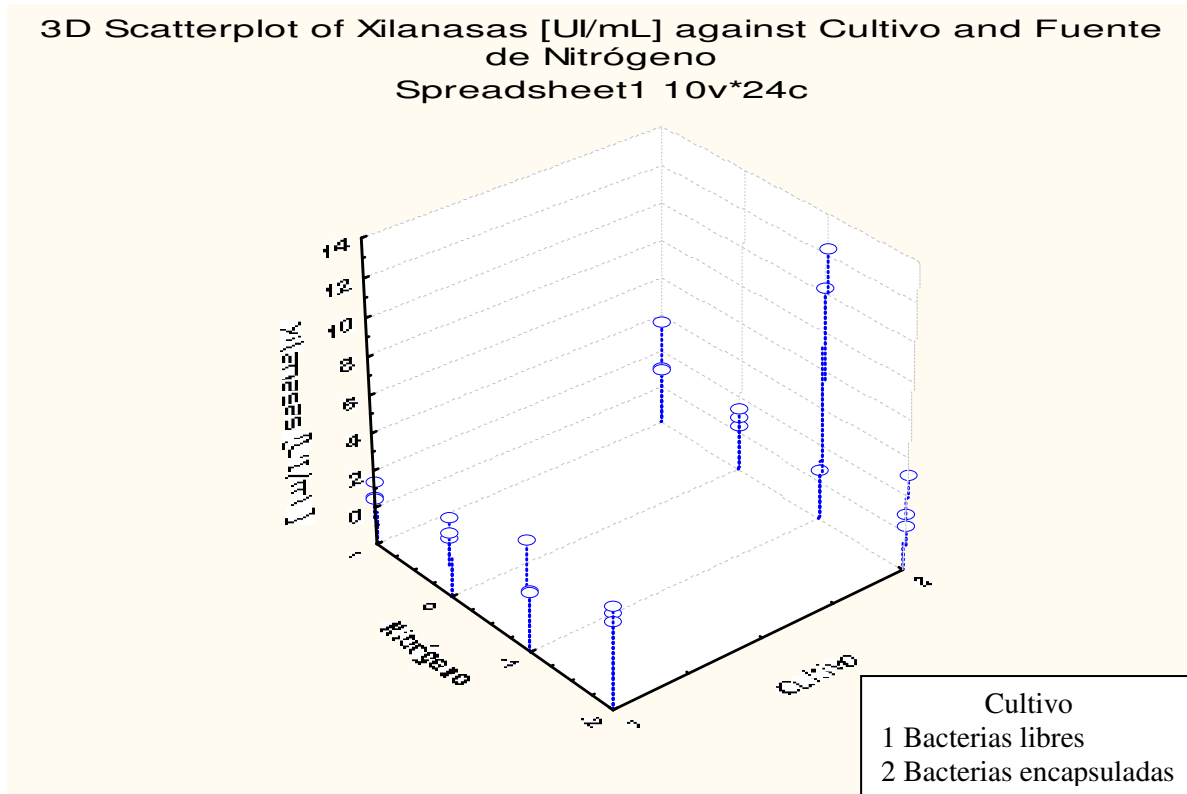


Figura 17. Comparación de la optimización de Fuente de Nitrógeno (NH_4Cl 1, NaNO_3 2, Extracto de Levadura 3, Urea 4) en células libres y encapsuladas.

También se observa un incremento de la biomasa cuando la bacteria esta inmobilizada, evidenciando su crecimiento por el cambio de la coloración de las perlas que son incoloras y pasan a un color blanquecino (figura 18).



Figura 18. Crecimiento de bacterias encapsuladas, se observa la una coloración blanquecina de la perla lo que demuestra biomasa.

2.2 OPTIMIZACIÓN DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO

La optimización de el pH del medio de cultivo consistió en la variación del mismo en un rango de 5 hasta 10 consecutivamente, utilizando como fuente de nitrógeno el extracto de levadura en una concentración 1 g/L, como fuente de carbono 0.2% de xilano e inoculando a la cepa FT3 en forma inmovilizada. La máxima actividad observada fue de 1.3 UI/mL a pH 9 (figura 19), determinándose que no existe gran diferencia con los otros pHs del medio de cultivo, observando que las perlas de alginato son mas inestables, por lo que probablemente aumenta la porosidad de las mismas llegando a disociarse y entremezclándose con el alginato en el medio de cultivo disminuyendo por lo tanto la accesibilidad de la bacteria al sustrato. Dando un valor de $p > 0.05$ siendo que el pH no influye en la actividad de las xilanasas.

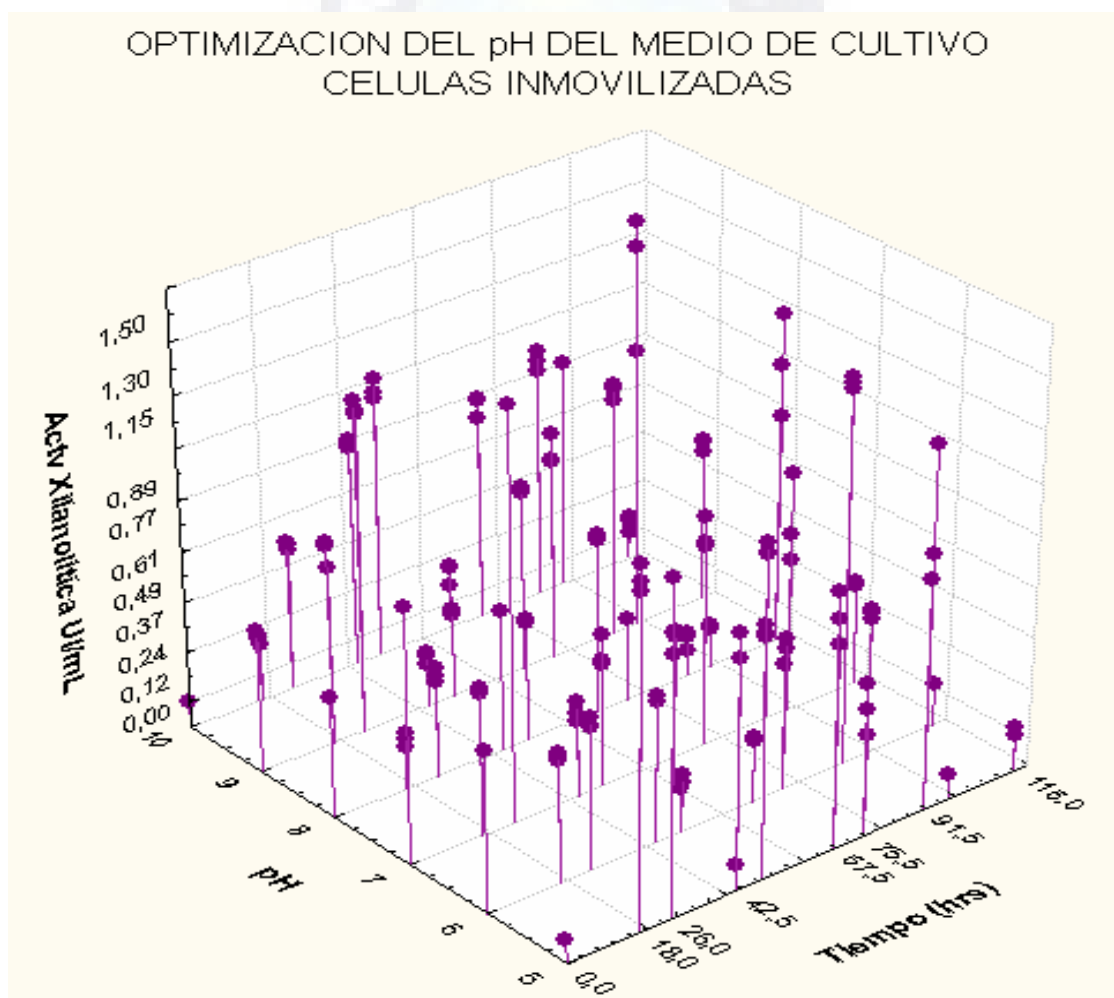


Figura 19. Efecto del pH en el medio de cultivo de células encapsuladas sobre la actividad xilanolítica de la cepa FT3 inmovilizadas cultivadas en xilano como fuente carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Sin embargo con las células libres en las mismas condiciones de cultivo que las células inmovilizadas, se observó una actividad óptima de 3.39 UI/mL a un pH 8, siendo esta mayor que la actividad a pH 9 en células inmovilizadas (figura 20), mostrando significancia con un valor de p 0.0412, datos que nos permiten determinar que los próximos experimentos se realizarán con células libres y a un pH alcalino.

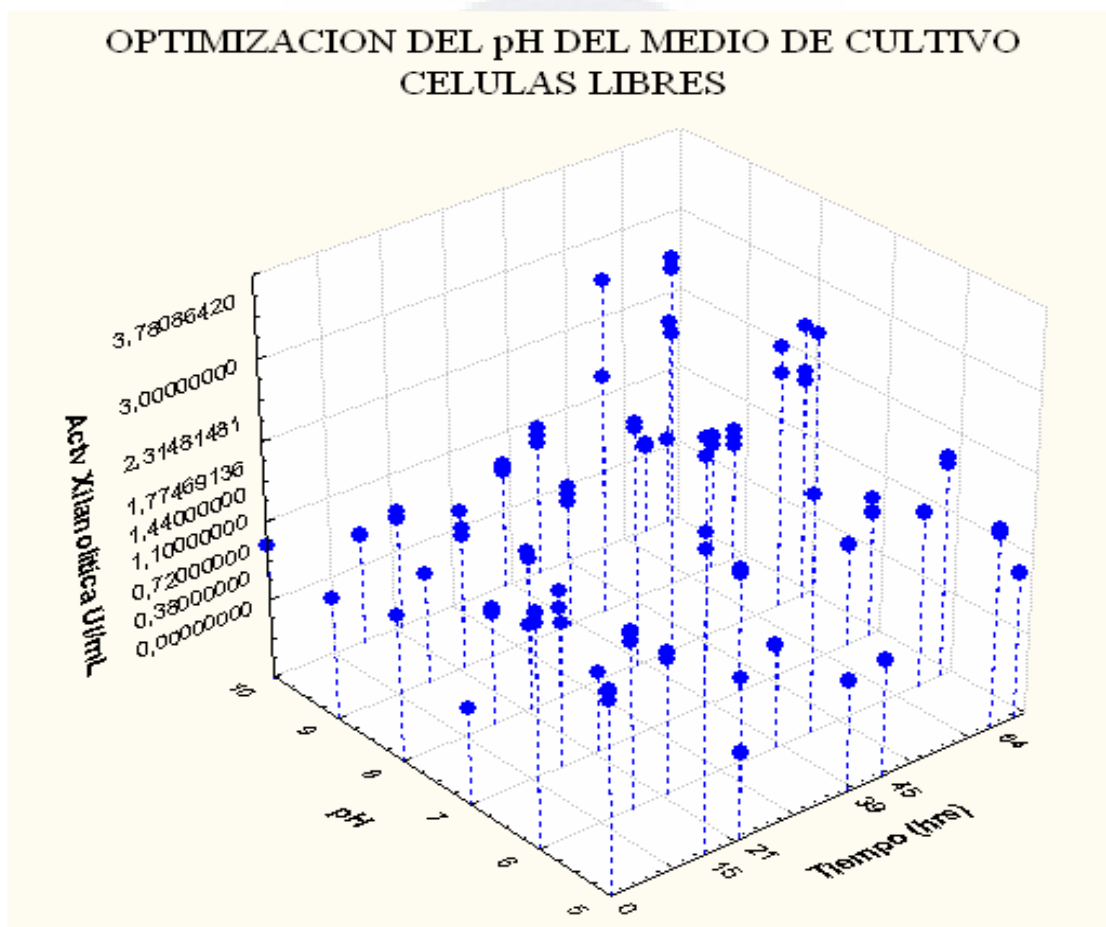


Figura 20. Actividad xilanólítica de la cepa FT3 libre en distintos pH de medio de cultivo con extracto de levadura como fuente de nitrógeno, xilano como fuente de carbono.

2.3 OPTIMIZACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO

Así también, se optimizó la fuente de carbono, utilizando en este caso materia cruda del cual se realizó un pretratamiento con el propósito de obtener solamente hemicelulosas, siendo estas un supuesto debido a que no se tiene la certeza de que realmente de que sean hemicelulosas.

2.3.1 PROCESOS DE PRE-TRATAMIENTO DE RESIDUOS AGRICOLAS

La materia cruda fue sometida a distintos procesos físicos y químicos de los cuales se obtuvo que el mejor pre-tratamiento fue con NaOH 1% dando un valor máximo de COD de 765714,286 mg/L tomando como óptimo para los posteriores experimentos (figura 21).

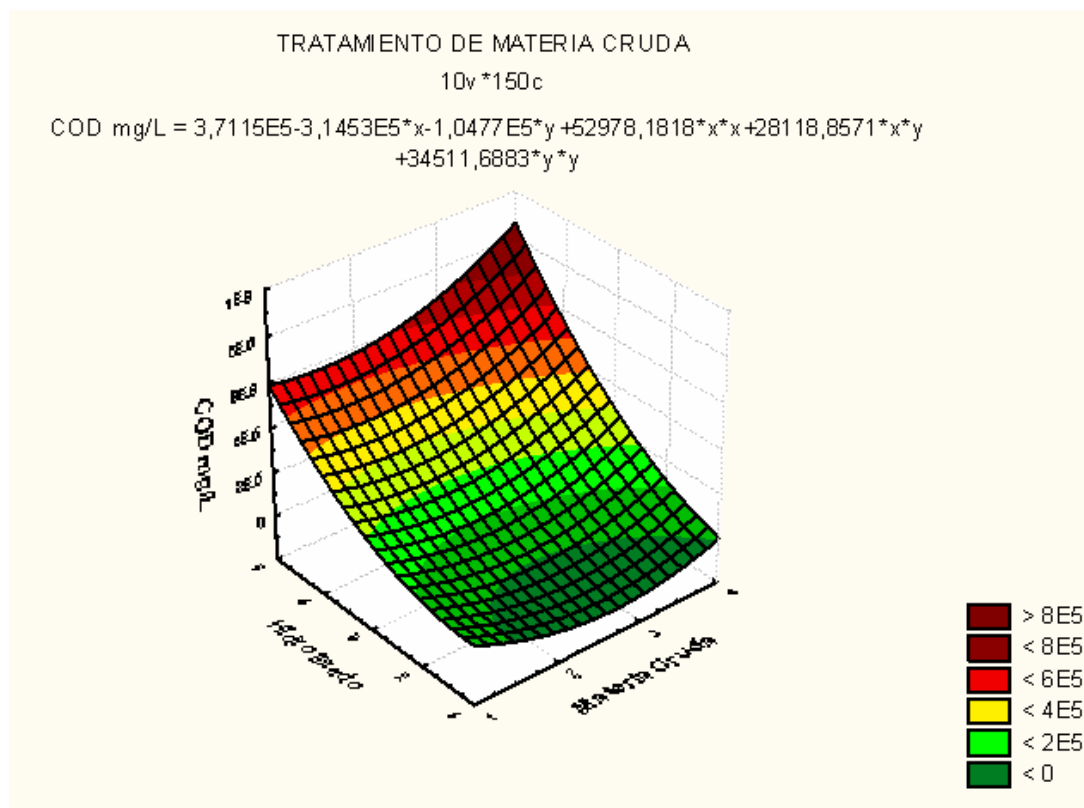


Figura 21. Pre-tratamiento de material cruda por distintos métodos de hidrólisis (hidrólisis ácida 1, termal 2, con amonio 3, alcalina NaOH 4, alcalina KOH 5).

Equivalencia de los valores de COD con el equivalente de xilano en el medio de cultivo

Para el cálculo de la cantidad de hidrolizado se realizó una equivalencia. Se tomó 0.2% de xilano (concentración del fuente de carbono en el medio 11) como parámetro teórico al cual se determinó la cantidad de materia orgánica susceptible a ser oxidada mediante la técnica COD. Se obtuvo que 0.2% de xilano requieren de 2107.21 g de oxígeno molecular para una combustión total hasta dióxido de carbono, agua y calor, a partir de esa relación se obtuvo los siguientes datos para la cantidad de hidrolizado como fuente de carbono requerido para el medio de cultivo (tabla 17).

Tabla 17. Cálculo de la concentración de hidrolizado requerido

Concentración del Hidrolizado			
Materia Cruda	COD [mgO ₂ /L]	% Hidrolizado	Vol mL/80mL
Xilano(estandar)	2107,91	0,2	80
Cascarilla de arroz	411428,57	39,03	2,04
Paja de quinua	765714,28	72,65	1,1
Paja de trigo	731428,57	69,34	1,15
Paja de soya	822857,14	78,07	1,02

La cepa FT3 fue cultivada en medio 11 utilizando como fuente de nitrógeno extracto de levadura y como fuente de carbono hidrolizados de cascarilla de arroz, paja de quinua, paja de trigo, paja de soya y como control se tomó al xilano 0.2% del cual se realizó una equivalencia en concentraciones. Dando una actividad máxima de 2.2 UI/mL con el hidrolizado de soya (Figura 22), las demás fuentes de carbono mostraron un resultado inferior.

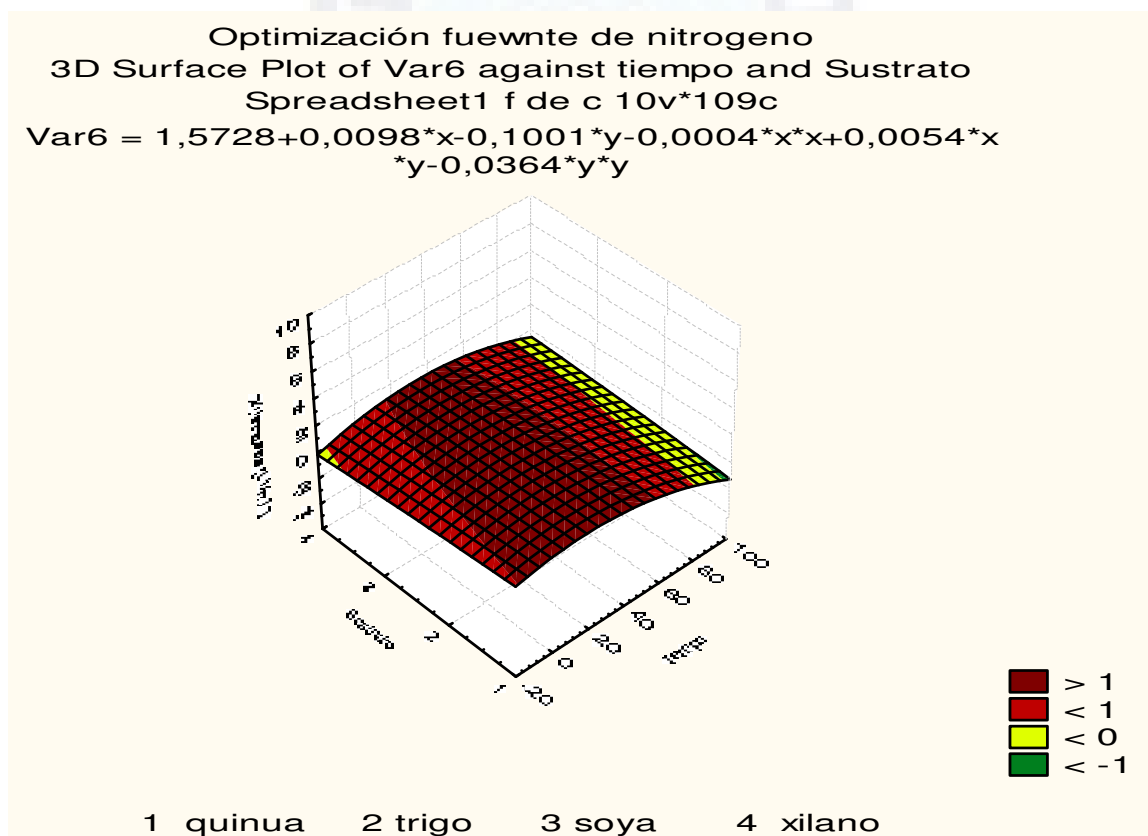


Figura 22. Actividad xilanólítica, cepa FT3 libre cultivada en extracto de levadura como fuente de nitrógeno con distintos fuentes de carbono a pH neutro

Se ha visto que la actividad xilanolítica de la cepa FT3 con diferentes fuentes de carbono no presentan una diferencia significativa $p > 0.93$. Sin embargo el residuo con el que se consiguió mayor actividad enzimática pero no significativa fue con el hidrolizado de soya, siendo éste el seleccionado.

También se probó el cultivo con materia cruda inoculando la cepa FT3 en medio 11 suplementado con extracto de levadura y como única fuente de carbono se utilizó la materia cruda (cascarilla de arroz, paja de quinua, paja de trigo, paja de soya) sin hidrolizarlo en una cantidad de 2g/80mL de cultivo, la cepa FT3 puede crecer con sustratos como paja de soya y paja de trigo presentando una actividad de 2.51 y 2.20 UI/mL respectivamente (figura 23).

Según los datos obtenidos las distintas fuentes de carbono de la materia cruda probada tienen influencia sobre la actividad de las xilanasas, pero la actividad disminuye este resultado puede atribuirse a la inaccesibilidad del enzima a la hemicelulosa del sustrato empleado.

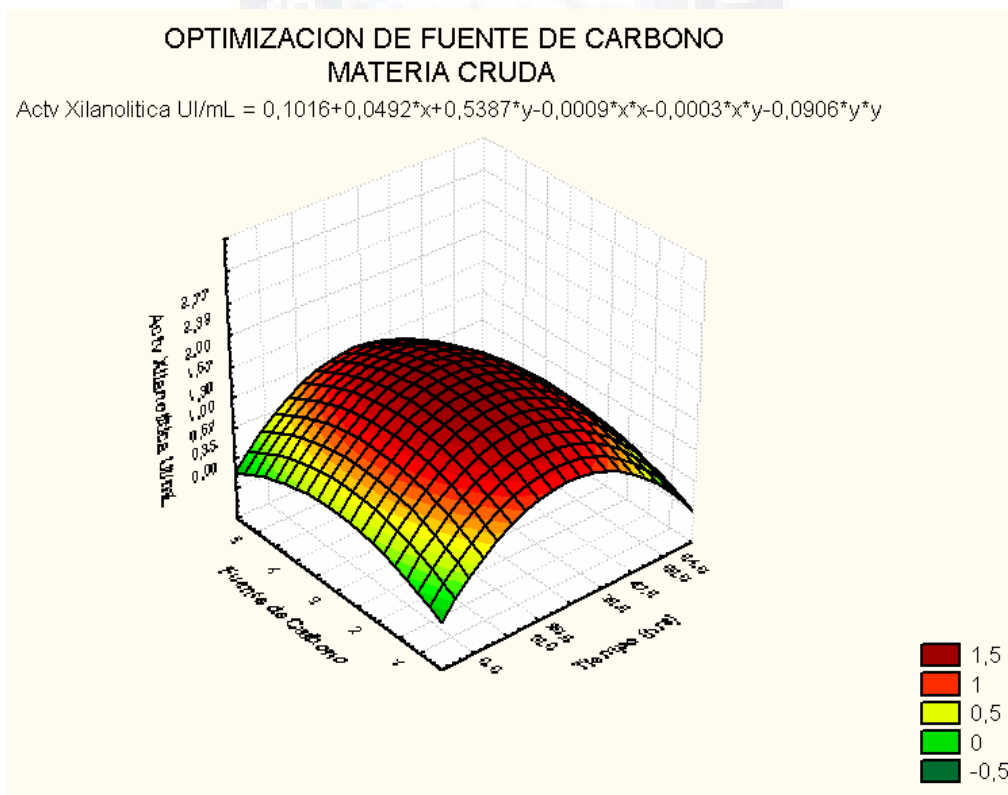


Figura 23. Efecto de las distintas fuentes de carbono (materia cruda) sobre la actividad xilanolitica de la cepa FT3 con extracto de levadura a pH neutro (cascarilla de arroz 1, paja de quinua 2, paja de trigo 3, paja de soya 4, xilano 5).

Finalmente se realizó la optimización de las concentraciones de la fuente de nitrógeno y fuente de carbono con materia cruda (tabla 17), realizando un diseño factorial (tabla 9), en cultivo con células libres. De acuerdo a los datos obtenidos la concentración si influye en la actividad enzimática, obteniéndose la mayor actividad xilanolítica de 4.4 UI/mL con una concentración de 6g/80mL de fuente de carbono paja de soya como materia cruda y 0.2g/L de fuente de nitrógeno (extracto de levadura) dando una diferencia significativa con un valor de p 0.000003 (figura 24).

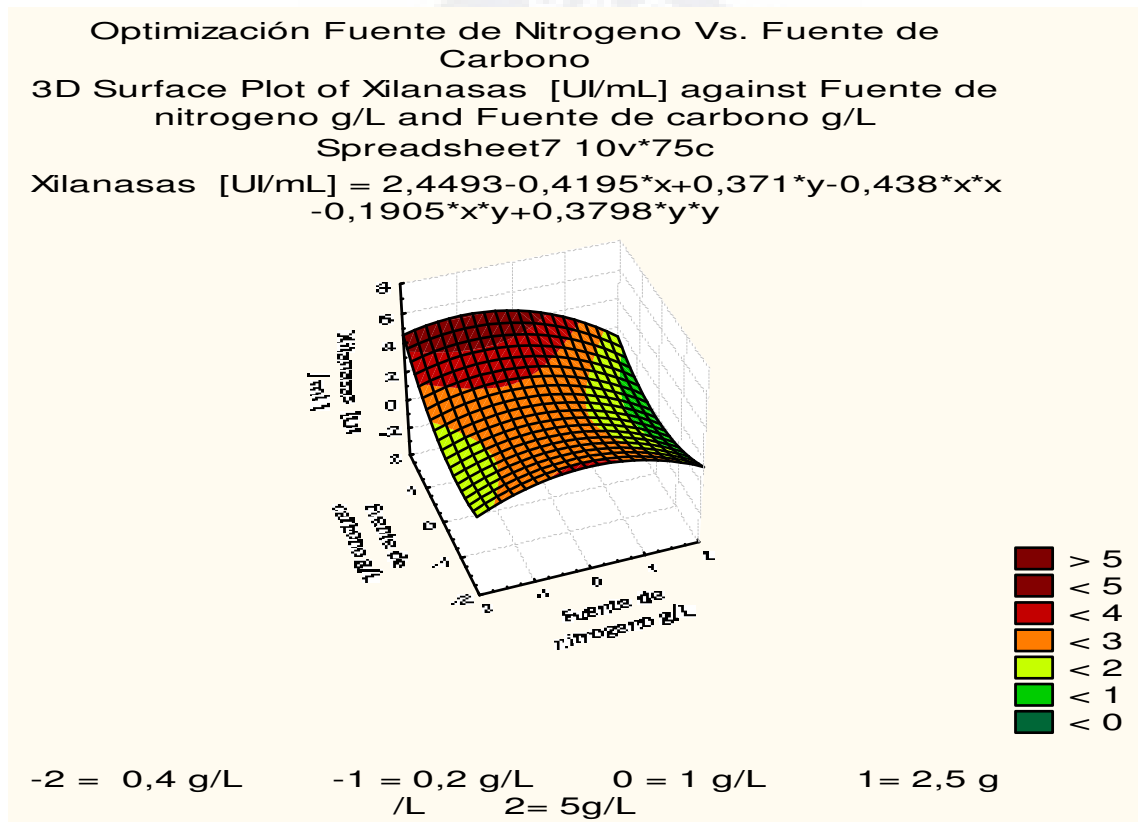


Figura 24. Optimización de concentraciones de fuente de Nitrógeno y fuente de Carbono.

2.4 CONDICIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La caracterización de la enzima se la realizó en extracto de enzimas, probando a distintos pH del sustrato para la reacción, el cual fue preparado con distintos tampones de acuerdo al pH (tampón citrato, tampón acetato, tampón fosfato, tampón carbonato, tampón de amonio) dando como ideal a un pH de 8 en la reacción enzimática con una actividad xilanolítica de 2 UI/mL (figura 25).

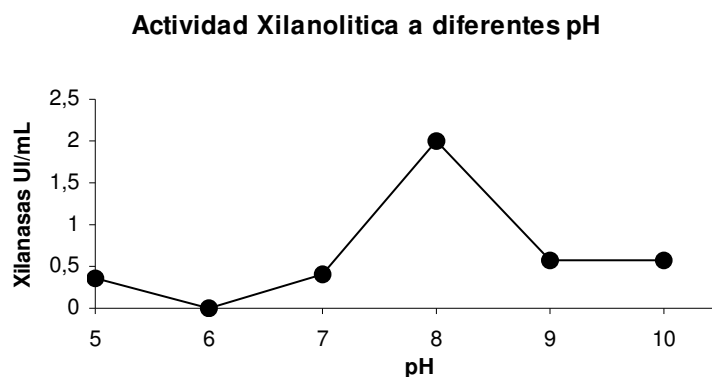


Figura 25. Estabilidad de la enzima a distintos pH de sustrato de la reacción enzimática

La estabilidad de la enzima a distintas temperaturas fue probada en un rango de 50° C a 90° C, siendo estable hasta 70° C obteniendo como un máximo de actividad de 2.62 UI/mL (figura 26).

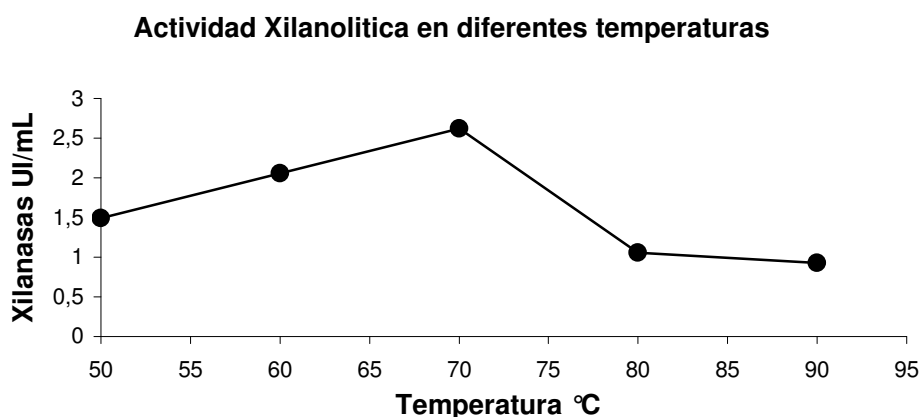


Figura 26. Estabilidad de la enzima a distintas temperaturas de la reacción enzimática

5. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE β -GLUCOSIDASAS

3.1 OPTIMIZACIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO

Para la optimización de la fuente de nitrógeno en células libres la cepa FT3 fue cultivada en medio 11 con xilano como fuente de carbono y variando el fuente de nitrógeno, pero a las mismas concentraciones de nitrógeno, tomando como referencia la Solución A (tabla 15), los resultados que se obtiene en el experimento muestran que la fuente de nitrógeno influye en la producción de la enzima dado que tiene una significancia estadística con un valor de $p < 0.05$ con extracto de levadura; dando una actividad de 72 UI/mL en células libres existiendo un incremento

similar con cultivos de bacterias encapsuladas. En la figura 27 se puede observar el incremento dado por la acción conjunta de las variables X (tiempo) Y (fuente de nitrógeno).

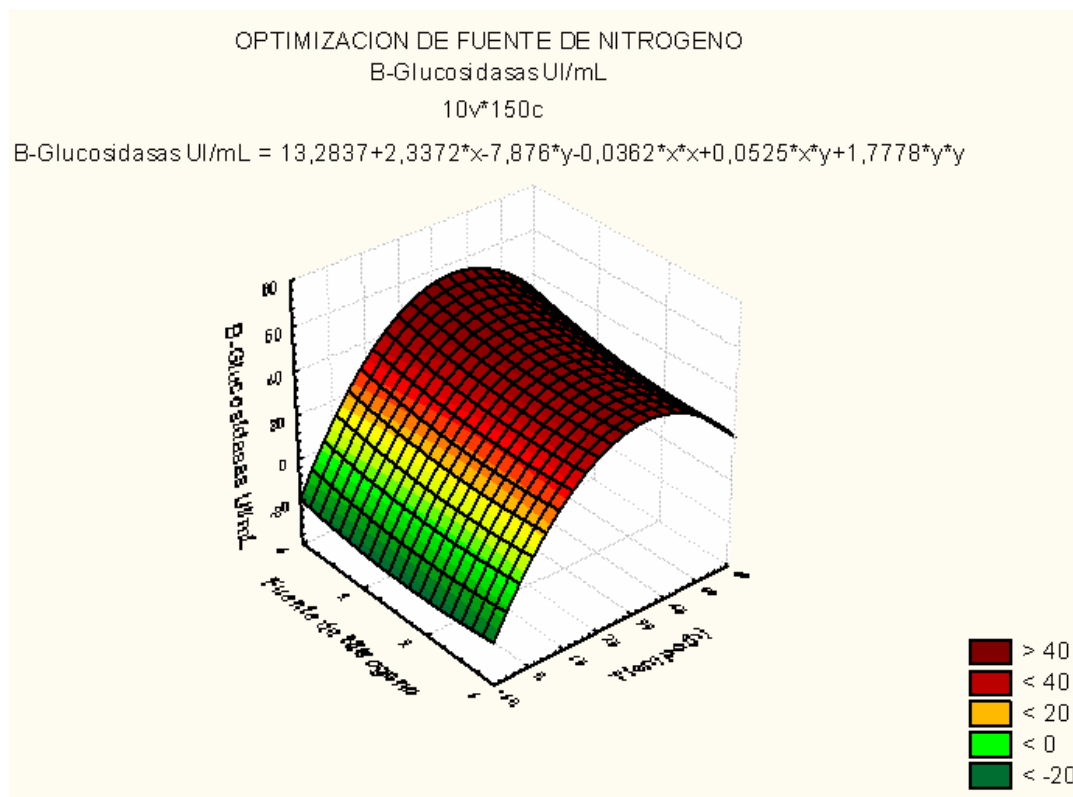


Figura 27. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el incremento de la actividad enzimática de β -glucosidasas (NH_4Cl 1, NaNO_3 2, Extracto de Levadura 3, Urea 4).

El extracto de levadura fue seleccionado como mejor fuente de nitrógeno para los próximos experimentos realizados.

3.2 OPTIMIZACIÓN DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO

La cepa FT3 se cultivó con extracto de levadura como fuente de nitrógeno y xilano como fuente de carbono variando el pH del medio de cultivo en un rango de 5 a 10. A la vez se realizó otra variación que es la forma de inoculación: bacterias encapsuladas y libres; obteniéndose un máximo de 112 UI/mL a pH 9 (figura 28) la diferencia en el pH no es significativa con un valor de p 0,663812. Cabe recalcar que las perlas se desintegran a pH alcalinos aumentando de esta manera la densidad del medio de cultivo, de forma contraria en pH ácidos las perlas se tornan más consistentes, lo cual provoca la disminución de la porosidad de la perla y de esta manera su accesibilidad al sustrato.

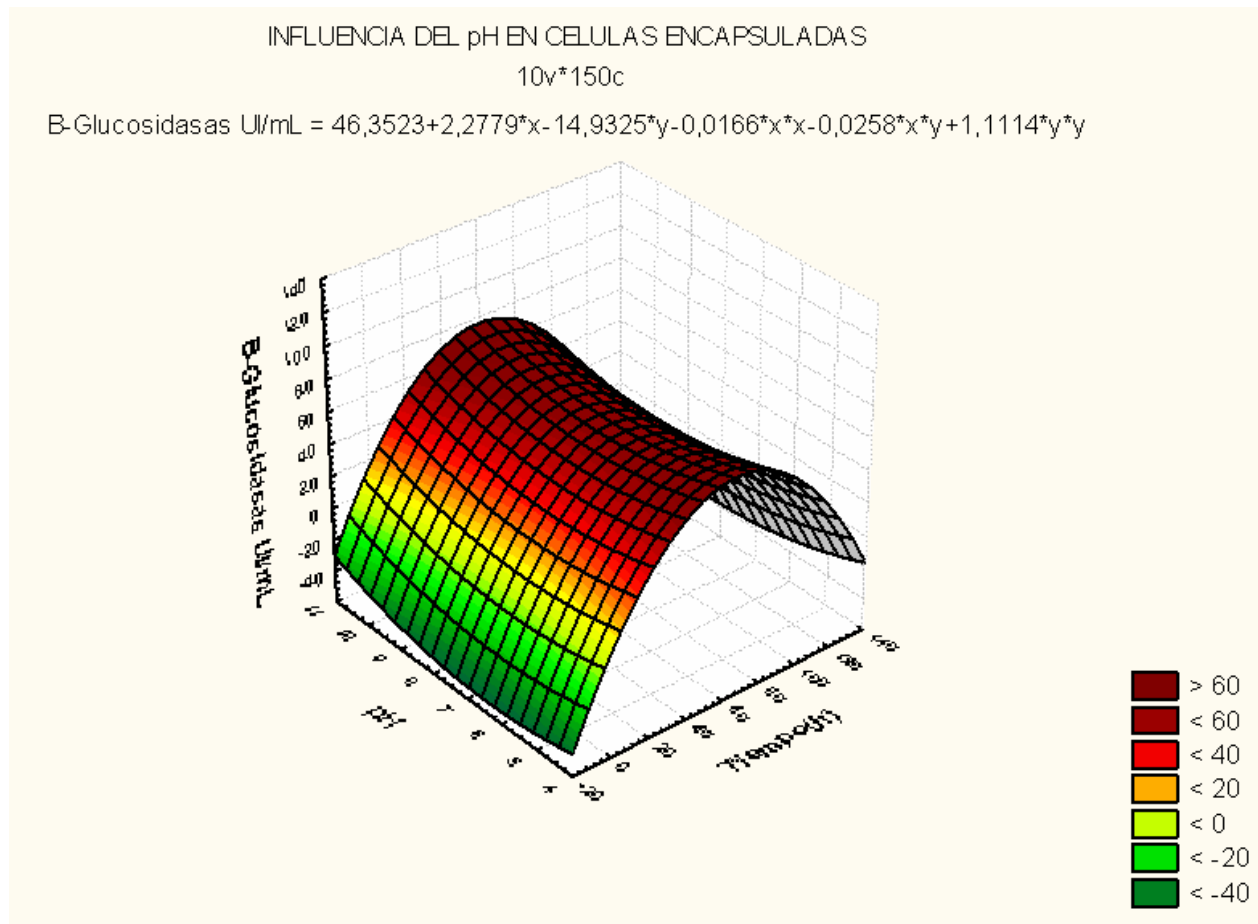


Figura 28. Efecto del pH en el medio de cultivo de células encapsuladas sobre la actividad enzimática de las β -glucosidasas, el rango del pH es de 5-10.

En la optimización del pH del medio de cultivo en células libres fue realizada en las mismas condiciones de cultivo que las encapsuladas, se obtuvo que el pH tiene influencia en la actividad enzimática dando un máximo de 144 UI/mL a pH 9 (figura 29) siendo estadísticamente significativo con un valor de p 0.01. Tomándose como óptimo el pH de 9 para el medio de cultivo.

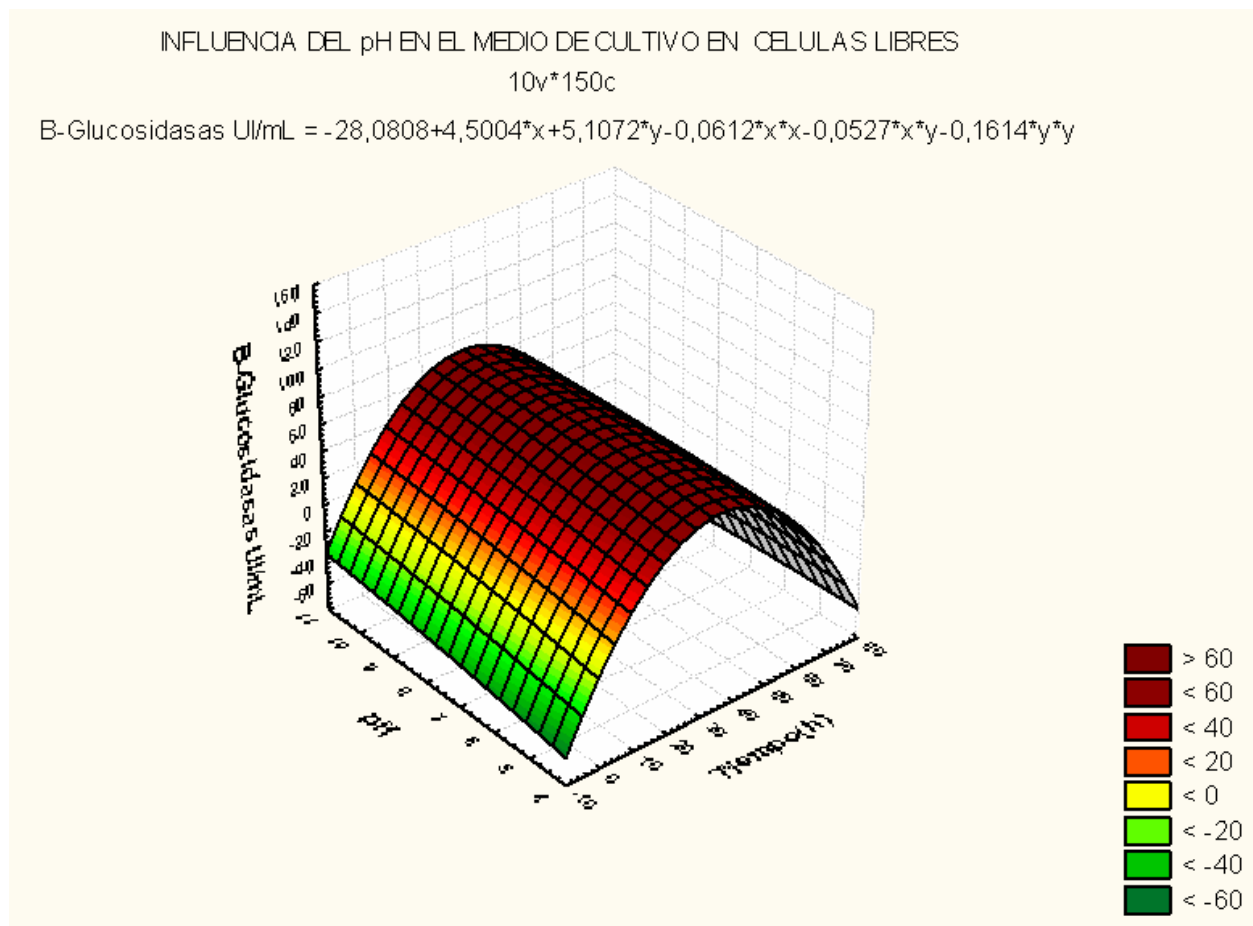


Figura 29. Efecto del pH en el medio de cultivo de células libres sobre la actividad enzimática de las β -glucosidasas, el rango del pH es de 5-10.

3.3 OPTIMIZACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO

En la optimización de la fuente de carbono se realizó un pre-tratamiento debido a que las β -Glucosidasas tienen acción sobre oligosacáridos y no así sobre polímeros (procesos de pre-tratamiento de desechos agrícolas). La cepa FT3 fue cultivada en medio11 con extracto de levadura como fuente de nitrógeno y variando el fuente de carbono utilizando hidrolizados de cascarilla de arroz, paja de quinua, paja de trigo, paja de soya (pre-tratamiento con NaOH 1%); se realizó una equivalencia de la cantidad de hidrolizado de acuerdo al COD obtenido.

Existe influencia de la fuente de carbono en la actividad enzimática obteniéndose como un máximo de 176 UI/mL con el hidrolizado de la paja de trigo, con una significancia de un valor de $p < 0.05$ (figura 30).

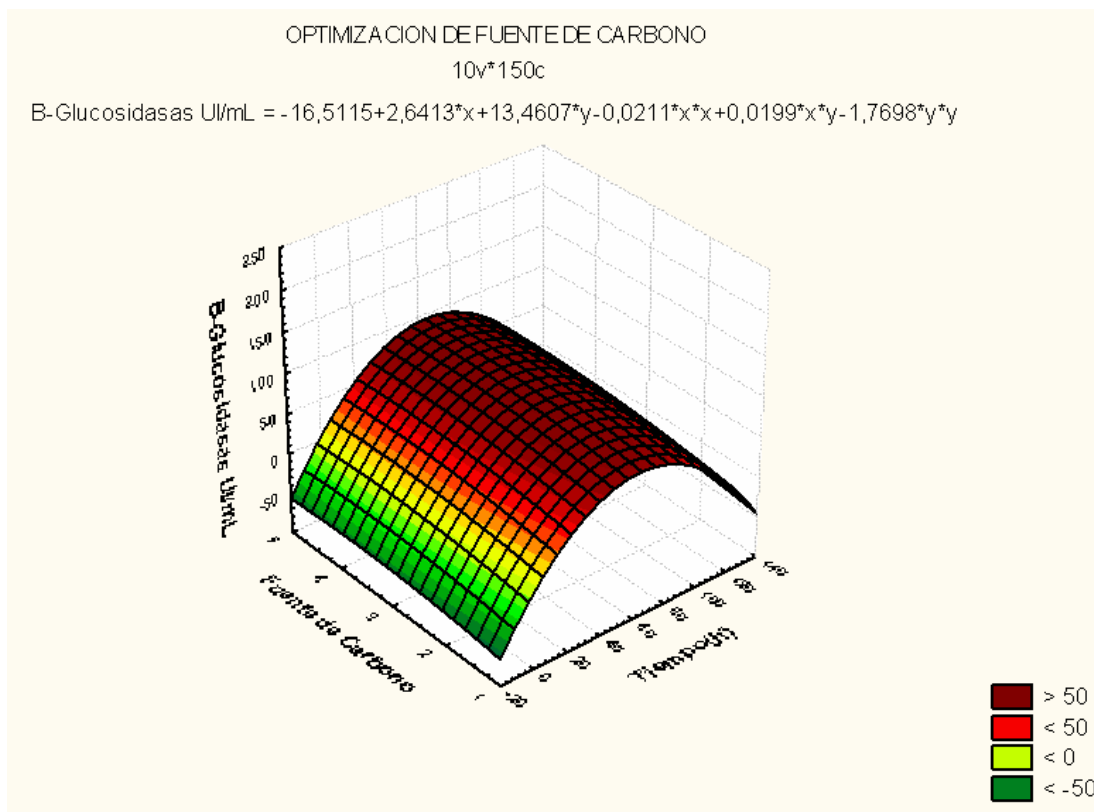


Figura 30. Efecto de las distintas fuentes de carbono (arroz 1, quinua 2, trigo 3, soya 4, xilano 5) sobre la actividad de las β -glucosidasas.

Así también, se realizó la optimización de la concentración de la fuente de carbono, hidrolizado de trigo que dio como óptimo en el anterior experimento realizando un diseño experimental, cada experimento se lo realizó por triplicado.

Tabla 18. Concentración de paja de trigo hidrolizado, utilizando de referencia el COD del xilano

Diseño Factorial

Fuente de Nitrogeno	Diseño	Fuente de Carbono mg/L
5 g/L	-2	2634,888
5 g/L	-1	5269,776
5 g/L	0	10539,552
5 g/L	1	21079,104
5 g/L	2	42158,208

La cantidad de hidrolizado utilizado para la optimización se realizó cálculos de acuerdo al COD del hidrolizado de paja de trigo que es de 731428,571 mg/L realizando una relación equivalente con el COD del xilano a una concentración 0.2% que es de 2107.91 mg/L (tabla 18).

Obteniéndose una actividad de 180 UI/mL a una concentración de 5g/L extracto de levadura como fuente de nitrógeno y 5269,776 mg/L de paja de trigo; resultados que indican que la concentración influye en la producción de la enzima dando un valor significativo de $p < 0.05$ (figura 31).

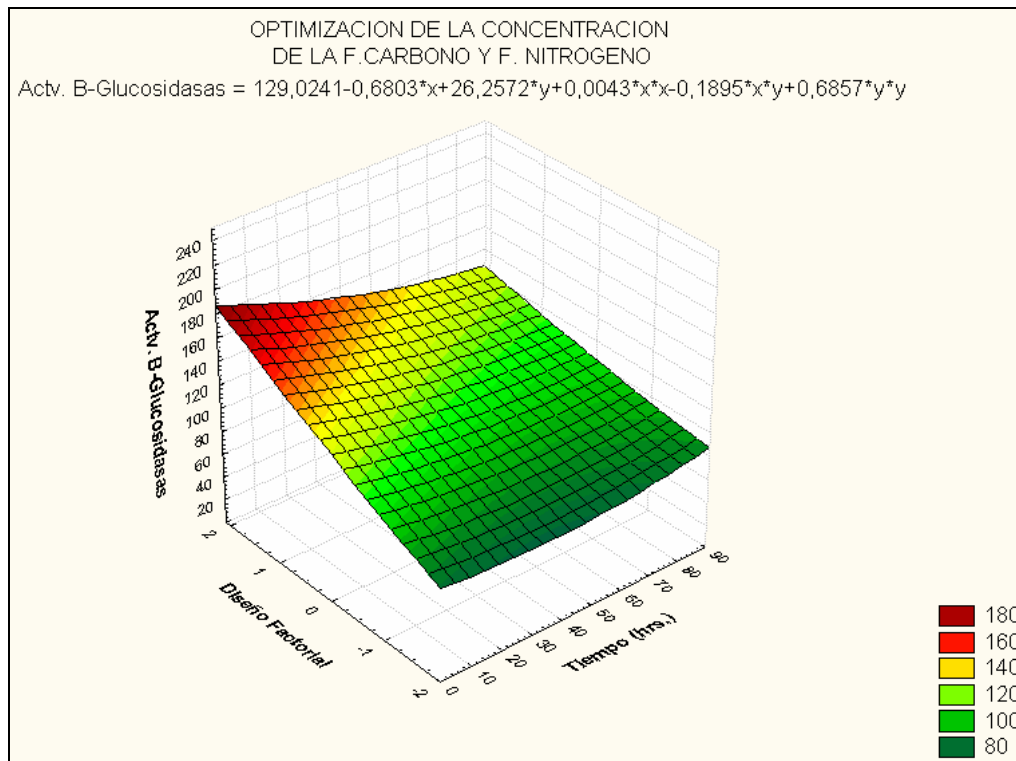


Figura 31. Optimización de la concentración de la fuente de nitrógeno y fuente de carbono.

3.4 MEDICION DE DE LA ACTIVIDAD INTRACELULAR β -GLUCOSIDASAS

De acuerdo a revisión bibliográfica las enzimas β -glucosidasas, son de carácter intracelular, sin embargo en este estudio se encontró actividad β -glucosidasa extracelular. Por lo que se determinó esta actividad tanto intra como extracelularmente, para poder evaluar la proporción. La medición de las enzimas intracelulares fue realizada por lisis de la bacteria por sonicación del cual se realizó pruebas sobre la amplitud de la sonicación (figura 32).

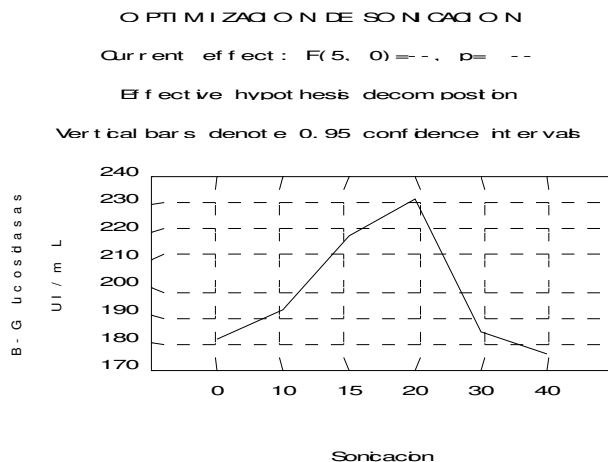


Figura 32. Lisis de la bacteria por sonicación para la obtención de β -glucosidasas intracelulares.

La mejor amplitud a utilizar para la lisis de la bacteria es de 20% en un tiempo de 5 minutos, debido que a esta amplitud se obtuvo una mayor actividad β -Glucosidasa.

La cepa FT3 se cultivo en medio 11 en un cultivo batch con extracto de levadura como fuente de nitrógeno e hidrolizado de paja de trigo como fuente de carbono realizando una cinética enzimática, realizando tres determinaciones de enzimas: intracelular, extracelular y total.

La primera muestra sin sonicar se centrifugó a 10.000 rpm. y se tomó el sobrenadante (enzimas extracelulares), la segunda muestra fue el pelet del centrifugado que se resuspendió en solución fisiológica en la misma cantidad que el sobrenadante el cual se sonicó 5 min. a 20% de amplitud volviendo a centrifugarlo a las mismas revoluciones (liberación de la enzima) y se recogió el sobrenadante (enzimas intracelulares) y por último la tercera muestra se sonicó 5 min y 20% de amplitud para luego centrifugarlo y obtener el sobrenadante (enzimas totales). Se realizó la medición de β -Glucosidasa en las tres muestras dando que las enzimas extracelulares su actividad es mayor que las intracelulares (figura 33).

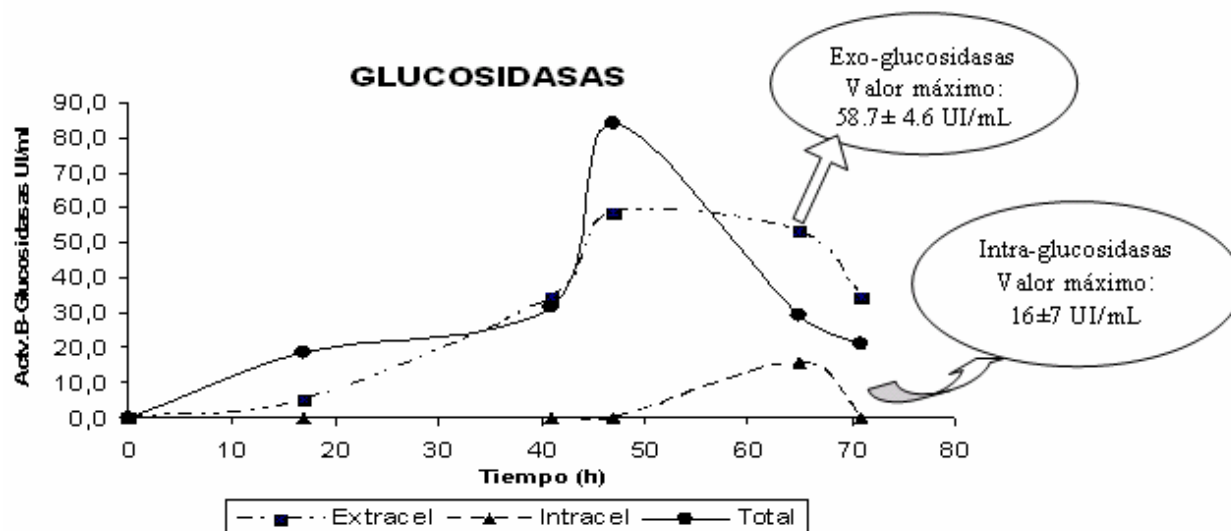


Figura 33. Actividad intracelular β -glucosidasas intra-celulares, extracelulares y β -glucosidasas totales

3.5 CONDICIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para establecer las condiciones óptimas de la enzima esta fue sometida a distintos pH de sustrato las cuales fueron preparadas con distintos tipos de tampones de acuerdo al pH; toda enzima tiene un pH óptima de reacción y en este caso es a un pH de 7 con una actividad β -Glucosidasa de 208 UI/mL (figura 34).

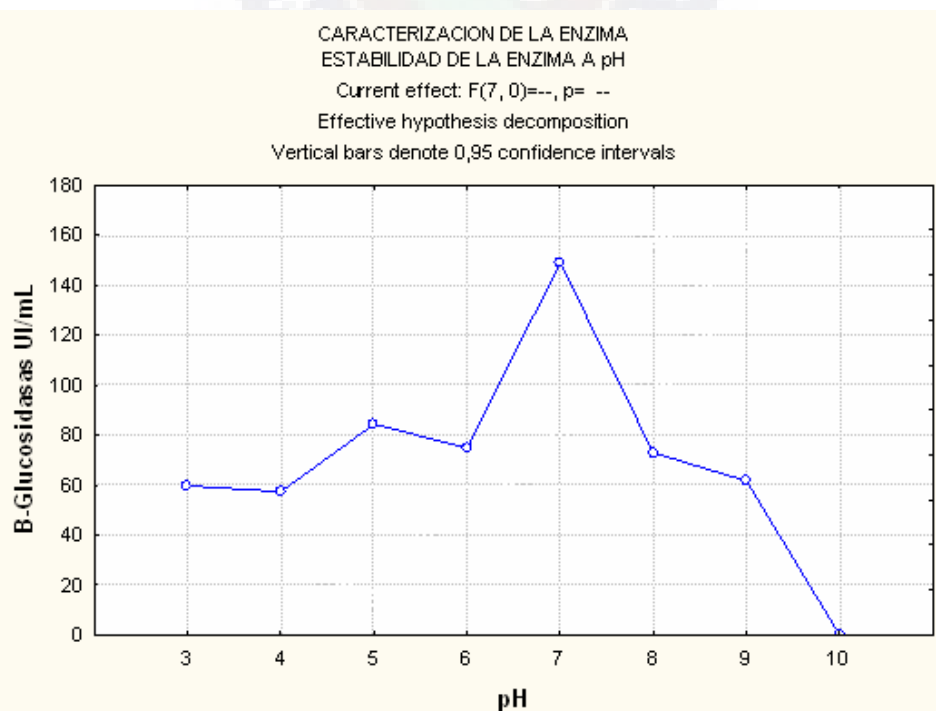


Figura 34. Estabilidad de la enzima a distintos pH de sustrato de la reacción enzimática

La enzima también se la sometió a distintas temperaturas para observar la estabilidad, dando como óptimo a una temperatura de 80° C (figura 35).

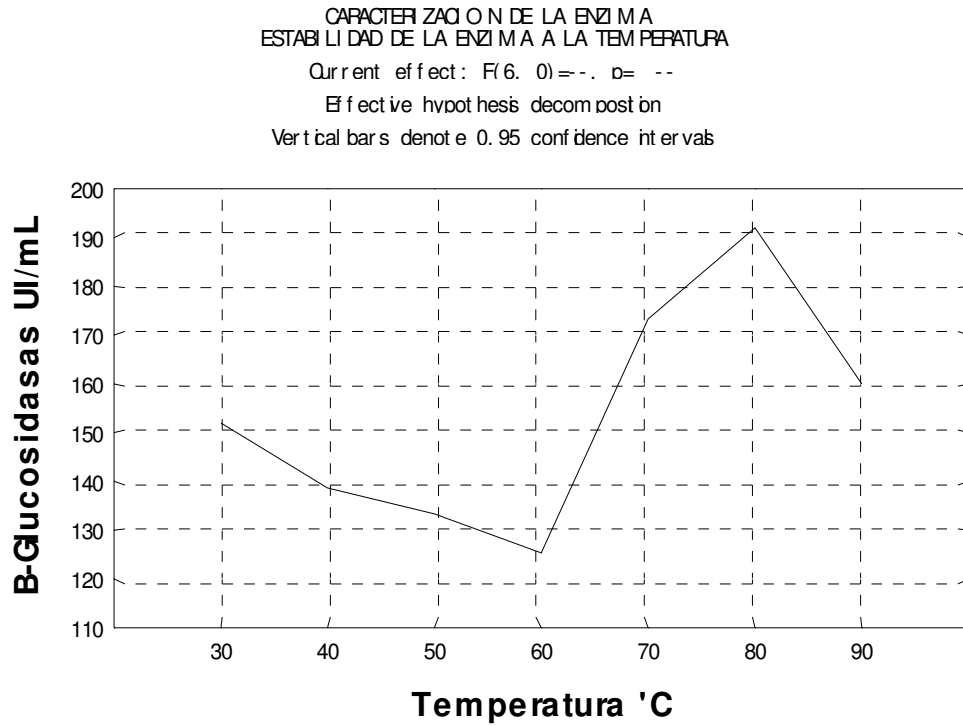


Figura 35. Estabilidad de la enzima a distintas temperaturas de la reacción enzimática

CAP. VII DISCUSIÓN

La selección de la cepa bacteriana se basó en dos criterios: la producción de la enzima extracelular xilanólítica y β -Glucosidasa y que se desarrolle en medio de cultivo sólido, teniendo de esta forma la certeza de que se trate de una cepa pura. De las tres cepas bacterianas estudiadas la única que cumplió los dos criterios fue la cepa bacteriana FT3 (bacilo gramnegativo) mostrando una actividad superior a las otras cepas bacterianas 2B y P5, además que no se tenía la certeza de la pureza de dichas cepas ya que estas no crecen en medio sólido.

Así también se ha visto que la mejor fuente de nitrógeno en la optimización es el extracto de levadura para la producción de xilanasas y β -Glucosidasas tanto en cultivo libre como encapsulado. El extracto de levadura es un producto rico en vitaminas, aminoácidos y otros factores de crecimiento que probablemente sean los responsables de la producción de las enzimas, hallando también gran diferencia entre ambas variables siendo la mejor la inmovilizada.

La encapsulación es una forma de proteger el material biológico de factores externos tales como el cambio de pH, metabolitos tóxicos, incrementándose así la actividad enzimática y por ende la biomasa la cual puede evidenciarse dentro de la perla tornándose al centro un color blanquecino.

Por otro lado en la optimización del pH del medio de cultivo se observa que las perlas de alginato son estables a pH ácidos siendo estas que aumentan la consistencia, disminuye la porosidad de la misma debido al soporte y al pH del medio, sin embargo las perlas de alginato no son estables a pH alcalinos llegando a despolimerizar completamente en el lapso de 2 días en el medio de cultivo llegando a la vez a incrementar su densidad entremezclándose con el sustrato siendo poco accesible para la bacteria. Por lo cual se decidió trabajar con células libres siendo más factible y menos costoso.

Así también, se ha determinado que para alcanzar mayor nivel de producción de la enzima xilanasas es necesario dotarla a la bacteria de sustratos crudos sin hidrólisis (paja de soya) siendo las xilanasas activas sobre polímeros y a la vez es necesario realizar un pre-tratamiento de la materia cruda (hidrólisis NaOH 1% de la paja de trigo) para la producción de las β -Glucosidasas

debido a que estas tienen mayor afinidad sobre los oligosacáridos y disminuye cuando son polímeros.

Toda enzima posee un pH óptimo de acción, debido a que las proteínas poseen muchos grupos ionizables, los cambios de pH pueden alterar su conformación y por lo tanto se modifican los grupos funcionales de los centros activos, lo que puede repercutir en el tipo de unión enzima-sustrato, estos efectos pueden provocar cambios en la velocidad máxima de reacción, en la afinidad de la enzima por el sustrato o en la estabilidad de la enzima, a la vez que también la temperatura influye sobre la estabilidad de la enzima la cual está determinada por la energía de activación y la desnaturalización de la proteína, las xilanasas de la cepa estudiada FT3 poseen un pH óptimo de reacción de 8 y una estabilidad hasta 70° C, las β -Glucosidasas poseen un pH óptimo de reacción de 7 y una estabilidad hasta 80° C.

CAP. VIII CONCLUSIÓN

Las cepas bacterias anaerobias termófilas FT3, 2B y P5 fueron aisladas de muestras obtenidas del altiplano boliviano. La cepa bacteriana FT3 mostró la mayor actividad xilanólítica de 2.0 UI/mL y β -glucosidasas de 48 UI/mL siendo la mejor de las tres cepas en estudio.

En cultivo de células libres y encapsuladas se optimizó la fuente de nitrógeno, la fuente de carbono y el pH, del medio de cultivo. La mejor fuente de nitrógeno fue el extracto de levadura llegándose a obtener una actividad xilanólítica y β -glucosidasa de hasta 2.46 UI/mL y 85 UI/mL respectivamente y como mejor fuente de carbono la paja de soya (*Glycine max*) como materia cruda obteniéndose una actividad xilanólítica de hasta 2.51 UI/mL, para las β -glucosidasas la mejor fuente de carbono es la paja de trigo (*Paja Triticum spp.*) pero como materia hidrolizada llegando a obtenerse una actividad de hasta 228 UI/mL cuando se trabajo con bacterias libres en ambos casos.

En la optimización del pH del medio de cultivo dio un rendimiento de 3.39 y 144 UI/mL a un pH de 8 y 9 para xilanasas y β -glucosidasas respectivamente, también a la vez existe una influencia de la concentración tanto de la fuente de carbono como de la fuente de nitrógeno dando como óptimo a una concentración de 6g/80mL de fuente de carbono paja de soya como materia cruda y 0.2g/L de fuente de nitrógeno extracto de levadura esto para la producción enzimática de xilanasas y 5g/L extracto de levadura como fuente de nitrógeno y 5269,776 mg/L de paja de trigo como fuente de carbono para la producción de β -glucosidasas.

CAP. IX PERSPECTIVAS FUTURAS

Dentro de las perspectivas futuras el progreso de la biotecnología de xilanasas y β -Glucosidasas ha llamado la atención a nivel mundial, ya que los métodos tradicionales de producción de enzimas pueden ser demasiado prolongados hasta la obtención de la enzima purificada. Por esta razón nace la necesidad de buscar nuevas alternativas que permitan la obtención de enzimas en tiempos cortos y con propiedades bioquímicas adecuadas para el proceso en el cual va a usarse, una de las cuales puede ser:

- La micro encapsulación de enzimas para que puedan ser reutilizadas repetidamente, ya que las enzimas solamente se utilizan una sola vez para luego desecharlas.
- La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control.

En este trabajo la bacteria productora de enzimas FT3 es un microorganismo nuevo con potencial aplicable por las características de resistencia a la temperatura que presenta, también a la vez crece en cualquier residuo agrícola como sustrato, sin embargo esta bacteria no está filogenéticamente identificada. La creciente demanda de xilanasas y β -Glucosidasas y su gran potencial en biotecnología nos llevan a continuar con los estudios multidisciplinarios de estos complejos enzimáticos, resultando interesantes por lo que se podría realizar en el futuro:

- La preparación de la transglicosilación dada por las β -Glucosidasas para su empleo para los detergentes biodegradables.
- Recuperación del extracto enzimático para utilizarlo en los procesos de blanqueo del papel reciclado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Amani MD., El Ahwany and Amany S. Youssef, Xylanase production by *Bacillus pumilus*: Optimization by statistical by and immobilization methods, *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3(6):727-732, 2007.
- Bernadette K., McCabe E., Clem Kuek, Geoffrey LR., Gordon Michael W. Phillips, Production of *b*-glucosidase using immobilised *Piromyces* sp. KSX1 and *Orpinomyces* sp. 478P1 in repeat-batch culture, *J Ind Microbiol Biotechnol* (2003) 30: 205–209.
- Blandino A., Macias M., and Cantero D., Calcium Alginate Gel as Encapsulation Matriz for Coimmobilized Enzyme Systems, *Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol. 110, 2003.
- Braud A., Jezequel K., Leger MA., Lebeau T., Siderophore Production by Using Free and Immobilized Cells of Two *Pseudomonads* Cultivated in a Medium Enriched With Fe and/or Toxic Metals (Cr, Hg, Pb), Wiley InterScience, *Biotechnology and Bioengineering*. DOI 10.1002/bit(2006) 1080-1088.
- Bravo Maria Amparo, *Bacterias anaerobias*, *Ciencia de la salud*. 2007 pp. 1-18.
- Breant D., Jezequel K. & Lebeau T., Optimization of the cell release from immobilised cells of *Bacillus simplex* cultivated in culture media enriched with Cd²⁺: influence of Cd²⁺, inoculum size, culture medium and alginate beads characteristics, *Biotechnology Letters* 24: 1237–1241, 2002.
- Bressel T., Paz AG., Baldo G., Lima EO., Matte U. and Saraiva ML., An effective device for generating alginate microcapsules, *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1, 136-140 (2008)
- Dhake AB., Patil MB., Production of B-Glucosidase by *Penicillium Purpurogenum*, *Brazilian Journal of microbiology*, 2005;36:170-176.
- Donkor ON. AND Shah NP., Production of β -Glucosidase and Hydrolysis of Isoflavone Phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in Soymilk, Vol. 73, Nr. 1, 2008—*journal of food science*.
- Fernandes TV., Klaasse GJ., Zeeman G., Sanders JPM., Van JB., Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology* 100(2009) 2575-2579.
- Gacesa P. Y Hubble J. *Tecnología de la Enzimas*. Acribia. Zaragoza. España 1990.
- Gueguen Y., Chemardin P., Labrot P., Arnaud A. and Galzy P. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from a new strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from cassava. *Journal of Applied Microbiology* 1997, 82, 469-476
- Gallardo O. *Caracterización de nuevas xilanasas bacterianas. ingeniería de enzimas con la xilanasas B de paenibacillus barcinonensis*. Tesis doctoral. Barcelona, 2007
- Godfrey T y Reichelt J., *Industrial Enzymology*, Macmillan Publishers Ltd United Kingdom, 1983.

-
- Hansson T., Adlercreutz P., Optimization of Galactoligosaccharide production from lactose using B- glycosidases from Hyperthermophiles, *Food Biotechnology*, 2001; 2:15.
- Hendriks A.T.W.M., Zeeman G., Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology* 100(2009) 10-18.
- Ivanova E., Chipeva V., Ivanova I., Dousset X., Poncelet D., Encapsulation of lactic acid bacteria in calcium alginate beads for bacteriocin production. *Journal of culture collections*, 2000-2002; 3:53-58.
- Kailasapathy K., Microencapsulation of Probiotic Bacteria, Technology and Potential Applications *Curr. Issues Intest. Microbiol.* (2002) 3: 39-48.
- Kulasingam T., Cultivating the uncultured, amylolytic microorganisms from ecological niches, Report of Thesis Doctoral Lund University. 2005.
- Kulkarni N., Shendye A. y Rao M, Molecular and biotechnological aspects of xylanases, *FEMS Microbiology Reviews* (1999), 23 (4): 411-456.
- Mattheus B., Peters S., Maurice CR. Franssen, Albert van der Padt, Aede de Groot, Remko M. Boom, Optimization of Production and Downstream Processing of the Almond b-Glucosidase-Mediated Glucosylation of Glycerol, 2001 John Wiley & Sons, Inc.
- Manual de procedimientos. Universidad de Buenos Aires, Laboratorio de Micología Experimental. 1999.
- Marichamy S., Mattiasson B., Rapid production of cellulase-free xylanases by solventogenic *Clostridia* from rumen, *Enzyme and Microbial Technology*, 2005;37 : 497–504.
- Martínez A., Balcázar L., Dantán G., Folch J., Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética, *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, 2008, Vol. 50, No 3 y 4:119-131.
- Mayorga L., Gutierrez A., Salgado L., Ponce T., Aislamiento de una clona que contiene un gen de xilanasas a partir de una genoteca de *cellulomonas flavigena*, *Rev. Mexicana de ciencias Farmaceuticas*, 2005; 36(2):5-9.
- Ponce NT., Perez AO., Celulasas y xilanasas en la industria. *Biotecnología y Bioingeniería*, Vol. 21(2002) 273-277.
- Poorna AC., Prema P., Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling, *Bioresource Technology* 98 (2007) 485–490.
- Rios N., Crespo CF., Terrazas LE., Alvarez MT., Aislamiento de cepas anaeróbicas termófilas productoras de celulasas y hemicelulasas implicadas en la producción de Bioetanol mediante técnicas de cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales, *Rev. Biofarbo*. 2007 ; 15 (1): 43-50.

Romero Gracia Susana, Desarrollo de una cepa etanológica a partir de *Bacillus subtilis*, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, 2003. pp. 1-77.

Sanchez Elena *Fernández* <http://www.encuentros.uma.es/encuentros91/bacterias.htm>

Smidsrod O y Skjak B. Alginate as an immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*. 1990; 8(3):71-78.

Tae Hyun Kim and Y.Y. Lee, Pretreatment of corn stover by soaking in Aqueous Ammonia, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol.121-124 (2005) 1119-1130.

Vera FL., *Enzimas*, Rev. R Acad. Ciencia exacta Física natural, vol. 101:2, pp 399-417,2007.

Wolfgang H., Tober I., Steven H., and Conn E., Characterization of ,Glucosidases with High Specificity for the Cyanogenic Glucoside Dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench Seedlings, *Biochemistry and Biophysics*, Vol. 252, No. 1, January, pp. 152-162,1987.

Yongming Zhu, Y.Y. Lee and Richard, T. Elander, Optimization of dilute-acid pretreatment of corn stover using a High-solids percolation reactor, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol.121-124 (2005) 1045-1054.

http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_57.asp

http://danival.org/600%20microbio/8400extremofilos/extrem_200_temp1.html

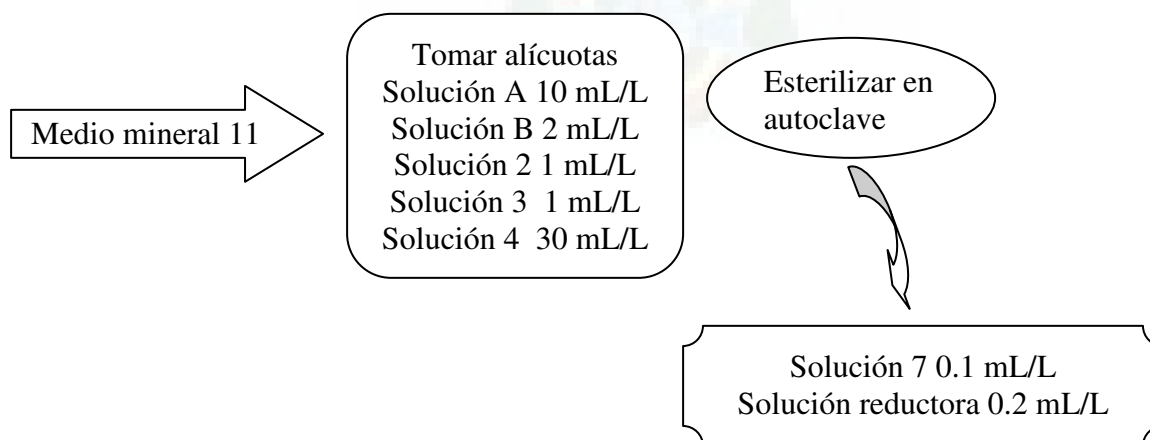
<http://www.estrucplan.com.ar/Producciones/entrega.asp?IDEntrega=1844>

ANEXOS

Anexo 1

Medio mineral basal 11

Solución	Composición	Cantidad
Solución A	NH ₄ Cl	200g/L
	NaCl	10g/L
	MgCl ₂ *6H ₂ O	10g/L
	CaCl ₂ *2H ₂ O	5g/L
Solución B	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	200g/L
Solución 2	FeCl ₂ *4H ₂ O	1,5 g
	HCl 25%	6,5 mL
	H ₃ BO ₃	60 mg
	CoCl ₂ *6H ₂ O	120 mg
	MnCl ₂ *4H ₂ O	100 mg
	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	25 mg
	NiCl ₂ *6H ₂ O	25 mg
	ZnCl ₂	70 mg
	CuCl ₂ *2H ₂ O	15 mg
	Agua destilada c.s.p.	1000 mL
Solución 3	Na ₂ SeO ₃	3 mg
	NaOH	0,5 g
	Agua destilada c.s.p.	1000 mL
Solución 4	NaHCO ₃	8.5g/100mL
Solución 7	Biotina	1 mg
	PABA	5 mg
	Vit. B12	5 mg
	Tiamina	10 mg
	Agua destilada c.s.p.	1000 mL
Solución reductora	Na ₂ S*9H ₂ O	2%



Anexo 2

DNS	
Compuesto químico	cantidad
Fenol	0,2 g
Sulfito de sodio	0,5 g
Ac. Dinitrosalicílico	10 g
Hidroxido de Sodio	10 g
Tartrato doble de sodio-potasio	200 g
Agua destilada csp	1000 mL

Disolver el hidróxido de sodio y el sulfato de sodio, añadir fenol y tartrato de sodio y potasio y por último añadir el ácido dinitrosalicílico en las cantidades indicadas en la tabla, para luego enrasar con agua destilada para un volumen de 1L.

(Se debe preparar en un matraz aforado color ámbar).

Anexo 3

Preparación de buffers

Buffer Citrato		
	Fórmula	Cantidad
Citrato de sodio	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	0,6258 g
Acido cítrico	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	0,603 g
Agua destilada csp.	H_2O	100 mL
Buffer Citrato 0,05M pH 3		

Buffer Acetato		
	Fórmula	Cantidad
Acetato de sodio	$NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$	0,101 g
Acido acético	CH_3COOH	0,2434 mL
Agua destilada csp.	H_2O	100 mL
Buffer Acetato 0,05M pH 4		

Buffer Acetato		
	Fórmula	Cantidad
Acetato de sodio	$NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$	0,432 g
Acido acético	CH_3COOH	0,10436 mL
Agua destilada csp.	H_2O	100 mL
Buffer Acetato 0,05M pH 5		

Buffer Fosfato		
	Fórmula	Cantidad
Fosfato disodico	Na ₂ H ₂ PO ₄	0,1 g
Fosfato monosodico	Na H ₂ PO ₄	0,52 g
Agua destilada csp.	H ₂ O	100 mL
Buffer fosfato 0,05M pH 6		

Buffer Fosfato		
	Fórmula	Cantidad
Fosfato disodico	Na ₂ H ₂ PO ₄	0,426 g
Fosfato monosodico	Na H ₂ PO ₄	0,23868 g
Agua destilada csp.	H ₂ O	100 mL
Buffer fosfato 0,05M pH 7		

Buffer Fosfato		
	Fórmula	Cantidad
Hidroxido de sodio	NaOH 10%	1,87 mL
Fosfato monosodico	Na H ₂ PO ₄	0,03717 g
Agua destilada csp.	H ₂ O	100 mL
Buffer fosfato 0,05M pH 8		

Buffer Amonio		
	Fórmula	Cantidad
Cloruro de amonio	NH ₄ Cl	0,286 g
Amoniaco	NH ₃	0,1688 g
Agua destilada csp.	H ₂ O	100 mL
Buffer fosfato 0,05M pH 9		

Buffer Carbonato		
	Fórmula	Cantidad
Carbonato ac de sodio	NaHCO ₃	0,286 g
Carbonato de sodio	Na ₂ CO ₃	0,1688 g
Agua destilada csp.	H ₂ O	100 mL
Buffer fosfato 0,05M pH 10		

Preparación de sustrato:

Sustrato xilano, disolver 0.2 g de xilano en 100 mL de buffer fosfato, ajustar el pH a 6

Sustrato pNPG, disolver 0.084364 g de pNPG en 100 mL de buffer citrato, ajustar el pH a 4.8

Determinación de azúcares reductores DNS:

Interpretación de resultados.

Test- Control = Abs real

Determinación de proteínas totales

Reactivo de lowry

1. Carbonato de sodio 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 de Folin

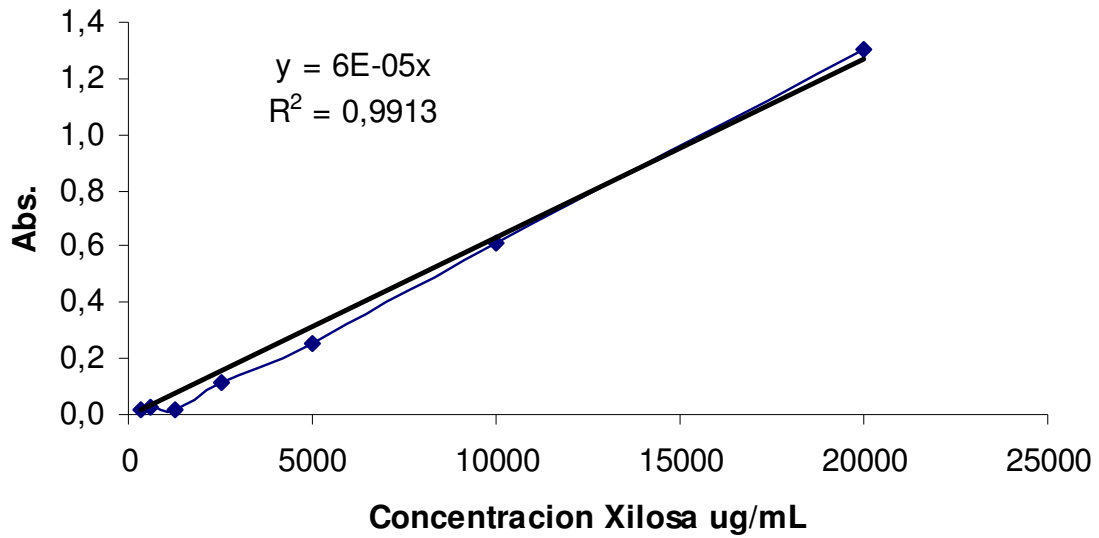
Ciacaltea diluido en agua destilada en una proporción 1:1



Anexo 4

Curvas de calibración

CURVA DE CALIBRACION XILOSA



CURVA DE CALIBRACION DE GLUCOSA

