
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCION I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL:

**“AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS O BACTERIAS PRODUCTORES DE CELULASAS
Y HEMICELULASAS A PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS PARA LA OBTENCIÓN
DE AZÚCARES REDUCTORES”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

I.Q. EMILENE REYES RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS

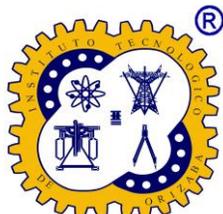
DRA. LETICIA LÓPEZ ZAMORA

CODIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA GUADALUPE AGUILAR USCANGA

ORIZABA, VER. MEXICO

OCTUBRE 2015





"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

FECHA: 20/10/2015
DEPENDENCIA: POSGRADO
ASUNTO: Autorización de Impresión
OPCIÓN: I

C. EMILENE REYES RODRIGUEZ
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN:
CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

"AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS O BACTERIAS PRODUCTORES DE CELULASAS Y HEMICELULASAS A PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES."

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E

M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES
JEFE DE LA DIV. DE ESTUDIOS DE POSGRADO



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO
TECNOLÓGICO
DE ORIZABA

ggc





"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

FECHA : 28/08/2015

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

C. M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACION.
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C. :

EMILENE REYES RODRIGUEZ

la cual lleva el título de:

"AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS O BACTERIAS PRODUCTORES DE CELULASAS Y HEMICELULASAS A PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES."

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : DRA. LETICIA LOPEZ ZAMORA

SECRETARIO : DRA. MARIA GUADALUPE AGUILAR USCANGA

VOCAL : DRA. YOLANDA SONIA PLIEGO BRAVO

VOCAL SUP. : M.C. MARIA ELENA GARCIA REYES

FIRMA

FIRMA

FIRMA

FIRMA

EGRESADO(A) DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

OPCION: I Tesis



DEDICATORIAS

A **Dios** quien es mi fuerza, mi esperanza, mi camino y mi guía.

A mi padre Bartolome Reyes López quien con sus palabras siempre me alienta a seguir adelante, demostrándome que sea cual sea la circunstancia de mi vida me apoya y me quiere sin condición, enseñándome día con día la fé en Dios.

A mi madre Inés Rodríguez Sarmiento quien siempre con cariño y comprensión me ha apoyado, a cada momento está lista para escucharme; a pesar de la distancia puedo sentir que me abraza y se va la tristeza y el dolor, me fortalece y renueva.

A mi abuelita quien todos los días pide a Dios que nos cuide, a mi tía y mi hermano que siempre me han estado a mi lado apoyándome.

A Javier Daniel Ramírez Amaya quien a pesar de mis múltiples defectos siempre ha estado a mi lado, me apoya, me alienta y me enseña a confiar en mí. Por estar conmigo en las buenas y en las malas siendo mi pilar de apoyo, mi cimiento y mi fortaleza, quien seca mis lágrimas y las cambia por sonrisas. Amor juntos iniciamos este proyecto de vida, juntos trabajamos en él y hoy juntos lo culminamos. Gracias por toda tu ayuda ya que sin tu apoyo y aliento esto no sería posible.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico que me brindo para poder realizar mis estudios de maestría.

Agradezco a la Dra. Leticia López Zamora por ser mi asesora y haberme aceptado sin conocerme, confiando en mí para llevar a cabo este proyecto de investigación. Gracias por su guía, apoyo y dedicación siempre le estaré agradecida.

Agradezco a la Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga por ser mi coasesora de proyecto y aceptarme en su laboratorio de Bioingeniería realizando una estancia de investigación. Gracias por guiarme y apoyarme incondicionalmente en cada etapa del proyecto y por permitirme ser parte de la gran familia que conforman cada uno de los profesores y estudiantes del laboratorio de bioingeniería.

Agradezco al Dr. Benigno Ortiz que a pesar de no ser mi asesor de proyecto siempre me apoyaba en cualquier duda que tuviese, le agradezco por su apoyo incondicional.

Agradezco al Dr. Javier Gómez por apoyarnos con los equipos del laboratorio ya que sin su apoyo, nos retrasaríamos en la realización de nuestros proyectos.

Agradezco a la Dra. Yolanda Sonia Pliego Bravo y la M.C María Elene García Reyes por las revisiones y puntos de vista que aportaron a este trabajo.

Agradezco al ahora Dr. Juan Francisco Castañón Rodríguez, por ser mi mentor y nunca ser celoso del conocimiento y que a pesar de su carga de trabajo siempre tenía tiempo de ayudar y a pesar de que no logre escalar sus peldaños de amistad, sé que es mi gran amigo.

Agradezco a mis amigos y compañeros de ITO Adrián, Kelvin, Mauricio, Yesenia, Roció y Álvaro, y del ITV Alberto, Armando, Gabriela, Germán, Guadalupe "Lupita", Inés, Libia, Lucia, Madai, Paola, Rodolfo y Víctor, quienes transforman las palabras amigo y compañero en familia, gracias por todo chicos.

RECONOCIMIENTOS

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- 2015 Expositor Determinación de actividad enzimática celulolítica de microorganismos aislados de bagazo de caña, sorgo, madera y coco por fermentación sumergida. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. “Retos de la Ingeniería Química en la Globalización”, 5-8 de mayo, Cancún, Quintana Roo, México.
- 2015 Expositor Determinación de actividad xilanolítica por fermentación sumergida (SmF) y fermentación sólida (SSF) a partir de microorganismos aislados de residuos lignocelulósicos. Congreso Internacional de Investigación de Academia Journals en Ciencias y Sustentabilidad. 27-29 de mayo. Universidad Veracruzana, Tuxpan, Veracruz, México.

PUBLICACIONES

Emilene Reyes Rodríguez, Leticia López Zamora, María Guadalupe Aguilar Uscanga. Determinación de actividad enzimática celulolítica de microorganismos aislados de bagazo de caña, sorgo, madera y coco por fermentación sumergida. Memoria de congreso AMIDIQ 2015 online con ISBN 978-607-95593-3-5.

Emilene Reyes Rodríguez, Leticia López Zamora, María Guadalupe Aguilar Uscanga. Determinación de actividad xilanolítica por fermentación sumergida (SmF) y fermentación sólida (SSF) a partir de microorganismos aislados de residuos lignocelulósicos. Portal de internet CICS.AcademiaJournals.com con ISSN 2169-6160 online, memorias en CDROM con ISSN 2169-6152, y libro electrónico “Investigación en las Ciencias con Pertinencias” con ISSN 978-1-939982-09-4.

RESUMEN

Aislamiento y selección de hongos o bacterias productores de celulasas y hemicelulasas a partir de residuos lignocelulósicos para la obtención de azúcares reductores.

Elaborada por: I.Q Emilene Reyes Rodríguez
Dirigida por: Dra. Leticia López Zamora
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Debido al posible agotamiento del petróleo y la necesidad de obtener biocombustibles que satisfagan la demanda mundial, además de aminorar los efectos de contaminación en el medio ambiente, se ha trascendido en la búsqueda de materia prima renovable que pueda ser aprovechable, una de estas investigaciones se centra en los biocombustibles de segunda generación a partir de materia prima lignocelulósica. Dentro de las etapas de obtención se encuentra la hidrólisis enzimática donde la celulosa y hemicelulosa se hidrolizan a través de preparados enzimáticos con actividad celulasa y xilanasas. Por todo lo anterior este trabajo tiene como objetivo general obtener y caracterizar cinéticamente, hongos o bacterias productoras de celulasas y hemicelulasas a partir de residuos lignocelulósicos que favorezcan la producción de azúcares reductores, valorando el efecto de diferentes condiciones de operación en el proceso de hidrólisis. Se obtuvieron un total de 96 cepas puras de microorganismos capaces de crecer en medio de Carboximetilcelulosa (CMC) y Xilano, 49 en medio de CMC y 47 en medio de xilano. Un total de 21 en CMC y 24 en xilano pasaron la primera etapa de selección cualitativa mediante la técnica de rojo congo; en la selección cuantitativa por fermentación sumergida (SMF) se obtuvieron un total de 3 cepas para cada medio, las cuales fueron probadas en fermentación sólida (SSF), las mejores cepas fueron las codificadas como M2H5 y MH1-a2 para la obtención de extractos con actividad celulasa y xilanasas respectivamente. Ambos tipos de extracto obtuvieron su mejor capacidad de hidrólisis a pH 5, 50°C, 300 rpm y 96 h. La máxima producción de azúcares para medio de CMC fue de 0.48 g/L y para medio de xilano fue de 6.35 g/L en el medio preparado a 10 g/L de CMC o Xilano respectivamente. La determinación de parámetros cinéticos se realizó por SMF y Fermentación con bagazo de sorgo, los resultados obtenidos en fermentación sumergida para actividad celulasa fueron $K_m=2.541$ g/L, $V_{max}=4.5226 \times 10^{-3}$ g/Lh y $K_{cat}=0.102524$ min⁻¹, y para actividad xilanasas un valor de $K_m=11.2948$ g/L, $V_{max}=0.2967$ g/Lh y $K_{cat}=0.16434$ min⁻¹, para fermentación con bagazo de sorgo en actividad celulasa se obtuvo un valor de $K_m=0.898$ g/L, $V_{max}=2.893 \times 10^{-3}$ g/Lh $K_{cat}=6.558 \times 10^{-3}$ min⁻¹, y en actividad xilanasas un valor de $K_m=28.2898$ g/L, $V_{max}=0.0247$ g/Lh y $K_{cat}=0.01368$ min⁻¹.

ABSTRACT

Isolation and selection of fungi or bacteria producers of cellulases and hemicellulases from lignocellulosic residues for obtaining reducing sugars.

By: I.Q Emilene Reyes Rodríguez
Advisor: Dra. Leticia López Zamora
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Due to possible exhaustion of fuel and the necessity to get a new fuel which satisfies global demand, also it can reduce the pollution of environment, researches have been transcended to find a raw material which it can be harnessed. One of this research is around second generation fuels from lignocellulosic raw materials. Inside of the stages for obtaining a fuel, we found the enzymatic hydrolysis, where cellulase and hemicellulase are hydrolyzed through enzyme preparations with activity cellulases and xylanases. therefore this work has as general objective obtaining and kinetically characterize of fungi or bacteria producers of cellulases and hemicellulases from lignocellulosic residues which favor the production of reducing sugars, valuing the effect of different condition of operation in hydrolysis process. 96 strain able to growing in CMC y xylan medium were obtained, of which 49 in carboxymethylcellulose (CMC) and 47 in Xylan. 21 in CMC and 24 in xylan passed the first test of qualitative selection by the technique of congo red; 3 strains for each medium were obtained by the quantitative selection through submerged fermentation (SMF). the best 3 strains were selected and encoded as M2H5 y MH1-a2 for obtaining of enzyme extracts with activity cellulase and xylanase respectively. the best capacity of hydrolysis was obtained at pH 5, 50 C 300 rpm y 96 h for both kind of extract. the maximum production of sugar for medium CMC was 048 g/L and for the xylan medium was 6.35 g/L in a prepared medium with 10 g/l of CMC or xylan respectively. The determination of parameters kinetic was made by SMF and fermentation with sorghum bagasse, the results obtained in submerged fermentation for cellulase activity were $K_m = 2.541$ g/L, $V_{max} = 4.5226 \times 10^{-3}$ g/Lh and $K_{cat} = 0.102524$ min⁻¹, and for xylan activity was $k_m = 11.2948$ g/L, $V_{max} = 0.2967$ g/Lh and $K_{cat} = 0.16434$ min⁻¹, for fermentation with bagasse sorghum with activity cellulase was obtained values the $K_m = 0.898$ g/L, $V_{max} = 2.893 \times 10^{-3}$ g/Lh and $K_{cat} = 6.558 \times 10^{-3}$ min⁻¹, was obtained values in xylan activity of $K_m = 28.2898$ g/L, $V_{max} = 0.0247$ g/Lh y $K_{cat} = 0.01368$ min⁻¹.

ÍNDICE

	Pág
Resumen	
Abstract	
Lista de Figuras	v
Lista de Tablas	ix
Nomenclatura	xi
Introducción	1
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
1.1 Residuos lignocelulósicos	4
1.1.1 Bagazo de caña	4
1.1.2 Bagazo de sorgo dulce	5
1.1.3 Madera	6
1.2 Materiales lignocelulósicos	7
1.2.1 Celulosa	8
1.2.2 Hemicelulosa	9
1.2.3 Lignina	10
1.3 Hidrolisis enzimática	11
1.3.1 Celulasas	11
1.3.1.1 Tipos de celulasas	12
1.3.1.2 Mecanismos de acción	13
1.3.2 Xilanasas	15
1.3.2.1 Tipos de xilanasas	15
1.3.2.2 Mecanismos de acción	15
1.3.3 Métodos de obtención	16
1.3.3.1 Fermentación sumergida (SMF)	16
1.3.3.2 Fermentación en estado sólido (SSF)	17
1.3.3.3 Comparación entre SMF y SSF	18

1.3.4 Microorganismos productores de celulasas y xilanasas	20
1.3.4.1 Hongos y levaduras	20
1.3.4.2 Bacterias	22
1.4 Antecedentes bibliográficos	24
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Recolección y toma de muestras	29
2.2 Aislamiento	29
2.3 Propagación y mantenimiento de microorganismos	30
2.4 Caracterización cinética de actividad enzimática	31
2.4.1 Selección primaria. Determinación cualitativa de actividad enzimática (Celulasa y Xilanasas)	31
2.4.2 Selección secundaria. Determinación cuantitativa de actividad enzimática (Celulasa y Xilanasas)	33
2.4.2.1 Activación de cepas	33
2.4.2.2 Preparación del inoculo	34
2.4.2.3 Inoculación	34
2.5 Fermentación sumergida	35
2.5.1 Determinación de Azúcares Reductores	35
2.5.1.1 Curva patrón de glucosa	36
2.5.1.2 Curva patrón de xilosa	37
2.6 Pretratamiento de bagazo de sorgo	37
2.6.1 Tratamiento ácido-alcalino	38
2.6.2 Tratamiento alcalino	38
2.7 Fermentación en estado sólido en bagazo pretratado	38
2.7.1 Fermentación sólida de hongos con actividad celulasa	38
2.7.2 Fermentación sólida de hongos con actividad xilanasas	39
2.8 Obtención de extractos enzimáticos	39
2.8.1 Determinación de actividad enzimática específica	39
2.8.1.1 Actividad celulasa	39

2.8.1.2 Actividad xilanasa	40
2.8.2 Determinación de proteína extracelular por el Método de Brandford	40
2.8.2.1 Curva patrón de proteína	40
2.9 Evaluación del pH y temperatura	41
2.10 Determinación de las condiciones de operación	42
2.11 Determinación de parámetros cinéticos	42
2.11.1 Determinación de K_m y V_{max} en SMF	43
2.11.2 Determinación de K_m y V_{max} en bagazo de sorgo	43
2.11.3 Determinación de K_{cat}	43
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Aislamiento de microorganismos	46
3.2 Propagación y mantenimiento de los microorganismos	47
3.3 Caracterización cinética de actividad enzimática	48
3.3.1 Selección primaria. Actividad cualitativa de actividad enzimática	48
3.3.2 Selección secundaria. Actividad cuantitativa de celulosa por fermentación sumergida (SMF)	52
3.3.2.1 Determinación de glucosa	54
3.3.3 Selección secundaria. Actividad cuantitativa de xilanasas por fermentación sumergida (SMF)	56
3.3.3.1 Determinación de xilosa	58
3.4 Fermentación en estado sólido	61
3.4.1 Fermentación en estado sólido utilizando bagazo de sorgo dulce con tratamiento ácido-alcalino	61
3.4.2 Fermentación en estado sólido utilizando bagazo de sorgo dulce con tratamiento alcalino	62
3.5 Determinación de pH óptimo	64
3.5.1 Determinación de pH óptimo en extracto con actividad celulasa	64
3.5.1.1 Determinación de proteína extracelular	65

3.5.2 Determinación de pH óptimo en extracto con actividad xilanasa	67
3.5.2.1 Determinación de proteína extracelular	67
3.6 Determinación de temperatura óptima	69
3.6.1 Determinación de temperatura óptima en extracto con actividad Celulasa	69
3.6.2 Determinación de temperatura óptima en extracto con actividad Xilanasa	71
3.7 Determinación de condiciones de operación	72
3.7.1 Determinación de condiciones de operación para el extracto enzimático de actividad celulasa	72
3.7.2 Determinación de condiciones de operación para el extracto enzimático de actividad xilanasas	75
3.8 Determinación de parámetros cinéticos por fermentación sumergida	77
3.8.1 Determinación de K_m , V_{max} y K_{cat} en extracto crudo con Actividad Celulasa	78
3.8.2 Determinación de K_m , V_{max} y K_{cat} en extracto crudo con actividad Xilanasa	82
3.9 Determinación de parámetros cinéticos por fermentación con bagazo de sorgo	88
3.10.1 Determinación de K_m , V_{max} y K_{cat} en extracto crudo con actividad celulasa	88
3.10.2 Determinación de K_m , V_{max} y K_{cat} en extracto crudo con actividad xilanasa	93
 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	 101
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág
1.1	Estructura del material lignocelulósico (Maki <i>et al.</i> , 2009)	8
1.2	Estructura de la celulosa (Romero <i>et al.</i> , 2009)	8
1.3	Segmento de estructura de la hemicelulosa (Montoya, 2008)	9
1.4	Estructura de la lignina (Chávez-Sifontes y Domine, 2013)	10
1.5	Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa (Paredes, 2010)	14
1.6	Estructura del xilano y su interacción con enzimas hemicelulolíticas (Brink y Vries, 2011)	16
1.7	Producción de enzimas usando el método tradicional SMF en comparación con el método de SSF (Zhuang <i>et al.</i> , 2007).	18
2.1	Proceso para determinación de actividad enzimática y parámetros cinéticos de microorganismos aislados de residuos lignocelulósicos.	28
2.2	Sembrado de muestras en agua peptonada para incubación	29
2.3	Prueba cualitativa de actividad celulasa y xilanasas	32
2.4	Curva patrón de glucosa	36
2.5	Curva patrón de xilosa	37
2.6	Curva patrón de proteína	40
3.1	Siembra por extensión con espátula de Drigalsky en medio CMC y Xilano (XIL)	46
3.2	Siembra: (a) por agotamiento; (b) siembra por impronta	46
3.3	Grupo representativo del total de microorganismos aislados	47
3.4	Siembra en tubo inclinado de: (a) hongos, (b) bacterias, (c) levadura	47
3.5	Prueba cualitativa de actividad en xilano (XIL)	49
3.6	Prueba cualitativa de actividad en carboximetilcelulosa (CMC)	50
3.7	Resultados de absorbancia a 620 nm en SMF con bacterias en medio de CMC	52

3.8	Resultados de absorbancia a 620 nm en SMF con: (a) hongos de madera, (b) bagazo de caña, sorgo y coco, en medio de CMC	53
3.9	Determinación de glucosa en bacterias en SMF de 72 en medio CMC	54
3.10	Determinación de glucosa en: (a) hongos de madera, (b) bagazo de caña, sorgo y coco, en SMF de 120 h en medio CMC	55
3.11	Resultados de absorbancia a 620 nm en SMF en: (a) hongos de madera, (b) bagazo de caña y madera, (c) bagazo de sorgo y coco, en medio de XIL	57
3.12	Resultados de absorbancia a 620 nm en SMF con bacterias en medio de XIL	58
3.13	Determinación de xilosa en: (a) hongos de madera, (b) bagazo de caña, sorgo y coco, en SMF de 120 h en medio de XIL	59
3.14	Determinación de xilosa en bacterias en SMF de 96 h en medio de XIL	60
3.15	Fermentación sólida en bagazo de sorgo con tratamiento ácido-alcalino de las cepas seleccionadas con actividad celulasa	61
3.16	Fermentación en estado sólido en celulosa de sorgo	62
3.17	Fermentación sólida en bagazo de sorgo con tratamiento alcalino de las cepas seleccionadas con actividad xilanasa	63
3.18	Fermentación en estado sólido en celulosa-hemicelulosa de sorgo	63
3.19	Efecto del pH sobre la actividad celulasa	64
3.20	Efecto del pH con respecto a la proteína extracelular	64
3.21	Determinación de actividad enzimática celulasa a diferentes pH	66
3.22	Efecto del pH sobre la actividad xilanasa	67
3.23	Efecto del pH con respecto a la proteína extracelular	68
3.24	Determinación de actividad enzimática xilanasa a diferentes pH	69
3.25	Efecto de la temperatura sobre la actividad celulasa	70
3.26	Efecto de la temperatura sobre la actividad xilanasa	71

3.27	Efecto principal (V_{Agit}) y la interacción de las (V_{Agit}) con la concentración de extracto del diseño de experimentos 2^2 para extracto con actividad celulasa. a) Efecto de (V_{Agit}) (-1= 200 rpm, 1=300 rpm), b) Efecto de (V_{Agit}) (-1= 200 rpm, 1=300 rpm) con la concentración de extracto (-1=1mL, 1=2mL)	73
3.28	Residuales del experimento del extracto con actividad celulasa con respecto a la obtención de Glucosa (g/L)	74
3.29	Efecto principal (V_{Agit}) y la interacción de las (V_{Agit}) con la concentración de extracto del diseño de experimentos 2^2 para extracto con actividad xilanasas. a) Efecto de V_{Agit} (-1= 200 rpm, 1=300 rpm), Efecto de la concentración de extracto (-1= 1 mL, 1=2 mL) con las V_{Agit} (-1=200 rpm, 1=300 rpm) y c) Efecto de V_{Agit} (-1= 200, 1=300) con la concentración de extracto (-1=1mL, 1=2mL)	76
3.30	Residuales del experimento del extracto con actividad xilanasas con respecto a la obtención de Xilosa (g/L)	77
3.31	Formación de producto a diferentes concentraciones de sustrato (CMC)	78
3.32	Velocidades medias a diferentes concentraciones de sustrato (CMC)	79
3.33	Regresión lineal en base al modelo de Lineweaver-Burk para Celulasas	80
3.34	Comparación de datos de velocidades con respecto al modelo cinético para celulasas	81
3.35	Formación de producto a diferentes concentraciones de sustrato (xilano)	83
3.36	Velocidades medias a diferentes concentraciones de sustrato (xilano)	84
3.37	Regresión lineal en base al modelo de Lineweaver-Burk para xilanasas	86

3.38	Comparación de datos de velocidades con respecto al modelo cinético para xilanasas	84
3.39	Formación de producto a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo ácido-alkalino)	89
3.40	Velocidades medias a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo ácido-alkalino)	90
3.41	Regresión lineal en base al modelo de Lineweaver-Burk para celulasa en SSF	92
3.42	Comparación de datos de velocidades con respecto al modelo cinético para celulasas en bagazo de sorgo ácido-alkalino	93
3.43	Formación de producto a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo alkalino)	94
3.44	Velocidades medias a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo alkalino)	95
3.45	Regresión lineal en base al modelo de Lineweaver-Burk para xilanasas en SSF	97
3.46	Comparación de datos de velocidades con respecto al modelo cinético para celulasas en bagazo de sorgo alkalino	98

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág
1.1	Estados productores de caña de azúcar en México	5
1.2	Estados productores de sorgo dulce en México	6
1.3	Estados productores de residuos maderables en México año 2012	7
1.4	Comparación entre el sistema de cultivo en fase sólida y el sistema en fase sumergida	19
1.5	Hongos a partir de los cuales se obtienen enzimas celulósicas y hemicelulósicos	21
1.6	Bacterias a partir de los cuales se obtienen enzimas celulósicas y/o hemicelulósicos	23
2.1	Composición de medios para aislamiento	30
2.2	Composición de medios para mantenimiento	31
2.3	Medios prueba cualitativa de actividad celulosa y xilanasa (Gaitan y Pérez, 2007)	32
2.4	Composición de medios para activación	33
2.5	Medio de trazas de Mandels y Weber (1969)	34
2.6	Matriz del diseño de experimentos 2 ²	42
3.1	Total de microorganismos aislados en medios selectivos de CMC y XIL	48
3.2	Criterios a tomar para los microorganismos a emplear en la actividad cuantitativa	51
3.3	Diseño de experimentos 2 ² para el extracto con actividad celulasa	72
3.4	ANOVA para el diseño de experimentos 2 ² para extracto con actividad celulasa	72
3.5	Diseño de experimentos 2 ² para el extracto con actividad xilanasa	75
3.6	ANOVA para el diseño de experimentos 2 ² para extracto con actividad xilanasa	75
3.7	Velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sustrato (CMC)	80

3.8	Velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sustrato (Xilano)	85
3.9	Velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo ácido-alcalino)	91
3.10	Velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo alcalino)	96
3.11	Valores aparentes de K_m , V_{max} y K_{cat} de extractos enzimáticos crudos con actividad celulasa y xilanasas	99

NOMENCLATURA

ATP	Adenosin trifosfato
AGU	α -glucoronidasa
AXE	Acetil (xylan) estereasa
AXH	Arabinoxylan α -arabinofuronphidrolasa
BXL	β -1-4-xylosidasa
CMC	Carboximetilcelulosa
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
FAE	Feruloyl esterasa
HR	Humedad relativa
K_m	Constante de Michaelis-Menten (μ M)
PDA	Agar Papa Dextrosa
SMF	Fermentación sumergida
SSF	Fermentación en estado sólido
UI	Unidades internacionales
UPF	Unidades de papel filtro
V_{max}	Velocidad máxima (μ M/min)
XIL	Xilano
XLN	β -1-4-endoxylanasa
YPD	Agar extracto de levadura-peptona-dextrosa
K_{cat}	Constante catalítica (min^{-1})

INTRODUCCIÓN

Las perspectivas de agotamiento de los combustibles fósiles sumado a la demanda creciente de energía, sitúan a los biocombustibles líquidos como una alternativa energética renovable, en el marco de la creciente valoración de combustibles que tengan bajo impacto en la emisión de carbono. El bioetanol puede ser obtenido, a partir de diferentes materias primas ricas en: azúcares (caña de azúcar, remolacha azucarada, sorgo dulce), almidones (trigo, maíz, cebada, yuca) y celulosa (desechos agrícolas, forestales y municipales) (Bueno *et al.*, 2009). Dentro de las etapas para su obtención se encuentran: el pretratamiento, la hidrólisis enzimática y la fermentación, cada etapa forma parte importante del proceso debido a que si alguna etapa no cumple con su objetivo se aminora el rendimiento en la producción del biocombustible.

Esta investigación se centra en la obtención de extractos enzimáticos con actividad celulasa y xilanasas que puedan ser aprovechadas de manera sinérgica o por separada en la obtención de azúcares reductores factibles de ser aprovechados en la obtención de biocombustibles. Los extractos enzimáticos se obtuvieron a partir de microorganismos aislados de materia prima lignocelulósica que presentará deterioro microbiológico para favorecer la presencia de microorganismos con capacidad de secreción de las enzimas. Cada tipo de microorganismo se evaluó de forma cualitativa y cuantitativa, determinando su capacidad de hidrólisis de celulosa y xilano a glucosa y xilosa. La importancia de la obtención de microorganismos nativos de la materia prima lignocelulósica nos permite favorecer y asegurar que el microorganismo es capaz de crecer y desarrollarse en su medio, debido a que proviene de este. Los extractos enzimáticos permitirían aminorar los costos de producción de bioetanol, y asegurar que al poseer el microorganismo productor es posible tener una fuente inagotable de producción de enzima, los procesos de purificación permitirán su cuidado y mantenimiento por largos periodos de tiempo.

Las múltiples aplicaciones de los extractos enzimáticos tienen una gama inimaginable de aplicaciones un ejemplo de esto es su aplicación en la industria alimentaria donde se aplican en la extracción de jugos, almidón, colorantes, antioxidantes entre otros. Por todo lo anterior el objetivo de este trabajo fue el aislamiento y selección de hongos o bacterias productoras de celulasas y hemicelulasas para la obtención de azúcares reductores. Para lograr este objetivo se seleccionaron diferentes muestras de materiales lignocelulósicos que presentaran deterioro microbiológico para llevar a cabo el aislamiento y selección de hongos o bacterias productoras de celulasas y hemicelulasas, una vez obtenidos los microorganismos se efectuó una primera selección de actividad de tipo cualitativa con la técnica de rojo congo, las cepas con el mejor halo de hidrólisis pasaron a la etapa de selección secundaria cuantitativa en donde se realizó la caracterización cinética de producción enzimática en cultivo sumergido (SMF); las mejores cepas en esta etapa pasaron a la fermentación sólida (SSF), en donde se obtuvieron los extractos enzimáticos crudos. Se evaluó el efecto del pH y temperatura de los extractos con ayuda de un diseño de experimentos 2^2 . Una vez obtenidos estos factores se determinaron las mejores condiciones de operación de velocidad de agitación y concentración de extracto enzimático en la obtención de azúcares reductores. Los parámetros cinéticos K_m , V_{max} y K_{cat} se calcularon en base a las cinéticas a diferentes concentraciones de sustrato en SMF y SSF con bagazo de sorgo.

CAPÍTULO 1
FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Residuos lignocelulósicos

Dentro de los materiales lignocelulósicos de mayor importancia, uso y aplicación a nivel industrial se tienen los residuos provenientes de la industria azucarera, así como el sorgo dulce, residuos maderables entre otros. Los materiales posteriormente de ser utilizados en su debido proceso industrial generan gran cantidad de residuos que pueden ser una fuente de aprovechamiento por su composición química. Entre los residuos más importante se tienen los siguientes:

1.1.1 Bagazo de caña

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) es una gramínea tropical, un pasto gigante emparentado con el sorgo y el maíz en cuyo tallo se forma y acumula un jugo rico en sacarosa, compuesto que al ser extraído y cristalizado en el ingenio forma el azúcar. La sacarosa es sintetizada por la caña gracias a la energía tomada del sol durante la fotosíntesis.

La caña de azúcar suministra el 70% de la demanda internacional de azúcar, y el resto se obtiene de la remolacha. El azúcar se obtiene del jugo fresco y dulce de la caña, sus hojas y tallos se utilizan como forraje para el ganado. Otros productos como la melaza se emplean para la fabricación de bebidas alcohólicas como el ron. Las fibras de bagazo que resultan de la molienda se utilizan para la fabricación de papel y madera prensada (COVECA, 2008).

En México la industria azucarera representa altas producciones y relevancia económica y social, los estados con mayor producción se muestran en la Tabla 1.1. La producción en el estado de Veracruz en el año 2012-2013 fue de 61,438,534 toneladas, lo que se estima en una alta producción de azúcar a nivel nacional. El bagazo es el residuo del tallo o cuerpo de la caña de azúcar que queda después del exprimido. A fin de que ocupe menor espacio, el bagazo se comprime para formar

pacas que se apilan en el exterior del ingenio, normalmente se deja espacio entre las pilas para que el aire circule y las pacas se sequen; posteriormente se envían a otras industrias para utilizarlas.

Tabla 1.1 Estados productores de caña de azúcar en México.

Estados	Producción (%)
Veracruz	37
San Luis Potosí	11
Jalisco	11
Oaxaca	6
Chiapas	6

Fuente: SIAP, 2014

El bagazo fresco y húmedo apilado a la intemperie produce un residuo de jugo que es susceptible de ser fermentado por levaduras, la temperatura favorece el crecimiento de muchas especies de hongos, principalmente actinomicetos termo y mesofílicos (Basanta *et al.*, 2007).

1.1.2 Bagazo de sorgo dulce

El sorgo o zahína (*Sorghum spp*) es un género botánico, originario del este de África, perteneciente a la familia de las gramíneas, del que existen unas 20 especies. Se adapta bien al crecimiento en áreas áridas o semiáridas cálidas. Tolerancia al calor, la sal, y las inundaciones. Se trata como planta anual, aunque es hierba perenne y en los trópicos puede cosecharse varias veces al año; tiene una altura aproximada de 1 a 3 m en dependencia de la subespecie. Los estados con mayor producción en México se muestran en la Tabla 1.2.

Las diferentes subespecies cultivadas usualmente se dividen en cuatro grupos, según sus diferentes usos: sorgo grano (alimentación animal y forraje), sorgo forrajero (para pastoreo y henificar), sorgo dulce (etanol, jarabes del sorgo, alimento

animal) y sorgo escoba (para la confección de escobas y cepillos). Otra clasificación los divide por tipos: grano, dual (grano y forraje) y tallo dulce (combustible, alimento animal y forraje).

Tabla 1.2 Estados productores de sorgo dulce en México

Estados	Producción (%)
Guanajuato	44.65
Michoacán	18.56
Tamaulipas	6.75
Jalisco	5.16
Morelos	5.0
Sinaloa	4.9
Puebla	2.7
Sonora	2.5
Chihuahua	1.78
Resto del país	8.0

Fuente: SAGARPA, 2013

El sorgo dulce es un cultivo con un tallo rico en azúcares fermentables (16-23 °Brix), por lo que es comparable con la caña de azúcar (Bueno *et al.*, 2009).

1.1.3 Madera

El aserrín y la corteza de los árboles se consideran como los residuos maderables que se desprenden de los procesos de transformación de la madera, mismos recursos que poseen una amplia aplicación a nivel industrial puesto que en su composición estructural poseen celulosa, hemicelulosa y lignina.

En México se tienen diferentes tipos de climas, y por ende se tienen diferentes tipos de bosques: Bosques tropicales, en donde se dan maderas preciosas como la caoba, el cedro el ébano y demás; bosques mixtos, donde existen maderas duras y maderas

suaves; bosques de coníferas, donde se tienen maderas blandas y se tiene producción de la celulosa y el papel y bosques espinosos, los cuales son desérticos y se tienen la producción del hule, ixtle, jobjoba etc. En la Tabla 1.3 se muestran los principales estados productores.

Tabla 1.3 Estados productores de residuos maderables en México año 2012.

Estados	Producción (%)
Durango	32.97
Chihuahua	17.72
Michoacán	8.11
Oaxaca	7.32
Veracruz	5.24

Fuente: SEMARNAT, 2012

En la producción maderable se explotan maderas duras o maderas preciosas que derivan de la categoría botánica de Angiospermas, las maderas que se tienen en este tipo de bosque son: El cedro rojo, caoba, ébano, palo de rosa y otras. Las principales entidades federativas que tienen mayor participación son: Durango, Chihuahua, Michoacán, Jalisco, Oaxaca y Puebla (Díaz, 2001).

1.2 Materiales lignocelulósicos

La materia lignocelulósica, es un gran recurso potencial para la producción de biocombustibles, ya que es en gran medida abundante, de bajo costo y la producción de tales recursos es el medio ambiente. Los residuos agrícolas son una gran fuente de biomasa lignocelulósica, que es renovable, principalmente sin explotar. Estos recursos incluyen: hojas y tallos tales como fibra de maíz, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar, cáscaras de arroz, cultivos leñosos y residuos forestales (Maki *et al.*, 2009). Los componentes principales de naturaleza que conforman el material

lignocelulósico son de dos tipos, celulosa y hemicelulosa como se muestra en la Figura 1.1

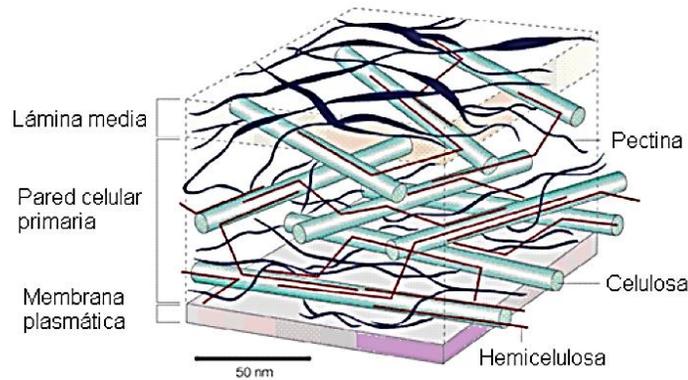


Figura 1.1 Estructura del material lignocelulósico (Maki *et al.*, 2009)

1.2.1 Celulosa

La celulosa que es el biopolímero de D-glucosa, es el material orgánico más abundante sobre la corteza terrestre (Montoya, 2008). La celulosa es además la forma más común de encontrar el carbono de la biomasa. Las plantas sintetizan la celulosa como material estructural para soportar su peso. Las moléculas largas de celulosa llamadas microfibrillas, forman haces por los puentes de hidrógeno que se crean entre los numerosos grupos-OH de los anillos de glucosa. En la celulosa las unidades de D-glucosa están unidas por enlaces glicosídicos β -1,4, disposición bastante rígida y muy estable. En la Figura 1.2, se muestra una estructura parcial de la celulosa (Romero *et al.*, 2009).

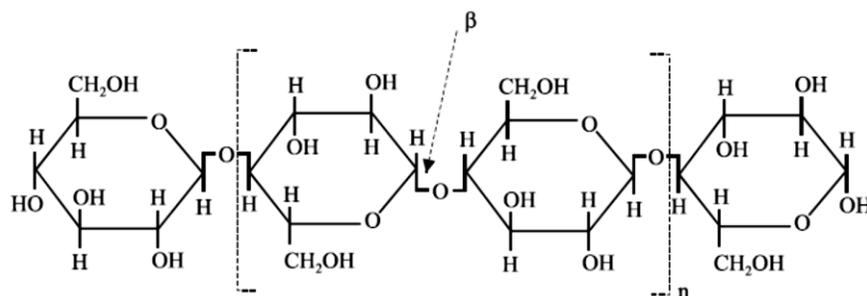


Figura 1.2 Estructura de la celulosa (Romero *et al.*, 2009)

La celobiosa es la unidad de repetición más pequeña de celulosa y en última instancia, se puede convertir en glucosa (Maki *et al.*, 2009).

1.2.2 Hemicelulosa

Después de la celulosa, las hemicelulosas son los segundos polisacáridos más abundantes en las plantas. Junto con pectinas y ligninas, hemicelulosas forman el complejo matriz de la pared celular entre las microfibrillas de celulosa. Cada una de estas clases de compuestos de matriz se crea para formar redes separadas, que están estrechamente entrelazadas, con lo que las hemicelulosas están parcialmente unidas con microfibrillas de celulosa a través de límites de hidrógeno.

La hemicelulosa es un polímero heterogéneo, que varía en composición de una planta a otra y dentro de las diferentes partes de la misma planta. Se compone principalmente de pentosas (D-xilosa, D-arabinosa), hexosas (D-manosa, D-glucosa, D-galactosa) y ácidos de azúcar. En maderas duras hemicelulosa contiene principalmente xilanos, mientras que en blanda principalmente glucomananos están presentes (Maki *et al.*, 2009).

El xilano es el componente principal de la hemicelulosa este polisacárido es dominante en la pared celular de angiospermas y plantas herbáceas, por lo que es el componente más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Hoch, 2007). La estructura de la hemicelulosa se muestra en la Figura 1.3.

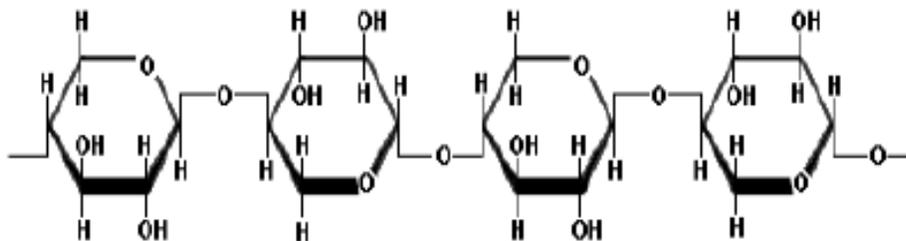


Figura 1.3 Segmento de estructura de la hemicelulosa (Montoya, 2008)

1.2.3 Lignina

La lignina tienen las siguientes características: (1) Son polímeros vegetales construidos a base de unidades de fenilpropanoides; (2) Presentan la mayor parte de los grupos metoxilo contenidos en la madera; (3) Son resistentes a la hidrólisis ácida, fácilmente oxidables, solubles en bisulfito o álcalis caliente, y fácilmente condensables con fenoles o tioles; (4) Cuando se hace reaccionar con nitrobenzeno en una solución alcalina caliente, las ligninas producen principalmente vainillina, siringaldehído y p-hidroxibenzaldehído en función del origen de las ligninas; (5) Cuando se colocan a ebullición en una solución etanólica de ácido clorhídrico, las ligninas forman monómeros del tipo "cetonas de Hibbert" (mezcla de cetonas aromáticas resultantes de la ruptura de los principales enlaces éter (β -O-4) entre unidades de lignina). En la Figura 1.4 se muestra la estructura de la lignina.

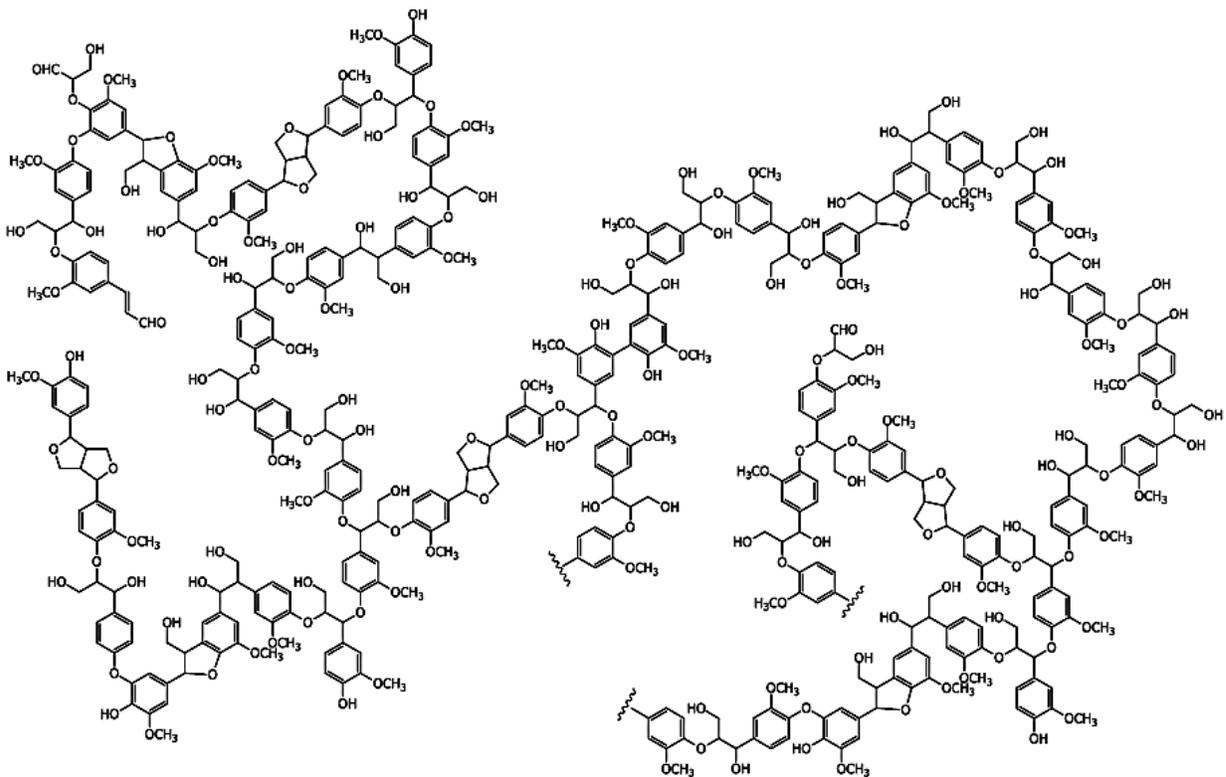


Figura 1.4 Estructura de la lignina (Chávez-Sifontes y Domine, 2013)

La lignina es químicamente difícil de degradar debido a que es un polímero tridimensional interconectados a través de diversos enlaces carbono-carbono que no son hidrolizables en condiciones biológicas (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

1.3 Hidrolisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa implica la acción secuencial de un grupo de enzimas, conocidas como celulasas, que pertenecen a la súper familia de las glicosilhidrolasas, llamadas así porque catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico entre 2 o más hidratos de carbono o entre estos y una fracción que no sean hidrato de carbono.

Los microorganismos que producen celulasas extracelulares son células asociadas para hidrolizar y metabolizar la celulosa insoluble. El análisis bioquímico de los sistemas de celulosa a partir de bacterias y hongos aerobios y anaerobios ha sido revisado exhaustivamente durante las últimas tres décadas. A raíz de los componentes de los sistemas de celulasas se clasifican en función de su modo de acción catalítica (Sadhu y Kanti, 2013).

1.3.1 Celulasas

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa.

El sistema de celulosa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- β -1,4-glucanasa (1,4- β -D-glucan glucanohidrolasa) la exo- β -1,4-glucanasa (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa y la β -1,4-glucosidasa (celobiasa) (β -D-glucósido glucohidrolasa) (Sadhu y Kanti, 2013).

1.3.1.1 Tipos de celulasas

Endoglucanasas o Endo-1, 4-β-D-glucano glucanohidrolasas

Las endoglucanasas cortan al azar en los sitios amorfos internos en la cadena de polisacárido de celulosa, generando oligosacáridos de diversas longitudes y en consecuencia nuevos extremos de cadena. En general, es activo contra celulosa amorfa ácido hinchado, derivados solubles de celulosa tales como CMC.

Exoglucanasa o 1, 4-β-D-glucano celobiohidrolasas

Actúan de una manera posesiva sobre los reductoras o no reductoras extremos de las cadenas de polisacáridos de celulosa, ya sea liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasa) como productos principales. Estas enzimas son activas contra sustrato cristalino tal como Avicel, celulosas amorfos y celooligosacáridos. Sin embargo, son inactivos contra la celobiosa o celulosas solubles tales como CMC.

Exoglucanasas o 1, 4-β-D-oligoglucan celobiohidrolasas (también conocido como Cellodextrinas)

Cataliza la eliminación de celobiosa de celooligosacáridos o de p-nitrofenil -β -D cellobioside pero inactivo contra celulosa amorfa o CMC.

β - Glucosidasas o β-D-glucósido glucohidrolasas

Hidrolizan celobiosa y celodextrinas solubles en glucosa de extremo reductor no. Es inactivo contra cristalina o celulosa amorfa.

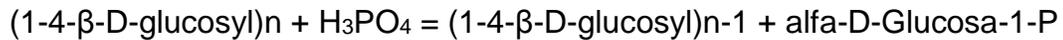
La celobiosa fosforilasa o Celobiosa: ortofosfato Alfa-D-glucosil transferasa

Se cataliza la escisión fosforolítica reversible de celobiosa.



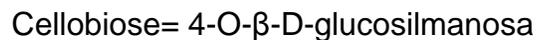
Cellodextrin fosforilasa o 1,4-B-D-glucano Oligo ortofosfato Alfa - D-glucosil transferasa

Se encuentra en las células de *Clostridium thermocellulam*. No actúa sobre celobiosa pero cataliza la escisión phosphorylytic reversible de celodextrinas va desde celotriosa a celohexose.



Celobiosa epimerasa

Se informó por primera vez en células de *Ruminococcus albus* (Sadhu y Kanti, 2013). Cataliza la siguiente reacción:



1.3.1.2 Mecanismos de acción

El mecanismo para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas: Primero la endo β -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración β de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de la exo β -1,4-glucanasa. En la segunda etapa actúa la exo β -1,4-glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa. Ambas enzimas endoglucanasa y exoglucanasa son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005).

Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa. Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la β -1,4-glucosidasa, porque las glucanastas son inhibidas por la celobiosa.

Por otro lado, los sistemas de celulasas no son simplemente una aglomeración de enzimas, ya que todas ellas actúan de manera coordinada y sinérgica para una hidrólisis eficiente. Se han descrito 4 tipos de sinergia: 1) endo-exo sinergia entre endoglucanastas y exoglucanastas; 2) exo-exo sinergia entre exoglucanastas que procesan los extremos reductores y no reductores de la cadena; 3) sinergia entre exoglucanastas y β -glucosidasas que eliminan celobiosa y celodextrinas, y 4) sinergia intramolecular entre los dominios catalíticos y los dominios de unión a la celulosa (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005). La Figura 1.5 se muestra el mecanismo de acción de las celulasas.

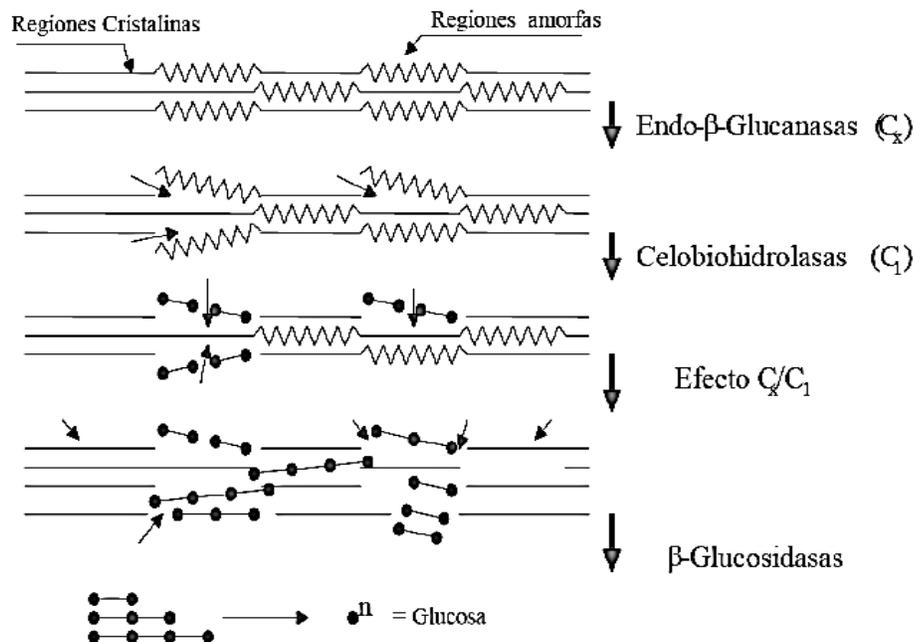


Figura 1.5 Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa (Paredes, 2010)

1.3.2 Xilanasas

El xilano es el principal carbohidrato encontrado en la fracción hemicelulósica de los tejidos vegetales y constituye la tercera parte de todo el carbón orgánico renovable sobre la tierra.

La xilanasas (β -1,4 xilano xilano hidrolasa), componente mayoritario de un complejo sistema enzimático, actúa en la naturaleza de polimerizando las moléculas de xilano unidades de pentosas monoméricas, que son usadas por bacterias y hongos como fuente principal de carbono (Lago y Hernández, 2000).

1.3.2.1 Tipos de xilanasas

Las endoxilanasas o xilanasas (endo- β -1,4-xilanasas) son las enzimas que actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos β (1-4) entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferentes tamaños. También pueden hidrolizar xilooligómeros, siendo más efectiva cuando es mayor el grado de polimerización de éstos. Sin embargo, no hidrolizan xilobiosa, lo que permite distinguirlas claramente de las β -xilosidasas (Lago y Hernández, 2000).

1.3.2.2 Mecanismos de acción

Para la degradación de xilano se requiere de endo- β -1,4-xilanasas que causan un decremento en el grado de polimerización del sustrato, β -xilosidasas que hidrolizan xilooligosacáridos a xilosa y varias enzimas accesorias como la α -L-arabinofuranosidasa, α -glucosidasa, acetilesterasas, ácidos ferulicoesterasa y ácido p-cumarínicoesterasa que son necesarios para la hidrólisis de varios sustituyentes del xilano. La β -xilosidasa hidroliza a los xilooligosacáridos a xilosa. La α -arabinofuranosidasa y la α -glucuronidasa remueven la arabinosa y el 4-O-metil ácido glucorónico, respectivamente, de la cadena principal de xilano. Las estereasas hidrolizan las uniones de éster entre las unidades de xilosa y el ácido acético (acetilxilanoesterasas) o entre residuos de arabinosa de la cadena y ácidos fenólicos

(ácido ferúlico esterasa) y ácido p-cumarínico (ácido p-cumarínico esterasas), que remueven los sustituyentes en la cadena de heteroxilano (Rahman *et al.*, 2003). La Figura 1.6 muestra la estructura del xilano y la interacción enzimática de hemicelulasas.

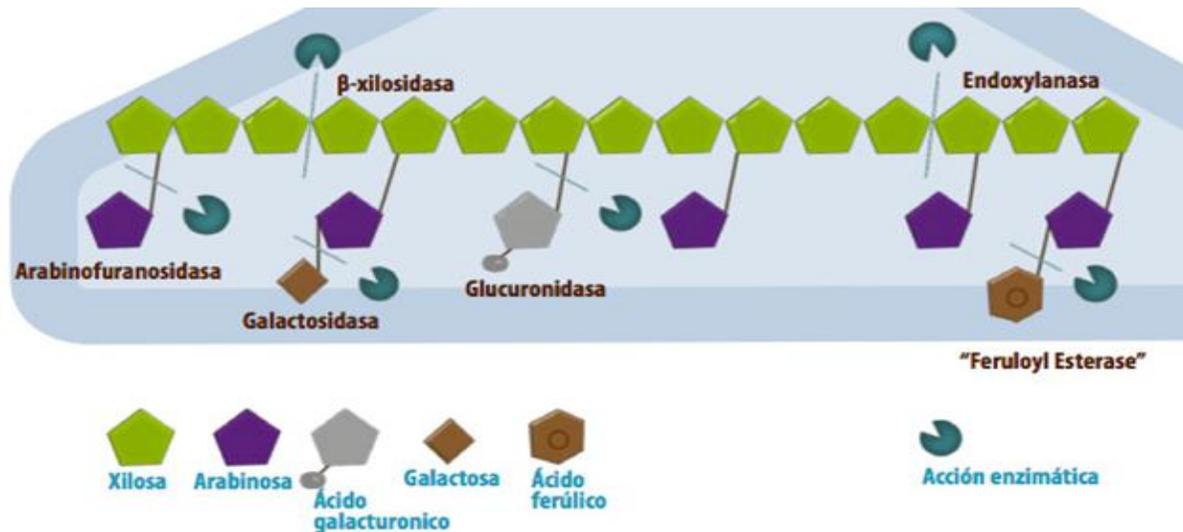


Figura 1.6 Estructura del xilano y su interacción con enzimas hemicelulolíticas (Brink y Vries, 2011)

1.3.3 Métodos de obtención

La fermentación es la técnica de la conversión biológica de sustratos complejos en compuestos simples por diversos microorganismos. Ha sido ampliamente utilizado para la producción de celulosa por sus usos en la industria. Con los años, las técnicas de fermentación han ganado gran importancia debido a sus ventajas económicas y ambientales. Dos técnicas de fermentación han surgido como resultado de este rápido desarrollo: fermentación sumergida (SMF) y fermentación en estado sólido (SSF) (Sadhu y Kanti, 2013).

1.3.3.1 Fermentación sumergida (SMF)

SMF utiliza sustratos líquidos de flujo libre, como la melaza y caldos. Los compuestos bioactivos se secretan en el caldo de fermentación. Los sustratos se

utilizan con bastante rapidez; por lo tanto necesitan ser reemplazados constantemente/suplementado con nutrientes. Esta técnica de fermentación es el más adecuado para los microorganismos tales como las bacterias que requieren un alto contenido de humedad. Una ventaja adicional de esta técnica es que la purificación de los productos es más fácil. SMF se utiliza principalmente en la extracción de metabolitos secundarios que deben ser utilizados en forma líquida. Algunos sustratos comunes utilizados en la fermentación sumergida son azúcares solubles, la melaza, los medios líquidos, jugos de frutas y vegetales, y las aguas residuales / desechos (Subramaniyam y Vimala, 2012).

1.3.3.2 Fermentación en estado sólido (SSF)

SSF utiliza sustratos sólidos, como el salvado, el bagazo, y pasta de papel. La principal ventaja del uso de estos sustratos es que los materiales de desecho ricos en nutrientes pueden ser fácilmente reciclados como sustratos. En esta técnica de fermentación, los sustratos se utilizan muy lentamente y de manera constante, por lo que el mismo sustrato se puede utilizar durante períodos largos de fermentación. Por lo tanto, esta técnica apoya la liberación controlada de nutrientes. SSF es el más adecuado para las técnicas de fermentación que implican los hongos y los microorganismos que requieren menos contenido de humedad. Sin embargo, no se puede utilizar en los procesos de fermentación que implican organismos que requieren alta a_w (Actividad de agua) (Subramaniyam y Vimala, 2012). Este tipo de fermentaciones se emplean no solo para obtención de extractos enzimáticos si no que a su vez se emplea con éxito en la producción de antibióticos, micotoxinas, surfactantes, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos y pesticidas, entre otros.

Los sustratos utilizados en este tipo de fermentación son muy variados, destacándose los cereales tales como trigo, centeno, arroz, maíz y subproductos agroindustriales como lo son los residuos lignocelulósicos provenientes de diversas etapas de los procesos industriales. También se usan desechos de la agroindustria, los cuales son considerados los mejores sustratos para SSF ya que además de

agregarle valor le proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo (Costa *et al.*, 2010).

1.3.3.3 Comparación entre SMF y SSF

La fermentación SSF presenta ventajas teóricas sobre el cultivo de fermentación líquida, la metodología del cultivo en fase sólida muestra además factores que deben manejarse con cautela durante su implementación, ya que se ha reportado en estudios a nivel biorreactor tipo plato, la aireación muestra un efecto muy importante sobre la producción de las enzimas xilanasas (Fernández, 2012). Las celulasas se producen usando el método tradicionalmente fermentación sumergida (SMF), en el que el cultivo de microorganismos se produce en una solución acuosa que contiene nutrientes. Una alternativa a este método tradicional SMF es el método de cultivo de estado sólido (SSF), que implica el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos en ausencia de líquidos libres. La SSF implica relativamente poco de líquido cuando se compara con SmF, el procesamiento aguas abajo de SSF es teóricamente más simple y menos caro (Figura 1.7 y en la Tabla 1.4) (Sadhu y Kanti, 2013).

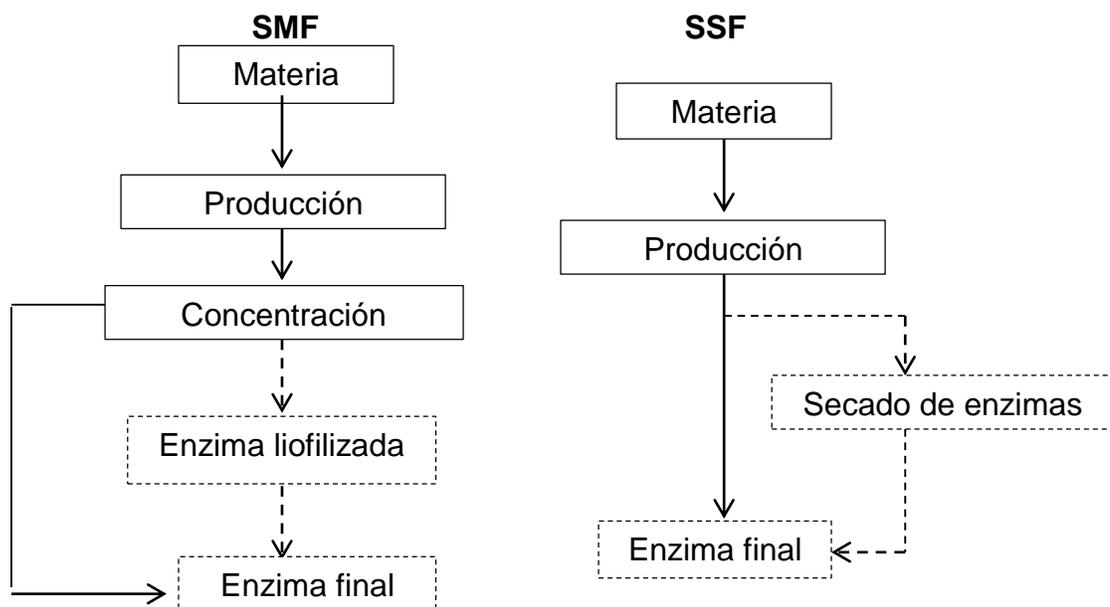


Figura 1.7 Producción de enzimas usando el método tradicional SMF en comparación con el método de SSF (Zhuang *et al.*, 2007).

Tabla 1.4 Comparación entre el sistema de cultivo en fase sólida y el sistema en fase sumergida.

Factor	SMF	SSF
Sustrato	Sólido soluble	Polímero insoluble: Materiales lignocelulósicos, almidón, celulosa, pectina, lignina.
Agua	Consumo de agua	Limitado consumo de agua, baja actividad de agua.
Calefacción metabólica	Fácil control de temperatura	Baja capacidad de transferencia de calor
Control pH	Fácil control de pH	Sustrato sólido amortiguado
Escalado	Equipos industriales disponibles	Requiere de nuevo diseño de ingeniería
Consideraciones de energía	Considerable consumo de energía	Poco consumo energético
Agitación mecánica	Buena homogenización	Preferible condiciones estáticas
Aeración	Limitada solubilidad del oxígeno	Fácil aireación y gran superficie de intercambio de aire.

Fuente: Umsza-Guez *et al.*, 2011

El principal criterio para la selección de un material lignocelulósico para ser utilizado en la fermentación para la obtención de enzimas es su composición química destacando su contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, además de haber realizado la determinación del pretratamiento adecuado de dicho sustrato.

De acuerdo a la relación en la que se encuentra formado parte del tejido vegetal, se podrá hacer una aproximación del rendimiento de la producción de xilanasas al emplear materiales lignocelulósicos destinados al cultivo sólido.

1.3.4 Microorganismos productores de celulasas y xilanasas

Las investigaciones desarrolladas sobre este tema se han dirigido a la solución de distintas problemáticas. Por un lado se encuentra la capacidad natural de acción del microorganismo empleado (velocidad de procesamiento, temperatura óptima de trabajo, tipos de substrato a emplear, entre otros factores), y el análisis de los inconvenientes que genera en la biomasa y en las etapas posteriores del proceso el tipo de pre-tratamiento dado a la biomasa y específicamente a su estructura. Por lo cual han recurrido a diferentes técnicas de mejoramiento de cepas (etanológica, termotolerantes, etc.), y al uso de distintas clases de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos (Riaño *et al.*, 2010).

La bioconversión de la celulosa en azúcares solubles y glucosa es catalizada por un grupo de enzimas llamadas celulasas que son producidas por microorganismos. Estos microorganismos celulolíticos juegan un papel importante en la biosfera mediante el reciclaje de celulosa, el biopolímero más abundante y renovable en la Tierra. La demanda de celulasas microbianas y enzimas relacionadas está creciendo más rápidamente que nunca antes (Xing-Hua *et al.*, 2009).

1.3.4.1 Hongos y levaduras

Utiliza microorganismos como hongos de podredumbre marrón, blanco y suave se para degradar lignina y hemicelulosa en los materiales de desecho. La podredumbre marrón ataca la celulosa, mientras que la podredumbre blanca y suave ataca tanto la celulosa como la lignina. Hongos de pudrición blanca (*basidiomicetos*) son los más eficaces para el pretratamiento biológico de materiales lignocelulósicos.

La Tabla 1.5, muestra con base en información encontrada en Ovando y Waliszewski (2005), una serie de microorganismos a partir de los cuales se obtienen la mayor parte de los preparados enzimáticos comerciales.

Tabla 1.5 Hongos a partir de los cuales se obtienen enzimas celulósicas y hemicelulósicos

Tipo de microorganismo	Característica	Nombre
Hongo	Aeróbicos	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Sporotrichum pulverulentum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> y <i>Trichoderma Konin</i>
	Aeróbicos Termofílicos	<i>Sporotrichum thermophile</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i> y <i>Humicola insolens</i>
	Anaerobios mesofílicos	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Piromonas communis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i>

Fuente: Riaño *et al.*,2010

De los anteriores los más comunes son los preparados celulíticos obtenidos a partir de *Trichoderma sp*, *Aspergillus Niger* y *Bacillus Subtilis*. A partir de los hongos aeróbicos, tales como: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* y *Trichoderma koningii*, se han obtenido los complejos celulolíticos utilizados en la mayoría de los estudios debido a que presentan un sistema enzimático completo de celulasas capaces de degradar parcial o totalmente la celulosa en celobiosa y glucosa (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005). Entre estos microorganismos, el hongo filamentoso *T. reesei* se caracteriza por la efectividad que tiene en la degradación de la celulosa nativa y cristalina con el complejo celulolíticos que produce y secreta, el cual presenta las tres actividades necesarias para la hidrólisis de la celulosa (endo- β -1,4-glucanasa, exo- β -1,4-glucanasa y β -1,4-glucosidasa). Otros microorganismos productores de celulasas incluyen a los hongos aeróbicos

termofílicos (*Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus* y *Humicola insolens*), los hongos anaeróbicos mesofílicos (*Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*), las bacterias aeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Cellulomonas* sp., *Cellvibrio* sp., *Microbispora bispora* y *Thermomonospora* sp.), y las bacterias anaeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Clostridium thermocellum*) (Beguin y Aubert, 1993). Entre estos microorganismos, los termofílicos son de interés por su capacidad para producir enzimas celulolíticas termoestables, las cuales son en general estables bajo condiciones severas, incluso en niveles de pH altamente ácidos o alcalinos así como temperaturas de hasta 90 °C.

Aunque más lentas en la ejecución del proceso de fermentación, las levaduras son los microorganismos de mayor uso en la producción de etanol, debido a su productividad, baja producción de inhibidores y facilidad de separación después de la fermentación. En dichos procesos se emplean levaduras de los generos *Candida (seudotropicalis)*, *Saccharomyces (ellipsoideus, anamensis, carlsbergensis)* y *Kluyveromyces marxianus y fragilis*, que además de altas eficiencias, son capaces de trabajar a temperaturas superiores a los 40°C. Otras son *Candida bytyrii*, *Pichia stipitis*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia membranaefaciens* (Sugden y Bhat, 1994).

1.3.4.2 Bacterias

Se han empleado bacterias de los generos *Clostridium (sporogenes, indolicus, sphnoides, saccharobutyricum, Thermohydrosulfuricum y Thermocellum)*, que degradan grandes cantidades de celulosa y otros polisacaridos. Otras bacterias empleadas son: *Zymomonas mobilis*, *Erwinia amilovora*, *Spirocheta aurantia*, *Streptococcus lactis*, *Spirocheta litorales* y *Spirocheta stenostrepta*, con resultados satisfactorios en cuanto a productividad.

Las bacterias celulolíticas incluyen a: *Pseudomonas* y *Actinomyces*, anaerobios facultativos, tales como *Bacillus* y *Cellulomonas*, y anaerobios estrictos, tales como *Clostridium*. La mayoría de estas bacterias producen principalmente endoglucanasas. Una variedad de especies de *Bacillus* secretan celulasas, incluyendo cepas de *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Bacillus sp.* y *Bacillus alcalifilica*.

Fibrobacter succinogenes es un microorganismo que posee un mecanismo muy eficaz, crece más rápido en la celulosa que la mayoría de otros microorganismos estudiados. Familiares de *F. succinogenes* están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son las principales bacterias celulolíticas se encuentran en secuencias de metagenómica de termitas (Riaño *et al.*, 2010). En la Tabla 1.6 se muestran las bacterias más comúnmente usadas en preparados enzimáticos industriales.

Tabla 1.6. Bacterias a partir de las cuales se obtienen enzimas celulósicas y/o hemicelulósicas

Tipo de microorganismo	Característica	Nombre
Bacteria	Aeróbicas mesofílicas y termofílicas	<i>Cellulomonas sp.</i> , <i>Cellvibrio sp.</i> , <i>Microbispora bispora</i> y <i>Thermomonospora sp.</i>
	Anaeróbicas mesofílicas y termofílicas	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> y <i>Clostridium thermocellum</i>

Fuente: Riaño *et al.*, 2010

Las enzimas celulolíticas producidas por las bacterias del género *Bacillus* presentan básicamente actividad endo- β -1,4-glucanasa y exo- β -1,4-glucanasa; pero tienen una

característica particular, en especial las enzimas producidas por *Bacillus subtilis* y es la resistencia a ser inhibida por la glucosa o celobiosa.

1.4 Antecedentes bibliográficos

En general, las características de los residuos agroindustriales son muy variadas, dependen de la materia prima y del proceso que los generó, no obstante, comparten como característica principal el contenido de materia orgánica, constituida por diferentes porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina. Dentro de la producción de enzimas de aplicación industrial se puede mencionar la gran variedad de residuos agroindustriales que pueden ser aprovechados para este fin.

Fanchini *et al.*, (2010), a partir de mazorca y olotes, cáscara de avena y bagazo de caña por fermentación sumergida con cepa de *Penicillium janthinellum*, obtuvieron enzimas xilanolíticas entre ellas xilanasas extracelular, beta-xilosidasa y alfa-L-arabinofuranosidasa para ser utilizadas como aditivos para alimentos. Realizando una optimización de los estudios de concentración de la fuente de carbono, la temperatura y pH incultivo. La producción de estas enzimas se duplicó cuando los cultivos se suplementaron con grano agotado de cerveza a una concentración de 2%, pH 6,0 y 25 °C. En estas condiciones optimizadas obtuvieron una actividad de xilanasas de 15.19 UI/mL y 23.54 UI/mg, la actividad de beta-xilosidasa de 0.16 UI/mL y 0.25 UI/mg y la actividad de alfa-L-arabinofuranosidasa de 0.67 UI/mL y 1.04 UI/mg.

Izarra *et al.*, (2010), para la degradación de biomasa para la producción de biocombustibles y otras aplicaciones utilizaron *Aspergillus niger*, una enzima microbiana de gran utilización dentro de la industria, debido a sus niveles altos de secreción de proteína y a su condición GRAS (generally regarded as safe). La obtención de las enzimas fueron inoculados en matraces de 250 mL con 40 mL de medio con 3% (v/v) de una suspensión de 10⁴ o 10⁸ esporas por mililitro e incubados a 28 °C y 175 rpm durante 120 h. Encontraron que no hubo un efecto notorio en la

morfología de crecimiento, salvo en el color y el diámetro de pellets obtenidos, sí se afectó la μ_{max} (0.06 y 0.03 h⁻¹ para 104 y 108 esporas/mL, respectivamente) y la concentración máxima de biomasa. Además, mientras que las productividades volumétricas de celulasa (8.2 y 8. UI/Lh para 104 y 108 esporas/mL, respectivamente) fueron similares para ambos inóculos, la productividad de xilanasas fue mayor para el inóculo más concentrado. Los resultados indican que la productividad de celulasas y xilanasas está estrechamente relacionada con la concentración de inóculo.

Medina *et al.*, (2010), a partir de hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edode*, obtuvieron enzimas celulasas por fermentación sólida sobre los residuos de banano pseudotallo, hojas y raquis, con un periodo de incubación de 24 días. La máxima actividad enzimática de celulasas fue producida por *Lentinula edode* en pseudotallo con valores de 8.14 UI/g de residuo seco, estableciendo que la temperatura y pH óptimos de la enzima es a 50°C y 5.3 respectivamente.

Manjarrés *et al.*, (2011), estudiaron la actividad enzimática celulítica mediante el cultivo individual y cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. en fase sólida utilizando los residuos de palma como sustrato, pretratados biológicamente con *Pleurotus ostreatus* durante 20 días para deslignificarlos y favorecer así la producción de celulasas. Los parámetros fueron actividad celulasa total, endoglucanasa y β -glucosidasa durante 16 días de cultivo a una temperatura de 30 °C. Encontrando que con *Trichoderma* sp. obtuvieron una actividad enzimática de 0.112 UI/mL de celulasa total.

Cruz *et al.*, (2009), a partir de composta de residuos agrícolas aisló hongos, bacterias y Actinomicetos con capacidades celulolíticas y xilanolíticas, realizó la extracción enzimática a partir de fermentación sumergida en medios de trazas de Mandels y Weber a 28°C por 4 días para hongos y 48 h para bacterias. Obtuvo la mejor actividad xilanasas de 11.2 UI/mL con bacterias, y una actividad celulolíticas de 2.10 UI/mL con hongos.

Ferrer-Marcelo *et al.*, (2011), usando como sustrato bagazo de caña aisló diferentes cepas de hongos, analizando su actividad celulolíticas a partir de dos métodos de obtención, fermentación sumergida y fermentación en estado sólido. La primera la realizó por medio de fermentaciones en medio de trazas de Mandels y Weber suplementándolo con Urea y sales de amonio, inoculando 1×10^7 esporas/mL , en un tiempo de 72h, 30°C y 250 rpm. La segunda la realizó usando Bagazo hidrolizado, a HR del 70%, por 72h y 30°C. Obteniendo una actividad celulasa de 0.3 UPF/mL.

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 2.1 se muestra el diagrama de proceso que muestra las etapas realizadas para la determinación de actividad enzimática y parámetros cinéticos de microorganismos aislados a partir de residuos lignocelulósicos.

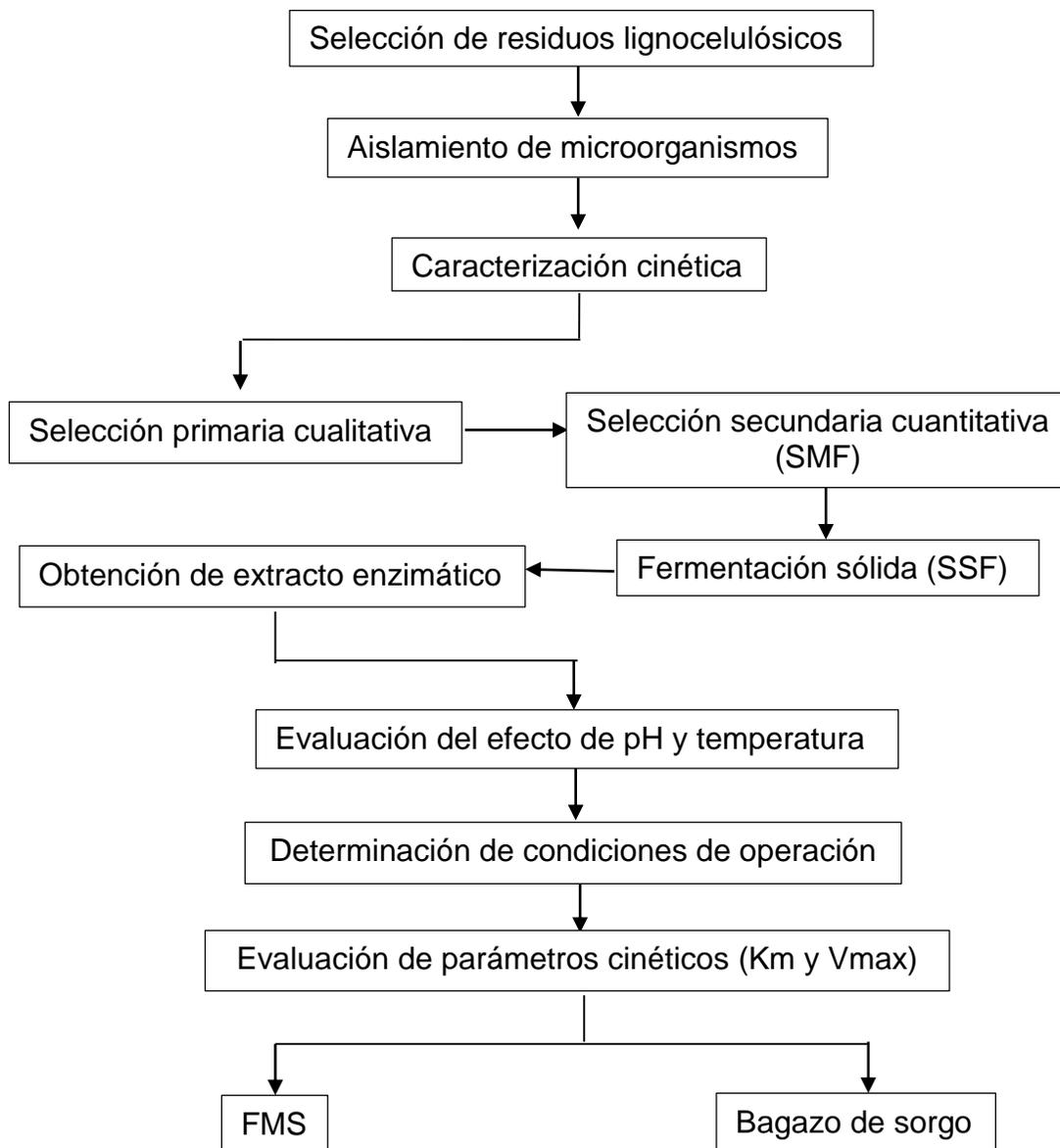


Figura 2.1 Proceso para determinación de actividad enzimática y parámetros cinéticos de microorganismos aislados de residuos lignocelulósicos

2.1 Recolección y toma de muestras

Se llevó a cabo una selección de los diferentes tipos de residuos lignocelulósicos a tratar según sus características organolépticas y que presentarán deterioro microbiológico, esto para facilitar la proliferación de diferentes tipos de microorganismos. Los residuos lignocelulósicos de bagazo de caña se recolectaron en el Ingenio San Miguelito en Córdoba Veracruz, los residuos de sorgo dulce se tomaron de muestras del campo experimental Cotaxtla, Veracruz zona golfo centro del INIFAP, las muestras de madera se recolectaron de árboles que presentarán deterioro microbiológico y presencia de hongos en su corteza, estas muestras fueron tomadas en Orizaba, Córdoba y Atzompa Veracruz; los residuos de coco fueron tomados en el Instituto Tecnológico de Veracruz. Las muestras fueron codificadas con respecto a la materia prima de origen: madera (MH), bagazo de sorgo (S), bagazo de caña (BC) y residuos de coco (C).

2.2 Aislamiento

Cada muestra de bagazo de caña, sorgo y madera se sembraron en agua peptonada 0.1% estéril ajustando el pH a 7 con hidróxido de sodio 0.1 N. Las muestras se sembraron por duplicado a la primera serie se le agregó Itraconazol y a la segunda se adicionó cloranfenicol en una concentración de 0.4 g/L. Se incubó a 30°C a 150 rpm por 48 h en una incubadora marca New Brunswick Scientific Co, modelo Classic C24KC (Figura 2.2).



Figura 2.2 Sembrado de muestras en agua peptonada para incubación.

Posteriormente se prepararon diluciones en agua estéril 10^{-1} hasta 10^{-6} . Se prepararon cajas de medios ricos en celulosa y hemicelulosa por duplicado a la primera serie se adiciono Itraconazol y a la segunda se adiciono cloranfenicol en una concentración de 0.4 g/L. De las últimas dos diluciones se sembraron 100 μ L por extensión en placa con espátula de Drigalsky en cajas con medio de celulosa y hemicelulosa (Tabla 2.1). Para la detección de cepas fúngicas se incubo a 30°C durante 72 h, para la detección de bacterias se incubo a la misma temperatura por 48 h. Posterior a esto se prosiguió a determinar si existían en cada medio diferentes tipos de colonias formadas y realizar el aislamiento por la técnica de siembra por agotamiento para obtener cepas puras para el caso de las bacterias y levaduras, para los hongos se realizó siembra por impronta, estas técnicas se realizaron hasta obtener cepas puras.

Tabla 2.1 Composición de medios para aislamiento

Medios ricos en:			
Componentes	Cantidad (g/L)	Componentes	Cantidad (g/L)
Celulosa	20	Hemicelulosa	20
Peptona de caseína	10	Peptona de caseína	10
Extracto de Levadura	5	Extracto de Levadura	5
NaCl	5	NaCl	5
Agar	20	Agar	20

2.3 Propagación y mantenimiento de microorganismos

Se prepararon tubos de 20 mL inclinados con medio YPD para hongos y Agar nutritivo para bacterias (Tabla 2.2). Los hongos se sembraron por arrastre con solución de Tween 80 al 0.1% sembrando 100 μ L de cada muestra.

Tabla 2.2 Composición de medios para mantenimiento.

YPD		Agar nutritivo	
Componentes	g/L	Componentes	g/L
Extracto de levadura	10	Extracto de carne	3
Peptona de caseína	20	Peptona de caseína	5
Dextrosa	20	Agar	25
Agar	25		

Los hongos se sembraron por arrastre con solución de Tween 80 al 0.1% sembrando 100µL de cada muestra. Para el caso de las bacterias se sembraron por estriado con ayuda de asa de platino. Se incubaron a 30°C por 72 h para el caso de los hongos y 48 h para las bacterias.

2.4 Caracterización cinética de actividad enzimática

Se realizaron los métodos de selección primaria y secundaria que se describen en las siguientes secciones.

2.4.1 Selección primaria. Determinación cualitativa de actividad enzimática (Celulasa y xilanas)

Se tomaron muestras de microorganismos de las 86 cepas aisladas, colocándolas en medios con carboximetilcelulosa (CMC) y xilano (XIL) (Tabla 2.3) para la determinación cualitativa celulasa y xilanas respectivamente.

Una vez solidificadas las placas con medios, las placas fueron divididas en cuatro secciones, en cada una de las cuales se realizó un orificio de 6 mm de diámetro con un orador previamente esterilizado.

En el caso de los hongos se preparó una solución de Tween 80 al 0.1%, se agregaron 2 mL en los tubos inclinados para lograr una solución de esporas, las

bacterias y levaduras se suspendieron en 1 mL de agua estéril. Se colocaron 50 μ L de cada uno de los microorganismos y se incubaron a 30°C por 48 h.

Tabla 2.3 Medios prueba cualitativa de actividad celulosa y xilanas (Gaitan y Pérez, 2007)

CMC		XIL	
Componentes	Cantidad (g/L)	Componentes	Cantidad (g/L)
CMC	10	Xilana	10
Extracto de levadura	2.5	Extracto de levadura	2.5
Peptona	2.5	Peptona	2.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
CaCl ₂	0.5	CaCl ₂	0.5
KH ₂ PO ₄	0.1	KH ₂ PO ₄	0.1
K ₂ HPO ₄	0.1	K ₂ HPO ₄	0.1
Agar	15	Agar	15

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó una tinción adicionando 5 mL de rojo congo al 1% (p/v) a cada una de las placas, dejando actuar por 15 min, posteriormente se retiró el exceso de colorante y se lavó con 5 mL de solución 2 M de NaCl durante 15 m. Después de eliminar el exceso de la solución salina se determinó la actividad celulolítica por la presencia de halos debidos a la hidrólisis de celulosa y xilano, la cual fue medida en cm con ayuda de una regla (Figura 2.3).



Figura 2.3 Prueba cualitativa de actividad celulasa y xilanas.

Una vez obtenidos los resultados se prosiguió a determinar el diámetro del halo de crecimiento realizando un promedio de los cuatro halos y determinando a partir de que valores se tomarían para realizar la segunda etapa. En el caso de los hongos a partir de 0.3 cm, para levaduras y bacterias a partir de 0.1 cm de diámetro promedio.

2.4.2 Selección secundaria. Determinación cuantitativa de actividad enzimática (Celulasa y xilanas)

Las cepas de microorganismos que pasaron la etapa cualitativa, representan una alternativa para la obtención de extractos enzimáticos con actividad celulasa y xilanas, para ello se realizó una segunda etapa de selección en la cual se caracterizó la capacidad de hidrolisis enzimática de los diferentes microorganismos con la detección de producción de azúcares reductores con la técnica de Miller (1959).

2.4.2.1 Activación de cepas

Se realizó la activación de las cepas de bacterias y levaduras, para el caso de las bacterias se realizó la activación en medio nutritivo y para las levaduras en YPD (Tabla 2.4).

Tabla 2.4 Composición de medios para activación

YPD		Agar nutritivo	
Componentes	Cantidad (g/L)	Componentes	Cantidad (g/L)
Extracto de levadura	10	Extracto de carne	3
Peptona de caseína	20	Peptona de caseína	5
Dextrosa	20		

De las cepas crecidas en tubo inclinado con sus respectivos medios de mantenimiento se tomaron tres asadas de las cepas de bacterias y levaduras, inoculando en los medios de activación para bacterias y levaduras. Se incubaron por 12 horas a 30°C y 200 rpm. Para el caso de los hongos se preparó una solución de

Tween 80 al 0.1% estéril para el arrastre de las esporas, colocando 10 mL a cada tubo que contenía las respectivas cepas.

2.4.2.2 Preparación del inóculo

Se realizó la preparación del medio de fermentación en solución de trazas de Mandels y Weber (1969) como se muestra en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5 Medio de trazas de Mandels y Weber (1969).

Compuesto	Cantidad (g/L)
KH_2PO_4	2.0
$\text{MgSO}_4\text{H}_2\text{O}$	0.3
$\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$	0.3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4
$\text{FeSO}_4\text{H}_2\text{O}$	5.0
$\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$	1.6
$\text{ZnSO}_4\text{H}_2\text{O}$	1.4
$\text{CuSO}_4\text{H}_2\text{O}$	1.0
Peptona	0.5
Carbohidrato	10

El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 atm. de presión durante 15 min. Para la determinación de actividad celulasa y xilanasa se utilizaron Carboximetil celulosa y xilano de beechwood (Costa *et al.*, 2010), respectivamente. Suplementándolo con urea a una concentración de 1.5 g/L (Ferrer-Marcelo *et al.*, 2011).

2.4.2.3 Inoculación

Después de que transcurrieron las 12 h de activación de las cepas de bacterias y levaduras, y de realizar el arrastre de esporas con Tween 80 al 0.1% para los

hongos, se prosiguió a contar el número de cel/mL y esp/mL . Realizando por conteo directo al microscopio óptico con ayuda de una cámara de Thomas inoculando 6×10^6 cel/mL y 6×10^6 esp/mL. Posteriormente se llevó a cabo una cinética de 120 h para cada una de las cepas, realizando mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Spectronic GENESYS 20 a 620 nm, y realizando determinaciones de azúcares reductores a cada muestra.

2.5 Fermentación sumergida

Se realizó una cinética de fermentación incubando por 120 h, 30°C y 250 rpm, tomando mediciones de las muestras en los tiempos 0, 24, 48 y 72 h para hongos y levaduras y mediciones en los tiempo 0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h para el caso de las bacterias. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min se congelaron para su posterior análisis. La prueba de azúcares reductores se realizó por el método de Miller (1959), realizando una curva de calibración con glucosa.

2.5.1 Determinación de Azúcares Reductores

Para la determinación de la formación de azúcares reductores (glucosa y xilosa respectivamente), se usó el reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, color amarillo) que al reaccionar con dichos azúcares se reducía a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de color rojo, las mediciones se realizaron determinando la absorbancia a 540 nm (Costa *et al.*, 2010).

El reactivo DNS se preparó disolviendo 1 g de 3-5 DNS y 30 g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 16 mL de solución de NaOH al 10% (p/p) posteriormente se adiciono 50 mL de agua destilada, se llevó a Baño María para disolver, se aforó a 100 mL en un matraz volumétrico. Se realizó una curva de calibración empleando Glucosa (para determinación de actividad celulolítica) y Xilosa (para determinación de actividad xilanolítica), para obtener la ecuación de la recta para cálculos posteriores.

2.5.1.1 Curva patrón de glucosa

Para la determinación de azúcares reductores por el método de Miller (1969), se empleó el reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, color amarillo) que al reaccionar con los azúcares se reduce a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de color rojo, las absorbancias fueron medidas a 540 nm. Se realizó la curva patrón de glucosa usando diferentes concentraciones de glucosa en mg/mL, la curva muestra la ecuación de la recta que posee el mejor ajuste para la determinación de mg de glucosa/mL (Figura 2.4).

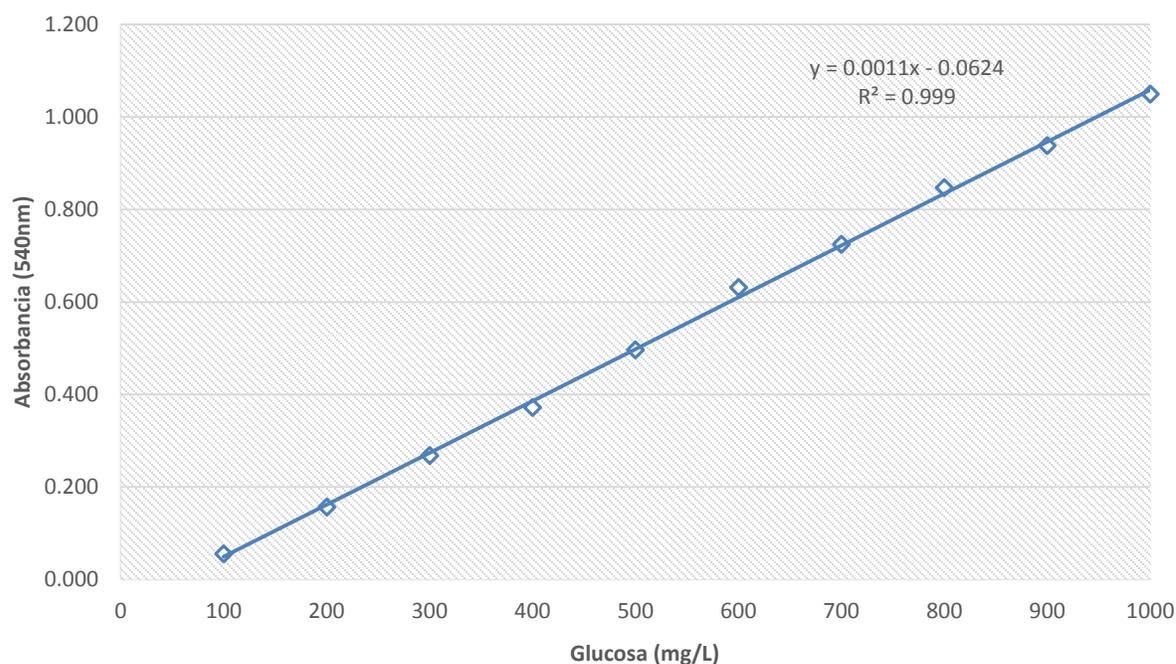


Figura 2.4 Curva patrón de glucosa

Se obtuvo un ajuste de R^2 del 0.999 garantizando la idoneidad del modelo.

La ecuación obtenida se empleó para la determinación de azúcares reductores en este caso glucosa en mg/mL, para las muestras obtenidas de las fermentaciones.

2.5.1.2 Curva patrón de xilosa

La curva patrón se realizó utilizando xilosa a diferentes concentraciones de mg/mL, con lo cual se obtuvo la ecuación de la recta mostrada en la Figura 2.5.

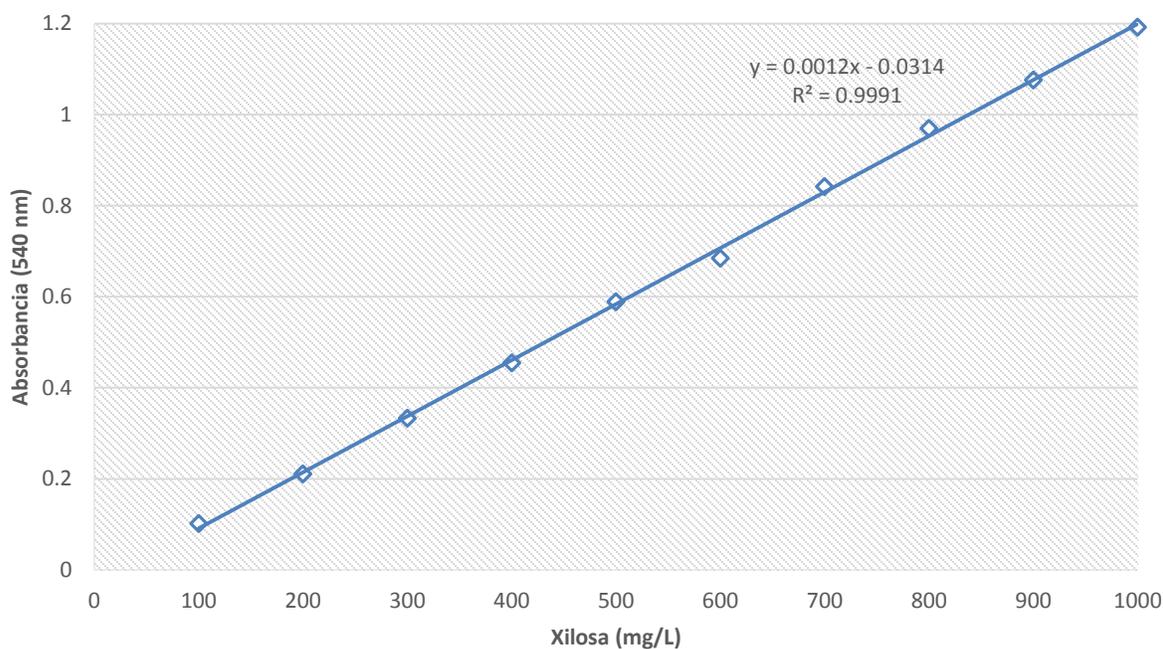


Figura 2.5 Curva patrón de xilosa

Se obtuvo un ajuste de R^2 del 0.9991 garantizando la idoneidad del modelo.

La ecuación obtenida se empleó para la determinación de azúcares reductores en este caso xilosa en mg/mL, para las muestras obtenidas de las fermentaciones.

2.6 Pretratamiento de bagazo de sorgo

Se utilizó como materia prima para la fermentación sólida bagazo de sorgo tomado del campo experimental Cotaxtla, Veracruz zona Golfo centro del INIFAP. Se realizaron dos diferentes pretratamientos:

2.6.1 Tratamiento ácido-alkalino

Se tomó 1 Kg de bagazo de sorgo y se colocó en un bidón de acero inoxidable, se agregó ácido sulfúrico al 1.5 % (v/v) en una relación sólido-líquido (1:5), a 125 °C, 15 psi durante 35 min, posterior a esta etapa se pesó, con ayuda de una prensa hidráulica se quitó el exceso de ácido, posteriormente se colocó en una marmita de acero inoxidable adicionándole peróxido de sodio al 4% (v/v), en relación sólido-líquido (1:16) y ajustando pH a 11.5 con sosa caústica 10 M, a 25 °C por 45h, posteriormente se secó al sol y etiquetó para su posterior uso.

2.6.2 Tratamiento alcalino

Se tomó 1 Kg de bagazo de sorgo y se colocó en una marmita metálica de acero inoxidable, agregando peróxido de sodio al 4% (v/v), en relación sólido-líquido (1:16) y ajustando pH a 11.5 con sosa caustica 10 M, a 25 °C por 45h, posteriormente se secó al sol, se pesó y etiquetó para su posterior uso.

2.7 Fermentación en estado sólido en bagazo pretratado

Se realizó una fermentación de tipo destructiva, para cada tipo de fermentación se utilizó un diferente tipo de bagazo pretratado, dependiendo del tipo de actividad enzimática buscada.

2.7.1 Fermentación sólida de hongos con actividad celulasa

Se tomaron 5 g de bagazo pretratado por hidrólisis ácido-alkalina colocándose en 5 matraces de 50 mL por duplicado, en una relación sólido-líquido (1:2). El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.1 atmósfera de presión durante 20 min. Se inoculó 6×10^6 esp/mL. Incubándose durante 120 h a 30 °C, se realizó una cinética de fermentación tomando mediciones a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h. Al realizar la toma de muestra con ayuda de una prensa hidráulica se obtuvo el líquido de cada matraz

para determinación de azúcares reductores por el método de DNS, se centrifugan por 10 min a 10,000 rpm en una centrifuga marca Eppendorf centrifuge 5424, y congelándose para su posterior análisis por DNS.

2.7.2 Fermentación sólida de hongos con actividad xilanasa

Se tomaron 5 g de bagazo pretratado por hidrólisis alcalina colocándose en 5 matraces de 50 mL por duplicado, en una relación sólido-líquido (1:2) usando medio básico de trazas de Mandels y Weber (1969). El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.1 atmósfera de presión durante 20 min. Se inoculo 6×10^6 esp/mL. Incubándose durante 120 h a 30 °C, se realizó una cinética de fermentación tomando mediciones a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h. Al realizar la toma de muestra con ayuda de una prensa hidráulica se obtuvo el líquido de cada matraz para determinación de azúcares reductores por el método de DNS, se centrifugaran por 10 min a 10,000 rpm en una centrifuga marca Eppendorf centrifuge 5424, y congelándose para su posterior análisis por DNS.

2.8 Obtención de extractos enzimáticos

En base a los resultados obtenidos de la fermentación sólida se realizó la fermentación sólida de 200 g de bagazo, deteniéndose en el tiempo que se obtuvo la mayor concentración de azúcares reductores.

2.8.1 Determinación de actividad enzimática específica

La actividad enzimática se determinó conforme a dos criterios diferentes:

2.8.1.1 Actividad celulasa

La actividad celulasa total se determinó como actividad sobre papel filtro (FPA) usando 500 µL de extracto enzimático suspendido en 1 mL de buffer citratos se

adicionaron 50 mg de papel filtro y se incubaron durante 1 h a 50°C. Posteriormente se determinaron los azúcares reductores mediante el método de Miller (1959), determinando absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Thermo Spectronic GENESYS 20. Los resultados se expresan en UI/mL. Una Unidad Internacional de enzimas se define como la cantidad de enzima que libera 1µmol de glucosa por minuto.

2.8.1.2 Actividad xilanasa

La actividad xilanasa se determinó usando xilano al 1 % (p/v) preparado en buffer fosfato 0.1 M, pH 7. Se tomó 1 mL de la solución de xilano al 1% y se adicionando 1 mL de extracto crudo, incubándose 30 min a 50 °C, para detener la reacción se colocaron en agua fría por 5 min. Posteriormente se determinaron los azúcares reductores mediante el método de Miller (1959), obteniendo las absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Thermo Spectronic GENESYS 20. Los resultados se expresaron en UI/mL. Una Unidad Internacional de enzimas se define como la cantidad de enzima que libera 1µmol de xilosa por minuto.

2.8.2 Determinación de proteína extracelular por el Método de Bradford

Se realizó una curva de calibración empleando una proteína de referencia (Albúmina bovina), para obtener la ecuación de la recta para cálculos posteriores. A cada mililitro de muestra se le adicionó 1mL de reactivo Bradford, mezclando por 30 s en Vortex, dejando incubar a 25 °C por 5 min, procediendo a realizar la lectura a 595 nm en un espectrofotómetro Thermo Spectronic GENESYS 20. Para los cálculos se utilizó la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración y se expresó en microgramos de proteína extracelular por mililitro.

2.8.2.1 Curva patrón de proteína

Para poder determinar las concentraciones de proteína extracelular de las muestras se realizó una curva patrón con (BSA) que se muestra en la Figura 2.6.

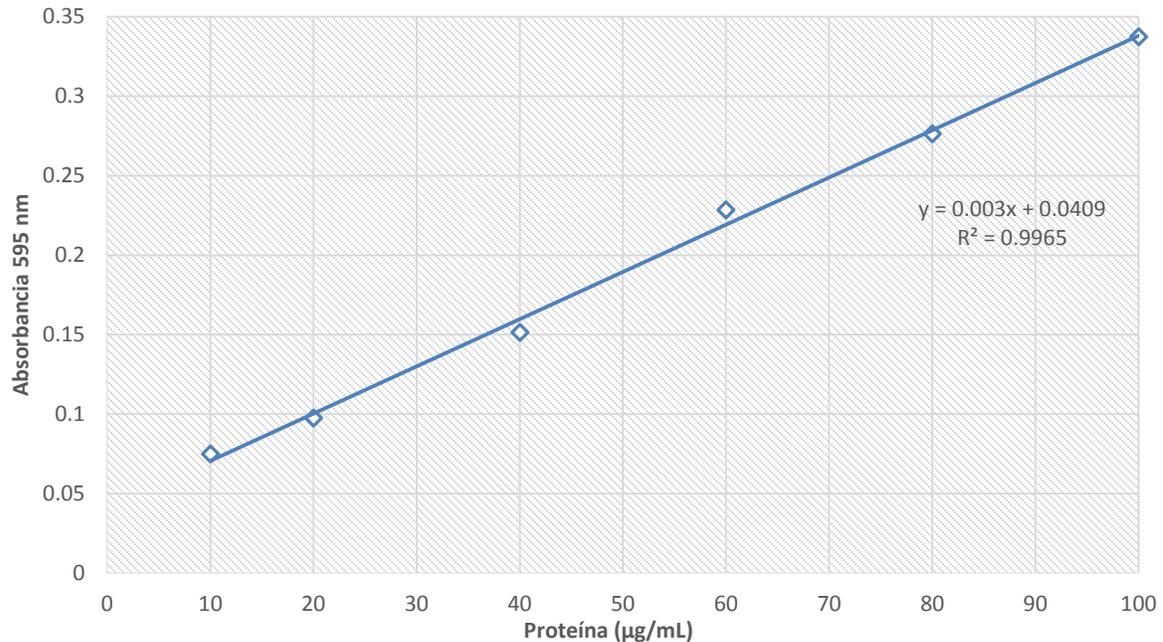


Figura 2.6 Curva patrón de proteína

Se obtuvo un ajuste de R^2 del 0.9965 garantizando la idoneidad del modelo.

La ecuación obtenida se empleó para la determinación de proteína extracelular para las muestras obtenidas de las fermentaciones.

2.9 Evaluación del efecto de pH y temperatura

Para la determinación de los valores óptimos de pH y Temperatura se tomaron los mejores extractos crudos obtenidos de la fermentación sólida, variando el pH entre 4 y 7, y manteniendo fija la temperatura, una vez obtenido el pH óptimo se procedió a variar la temperatura manteniendo el pH fijo con el valor óptimo encontrado.

2.10 Determinación de las condiciones de operación

Para la determinación de las condiciones de operación se desarrolló un diseño de experimentos 2^2 , considerando los factores con sus niveles mostrado en la Tabla 2.6, cada medio se realizó a una concentración de medio (CMC o Xilano) de 10g/L.

Tabla 2.6 Matriz del diseño de experimentos 2^2

Experimento	Concentración de extracto (mL)	Velocidad de agitación (rpm)
1	1	200
2	2	200
3	1	300
4	2	300

El análisis de resultados se desarrolló con el programa NCSS 2007.

2.11 Determinación de parámetros cinéticos

La actividad de los extractos enzimáticos de las cepas preseleccionadas se determinará midiendo la velocidad inicial de reacción (curva de producto formado ó sustrato transformado en función al tiempo) en el tiempo cero con respecto a la concentración de sustrato. Usando la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 2.1) y la linealización de Lineweaver-Burk (Ec. 2.2) para cálculo de V_{\max} de forma gráfica.

$$V_R = \frac{V_{\max} C_A}{k_m + C_A} \quad (2.1)$$

$$\frac{1}{v_R} = \frac{k_m + C_A}{V_{\max} C_A} = \frac{k_m}{V_{\max}} C_A + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.2)$$

Donde K_m es la constante de Michelis-Menten, V_{max} es la velocidad máxima (g/Lh), v_0 es la velocidad inicial (g/Lh) y C_A es la concentración del sustrato (g/L).

2.11.1 Determinación de K_m y V_{max} en SMF

Se realizaron cinéticas a diferentes concentraciones de sustrato (2, 5, 10, 15, 20 y 30 g/L) CMC o xilano, realizando toma de muestra a los tiempo 0, 12, 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120 h, a las muestras se les determinó la concentración de azúcares reductores con el método de Miller (1969). Se calcularon las velocidades de reacción con ayuda del software Matlab 2013a.

2.11.2 Determinación de K_m y V_{max} en bagazo de sorgo

Para determinar los parámetros cinéticos de los extractos crudos con actividad celulasa se empleó bagazo de sorgo con tratamiento ácido-alcalino y para la actividad xilanasa se utilizó bagazo de sorgo con tratamiento alcalino. Las cinéticas se realizaron a diferentes concentraciones de sustrato (2, 5, 10, 20, 30 y 66.6 g/L) realizando toma de muestra a los tiempo 0, 12, 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120 h, a las muestras se les determinó la concentración de azúcares reductores con el método de Miller (1969). Se calcularon las velocidades de reacción con ayuda del software Matlab 2013a.

2.11.3 Determinación de K_{cat}

Con base a los parámetros cinéticos obtenidos para cada tipo de enzima, considerando la ecuación 2.3. Se calculó el parámetro cinético K_{cat} que expresa el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por molécula de enzima y unidad de tiempo, en condiciones de saturación del sustrato.



Se tiene que

$$V_{\max} = K_T [E_T] \quad (2.4)$$

Sí $K_{cat} = K_T$ entonces

$$V_{\max} = K_{cat} [E_T] \quad (2.5)$$

Donde $[E_T]$ es la concentración total de enzima (μmol), V_{\max} es la velocidad máxima ($\mu\text{mol/L}$) y K_{cat} es la constante catalítica o número de recambio de la enzima (min^{-1}).

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento de microorganismos

A partir de la incubación en agua peptonada de las muestras de madera, bagazo de caña, sorgo y coco se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} , de las cuales se sembraron por espátula de Drigalsky en cajas con medio de carboximetilcelulosa y xilano. Después de transcurridas 48 h de incubación se apreció el crecimiento de diversas colonias (Figura 3.1) de las cuales se prosiguió a realizar dos técnicas de aislamiento, 1) siembra por agotamiento para bacterias y levaduras y 2) siembra por impronta para el caso de los hongos (Figura 3.2).

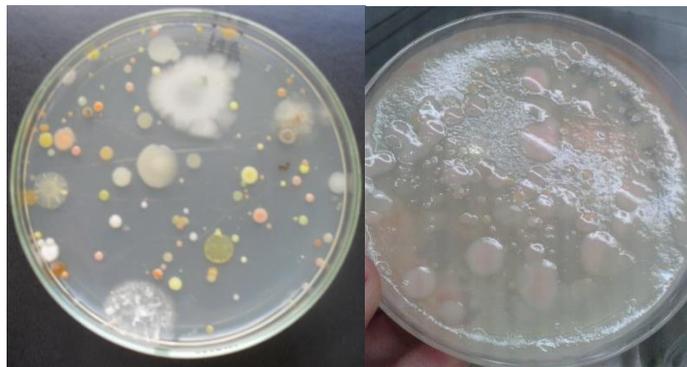


Figura 3.1. Siembra por extensión con espátula de Drigalsky en medio CMC y Xilano

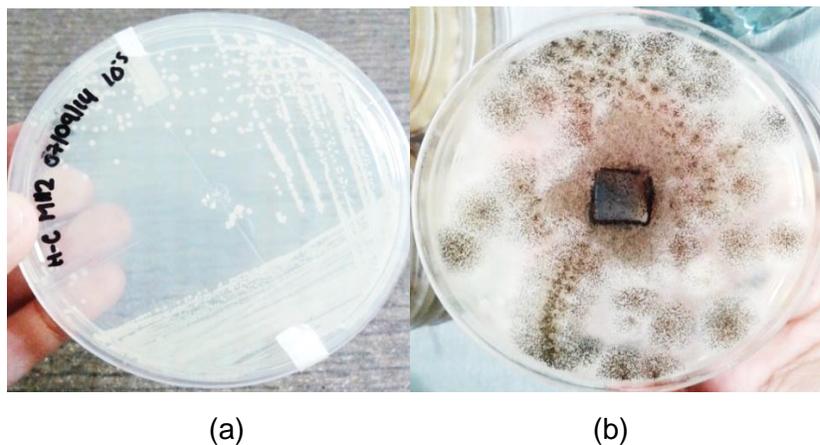


Figura 3.2 Siembra: (a) por agotamiento; (b) siembra por impronta

3.2 Propagación y mantenimiento de los microorganismos

Las técnicas anteriores se repitieron hasta obtener cepas puras (Figura 3.3), posteriormente se sembraron en tubo inclinado para su mejor manipulación y evitar posible contaminación (Figura 3.4).

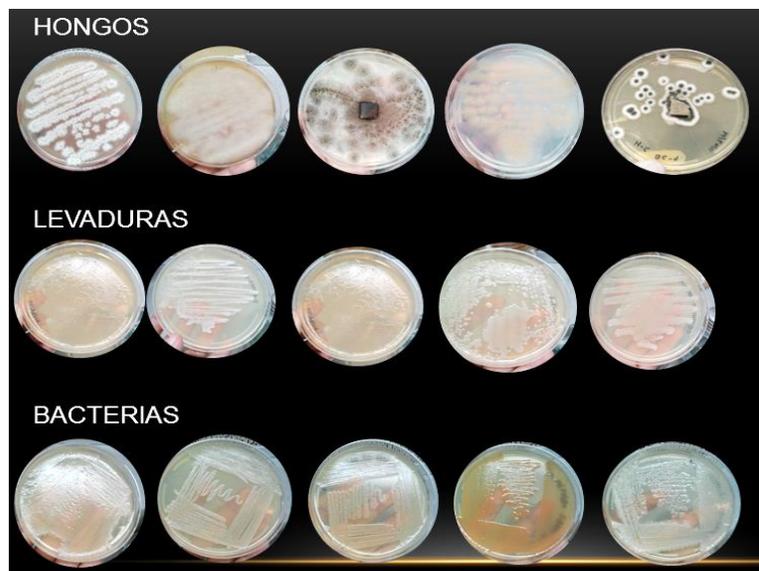


Figura 3.3 Grupo representativo del total de microorganismos aislados

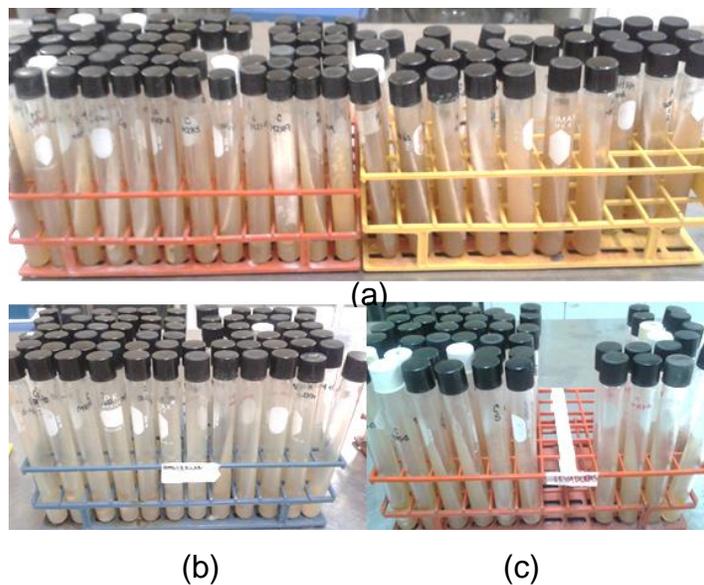


Figura 3.4 Siembra en tubo inclinado de: (a) hongos, (b) bacterias, (c) levaduras

Se aislaron un total de 96 cepas puras de microorganismos capaces de crecer en medio de CMC y XIL (Tabla 3.1). Con un total de 49 en medio de CMC y 47 en medio XIL.

Tabla 3.1 Total de microorganismos aislados en medios selectivos de CMC y XIL

MUESTRA	MICROORGANISMO	CELULOSA	XILANO
Bagazo de sorgo	Hongo	3	3
	Levadura	4	0
	Bacteria	0	1
Bagazo de caña	Hongo	1	3
	Levadura	2	1
	Bacteria	1	0
Residuos de madera	Hongo	10	20
	Levadura	11	6
	Bacteria	14	11
Residuos de coco	Hongo	3	2
	Levadura	0	0
	Bacteria	0	0

3.3 Caracterización cinética de actividad enzimática

Se realizó conforme a dos rubros que se presentan a continuación.

3.3.1 Selección primaria: Actividad cualitativa de actividad enzimática

La determinación se realizó preparando medio sólidos de CMC y XIL conforme a lo reportado por Gaitan y Pérez (2007), y con la composición que se muestra en la Tabla 2.3. Pasadas las 48 h de incubación se prosiguió a realizar la tinción con solución de Rojo Congo al 10 %, y retirando el exceso de colorante con una solución 2 M de NaCl. Se llevó acabo la medición del diámetro de los cuatros halos formados en cada orificio de la caja, las mediciones se realizaron con ayuda de una regla, se obtuvo un promedio de los 4 orificios y se determinó su promedio (cm) (Figuras 3.5 y 3.6).

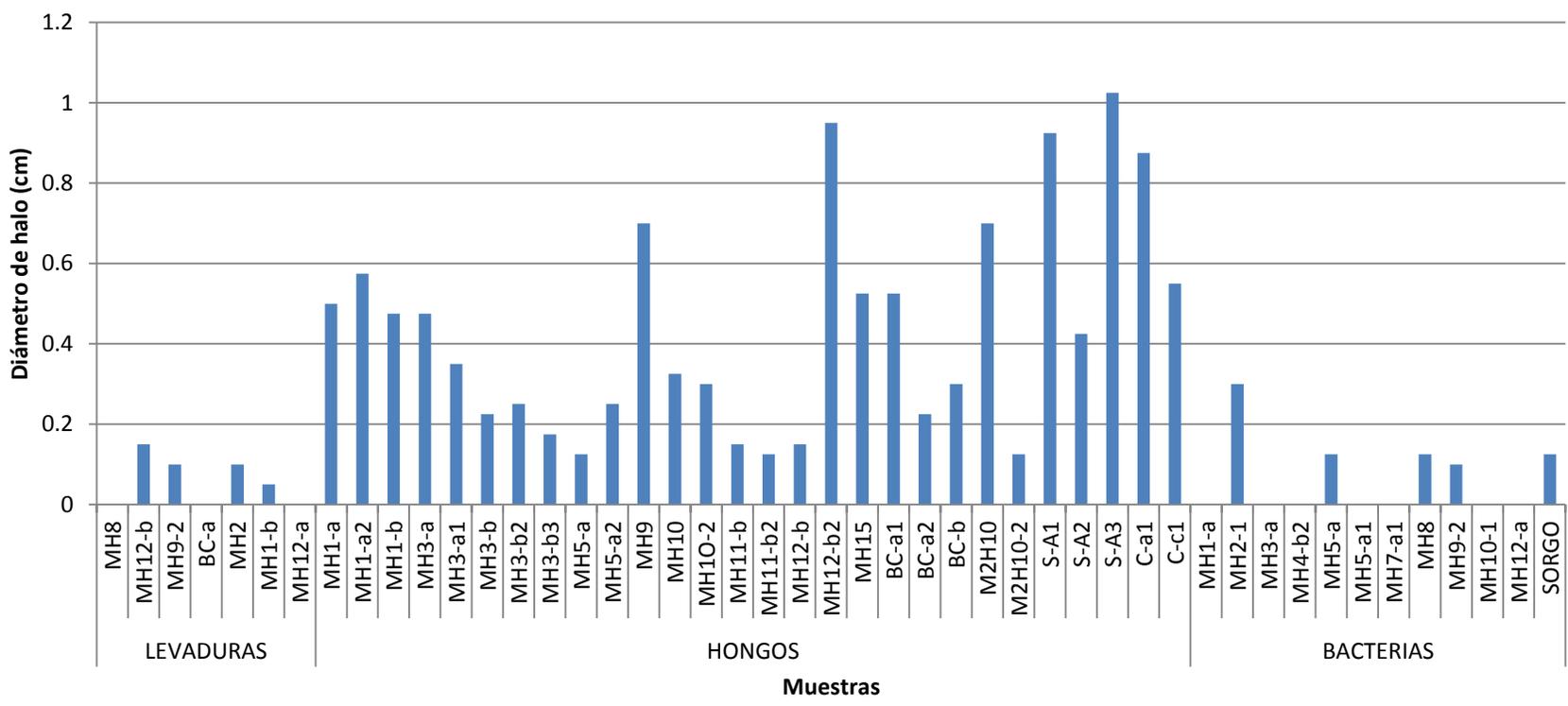


Figura 3.5 Prueba cualitativa de actividad en xilano (XIL)

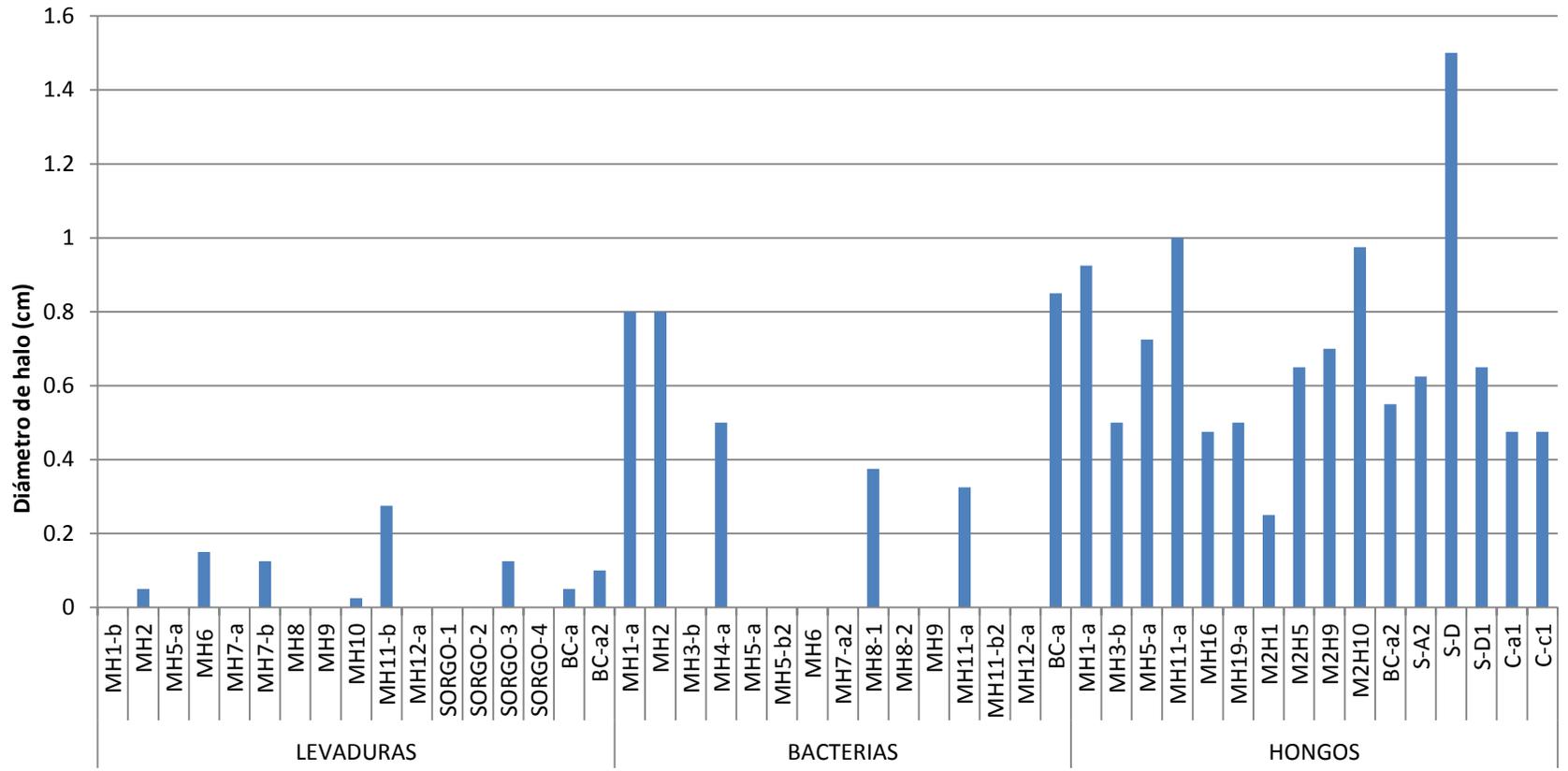


Figura 3.6 Prueba cualitativa de actividad en carboximetilcelulosa (CMC)

En la Tabla 3.2 se muestra a partir de que diámetro se tomarán los microorganismos para realizar la prueba cuantitativa.

Tabla 3.2 Criterios a tomar para los microorganismos a emplear en la actividad cuantitativa

Medio de crecimiento	Microorganismo	Diámetro de halo (cm)
CMC	Levaduras	0.2
	Hongos	0.5
	Bacterias	0.3
XIL	Levaduras	0.1
	Hongos	0.3
	Bacterias	0.1

Bajo los criterios anteriores se determinó que se probarían un total de 21 microorganismos en medio de CMC y un total de 24 en medio de XIL.

Mikán y Castellanos (2004) aislaron tres tipos de microorganismos diferentes para la degradación de celulosa y hemicelulosa entre los que obtuvieron un halo de degradación para hongos de 0.4 a 0.8 cm, bacterias de 0 a 0.3 cm y actinomicetos con diámetros mayores a 0.8 cm aislados de composta de suelo de cultivo. En este trabajo a partir de microorganismos aislados de residuos lignocelulósicos se obtuvieron en hongos un halo de hidrolisis de 0.4 a 1.4 cm, bacterias 0.1 a 0.3 cm y levaduras de 0.05 a 0.3 cm, lo que implica que estos microorganismos poseen la capacidad de segregación de enzima celulasa o xilanasas.

3.3.2 Selección secundaria: Actividad cuantitativa de Celulasas por fermentación sumergida (SMF)

Para el caso de las bacterias y levaduras se realizó una cinética con mediciones cada 12 h y en los hongos mediciones cada 24 h en las cuales se realizó la medición de la absorbancia a 620 nm en cada muestra, para determinar las mejores cepas de actividad se consideró la liberación de azúcares reductores (glucosa y xilosa) con base al método de Miller (1959). Las fermentaciones se realizaron en trazas de Mandels y Weber (1969) usando como carbohidrato CMC. Todas las cinéticas se realizaron por duplicado. Los resultados de absorbancia de la cinética de fermentación con bacterias en medio de CMC para actividad celulasa se muestran en la Figura 3.7 y la cinética con hongos se muestran en la Figura 3.8.

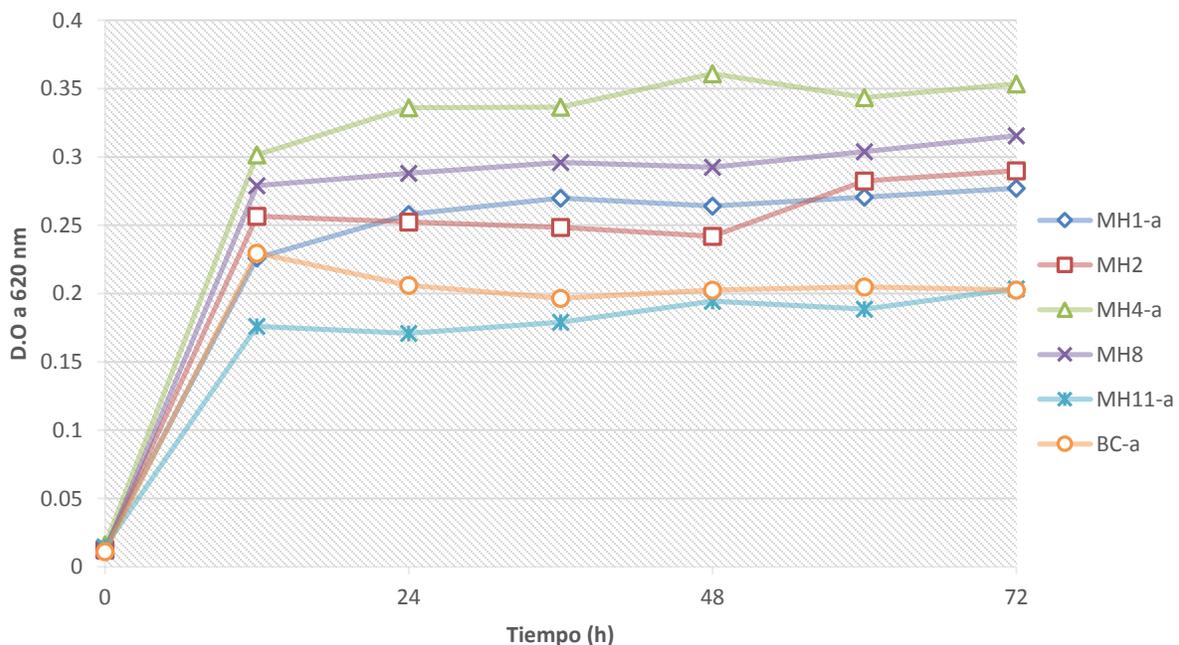


Figura 3.7 Resultados de absorbancia a 620 nm en SMF con bacterias en medio de CMC

La densidad óptica (D.O) muestra el grado de crecimiento del microorganismo en el medio de fermentación.

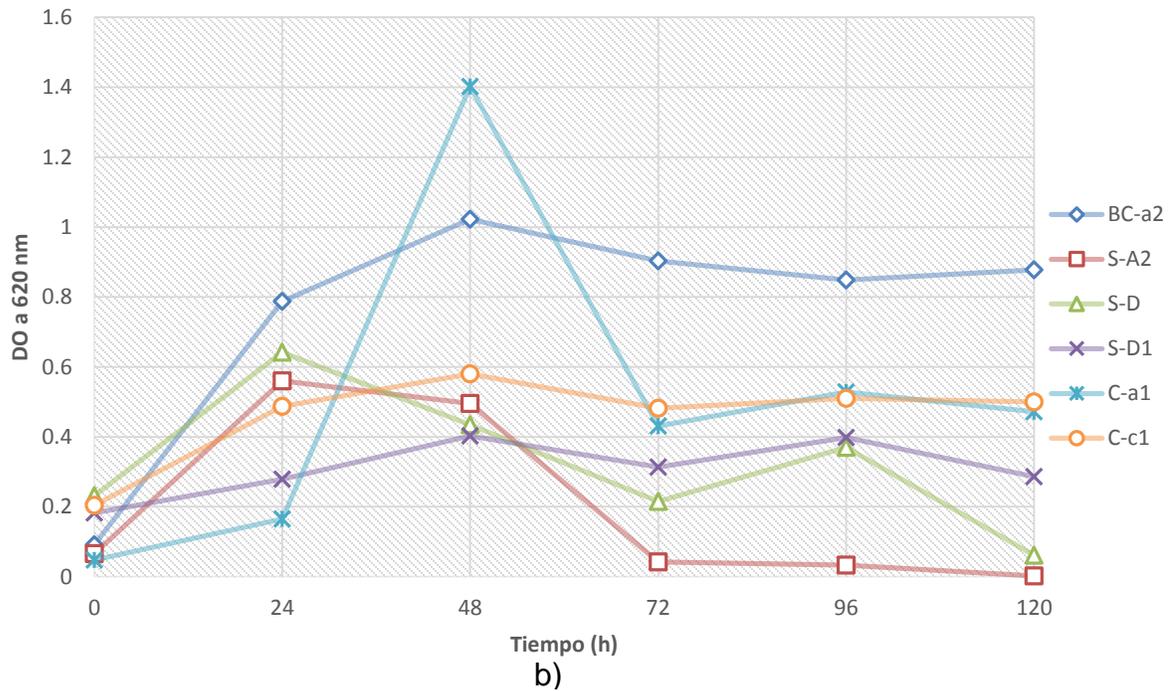
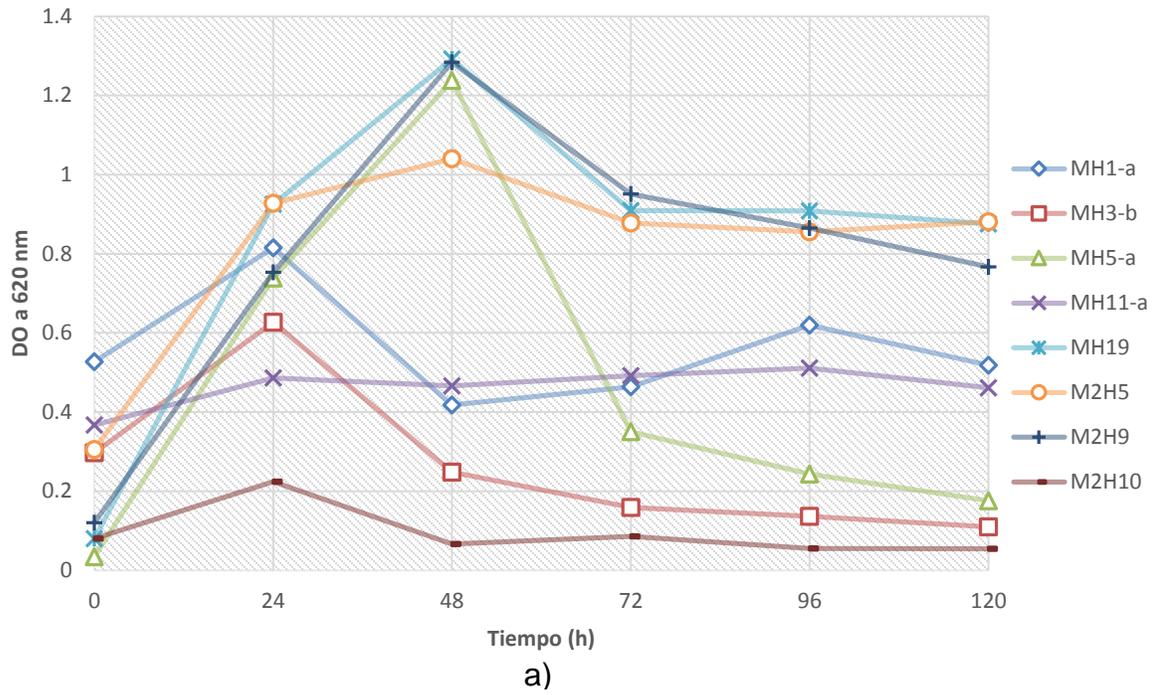


Figura 3.8 Resultados de absorbancia a 620 nm en SMF con: (a) hongos de madera, (b) bagazo de caña, sorgo y coco, en medio de CMC

En las Figuras 3.7 y 3.8 se observa el desarrollo de cada microorganismo durante la fermentación sumergida, para el caso de las bacterias la absorbancia máxima fue de 0.36 y para los hongos de 1.4. Los microorganismos con mayor capacidad de crecimiento en medio de CMC por fermentación sumergida en trazas de Mandels y Weber (1969) son los hongos, y por lo tanto segregan enzimas capaces de hidrolizar la celulosa y convertirla en glucosa, lo que permite el crecimiento y desarrollo del microorganismo. Esto se debe a que las bacterias en su mayoría segregan endoglucanasas y los hongos segregan endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasa, lo que les permite hidrolizar con mayor facilidad celulosa (Gaitan y Perez, 2007).

3.3.2.1 Determinación de glucosa

Las cinéticas de fermentación mostraron que los hongos presentan mayor capacidad de hidrolizar la celulosa a glucosa (Figura 3.10) con respecto a las bacterias (Figura 3.9).

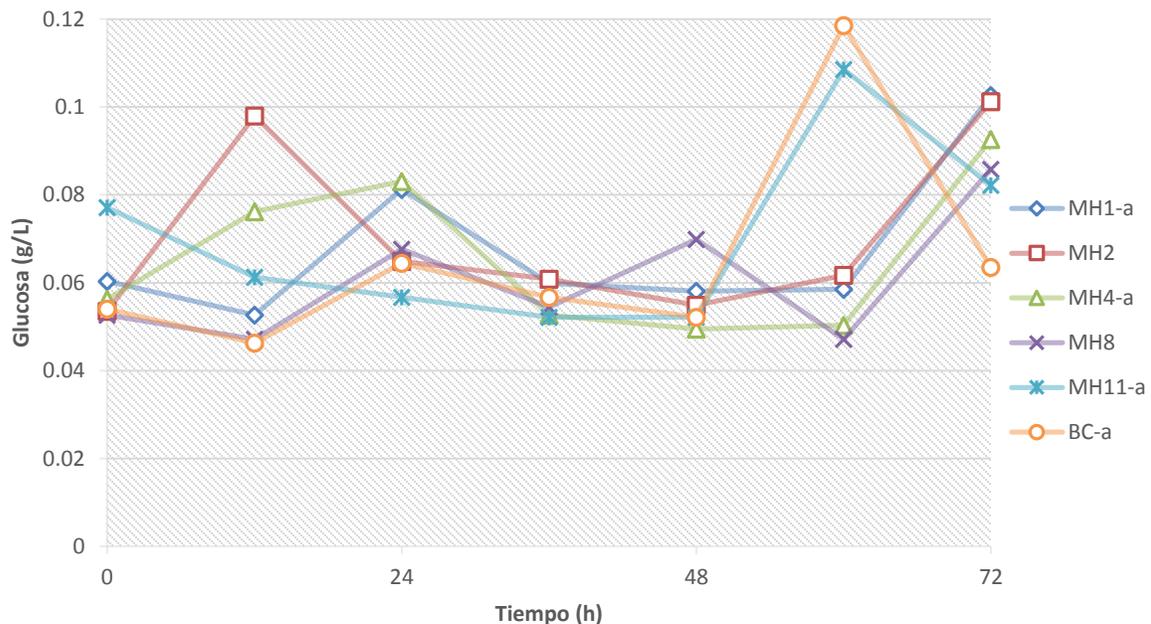
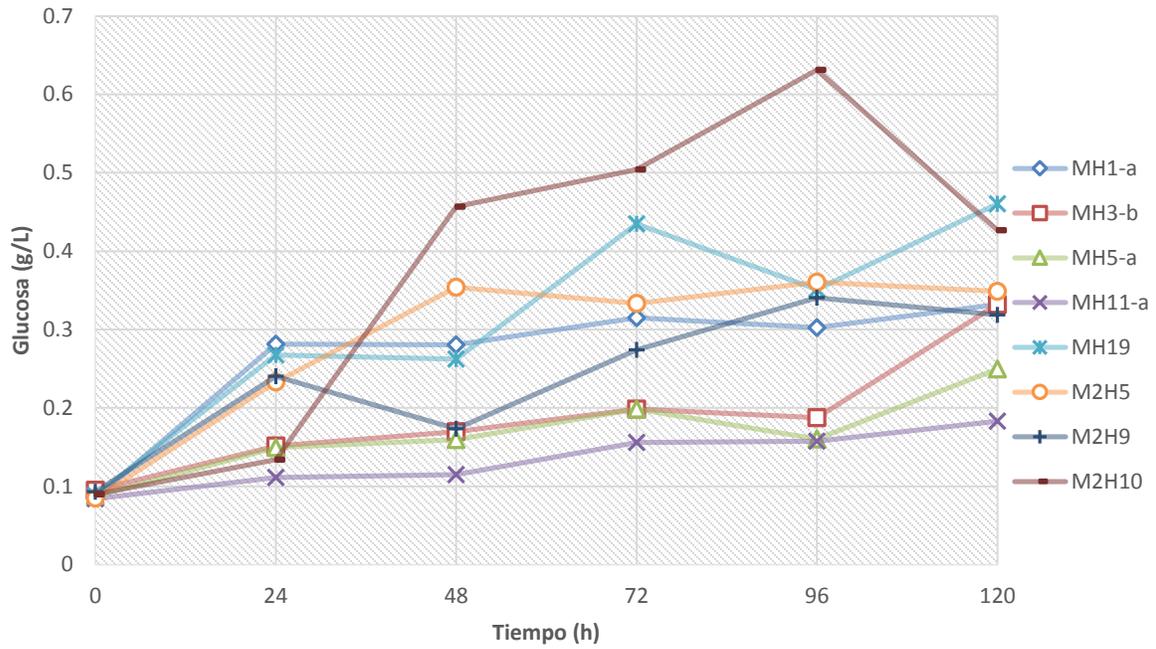
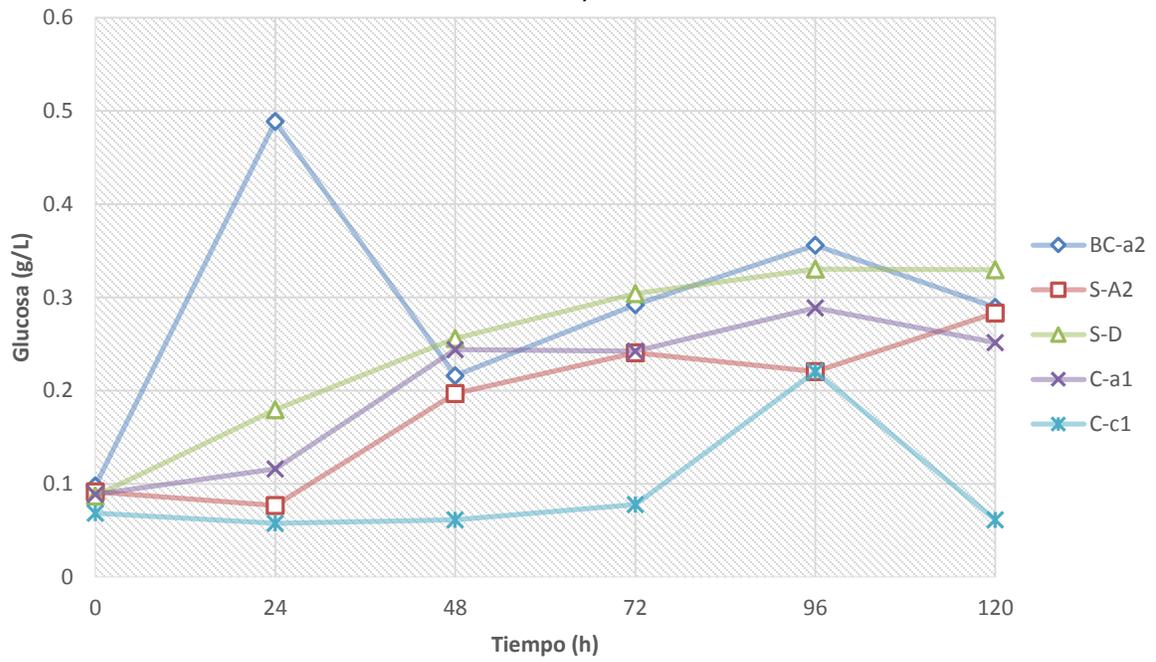


Figura 3.9 Determinación de glucosa en bacterias en SMF de 72 h en medio CMC.



a)



b)

Figura 3.10 Determinación de glucosa en: (a) hongos de madera, (b) bagazo de caña, sorgo y coco, en SMF de 120 h en medio CMC

Como se puede observar en las Figuras 3.9 y 3.10 los hongos poseen mayor capacidad de hidrolizar la CMC y convertirla a glucosa para poder alimentarse y sobrevivir en el medio, todo esto debido a que el medio de trazas de Mandels y Weber (1969) solo posee como fuente de carbono la CMC por lo que el microorganismo se ve obligado a alimentarse solamente de este compuesto y aquellos que no pueden consumirlo tenderán a morir y no podrán crecer.

Las cepas codificadas como MH19, M2H5 y M2H10 mostraron la mayor producción de glucosa (g/L), con valores de 0.460, 0.360 y 0.631 g/L de glucosa a diferentes tiempos de incubación, con respecto a lo reportado por Manjarrés *et al.*, (2011) quienes trabajaron con cepas de *Trichoderma sp.* y *Aspergillus sp.*, obtuvieron 0.479 y 0.338 g/L de glucosa respectivamente después de 7 días de incubación a 30°C y 150 rpm. Lo que indica que los microorganismos que se probaron poseen un alto margen de producción de azúcares reductores. Siendo estas cepas las seleccionadas para realizar fermentación sólida y obtención de extractos enzimáticos.

3.3.3 Selección secundaria: Actividad cuantitativa de xilanasas por fermentación sumergida (SMF)

Para el caso de las bacterias se realizó una cinética con mediciones cada 12 h y en los hongos mediciones cada 24 h en las cuales se realizó la medición de la absorbancia a 620 nm en cada muestra.

Las fermentaciones se realizaron en trazas de Mandels y Weber (1969) usando como fuente de carbono xilano de beechwood (XIL). Todas las cinéticas se realizaron por duplicado. Los resultados de absorbancia de la cinética de fermentación con hongos en medio de XIL para actividad xilanasas se muestran en la Figura 3.11 y la cinética con bacterias se muestran en la Figura 3.12.

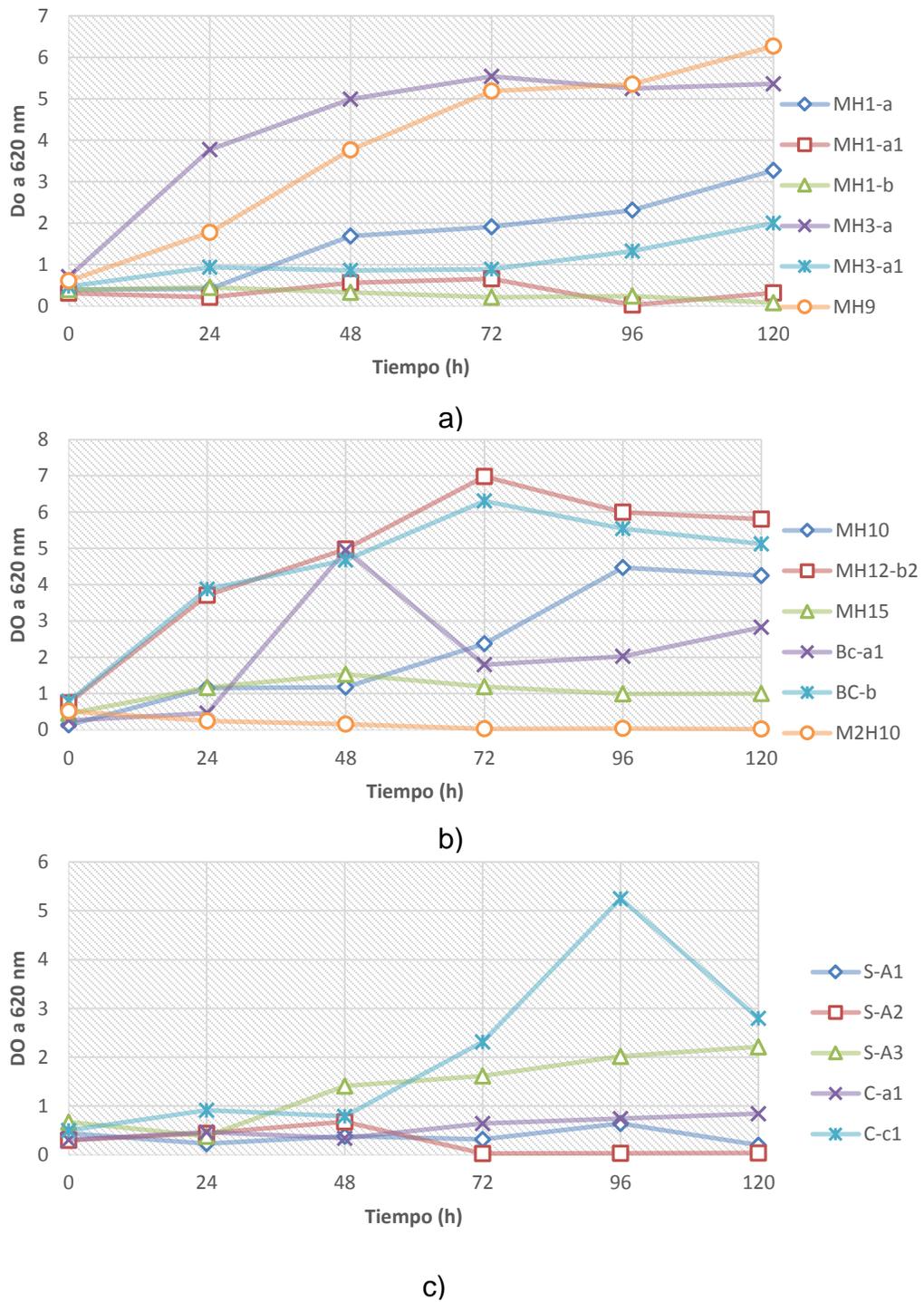


Figura 3.11 Resultados de absorbancia a 620 nm en SMF en: (a) hongos de madera, (b) bagazo de caña y madera, (c) bagazo de sorgo y coco, en medio de XIL

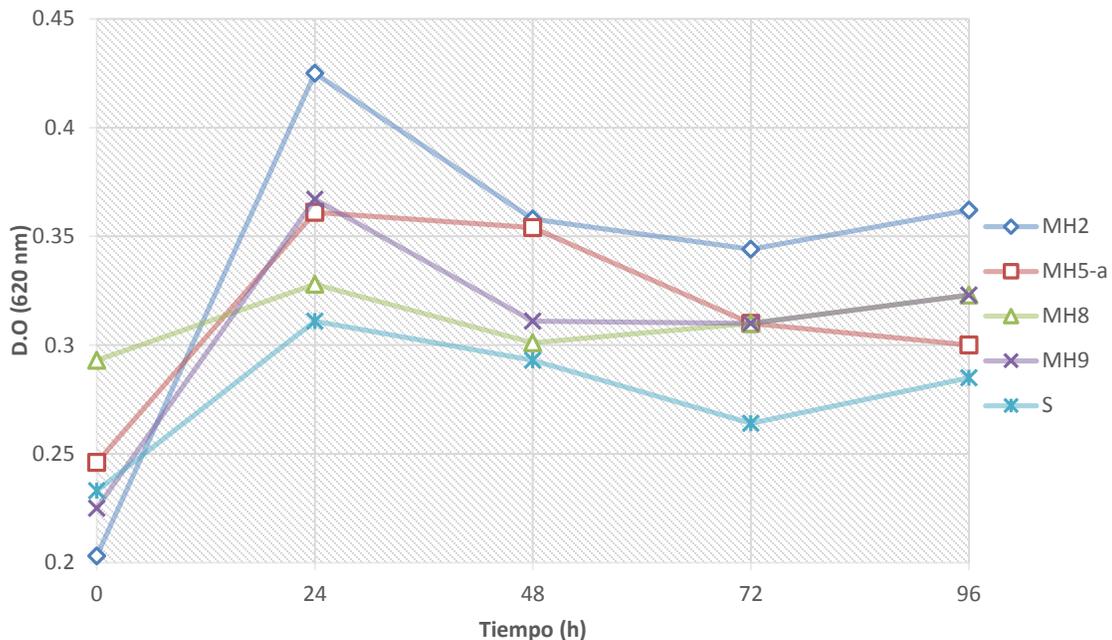
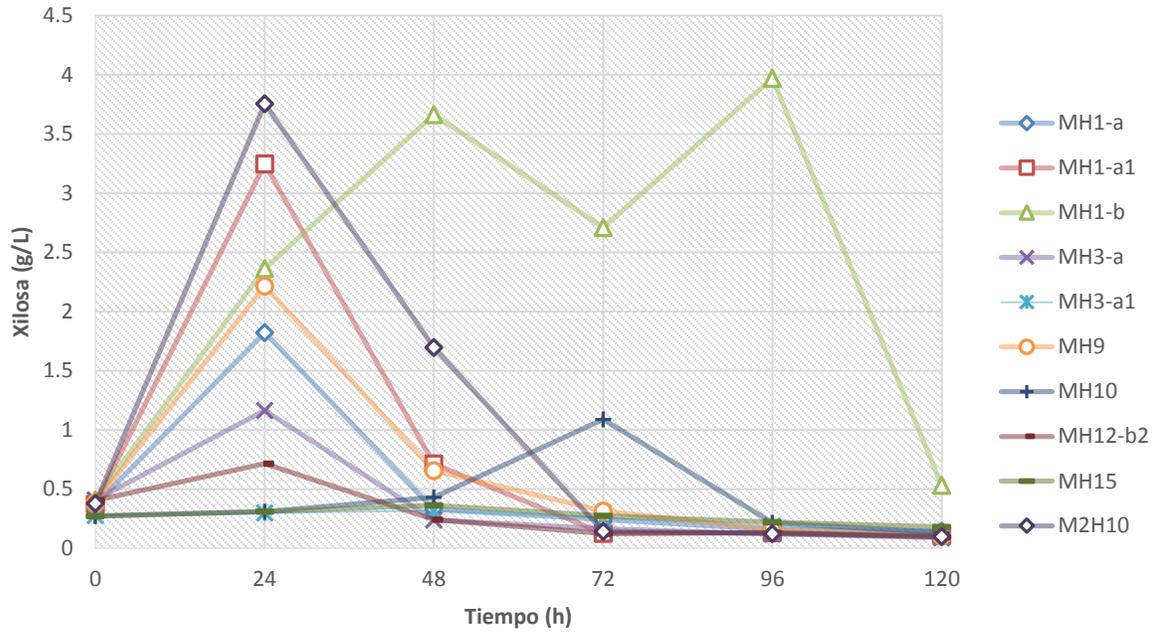


Figura 3.12 Resultados de absorbancia a 620 nm en SMF con bacterias en medio de XIL

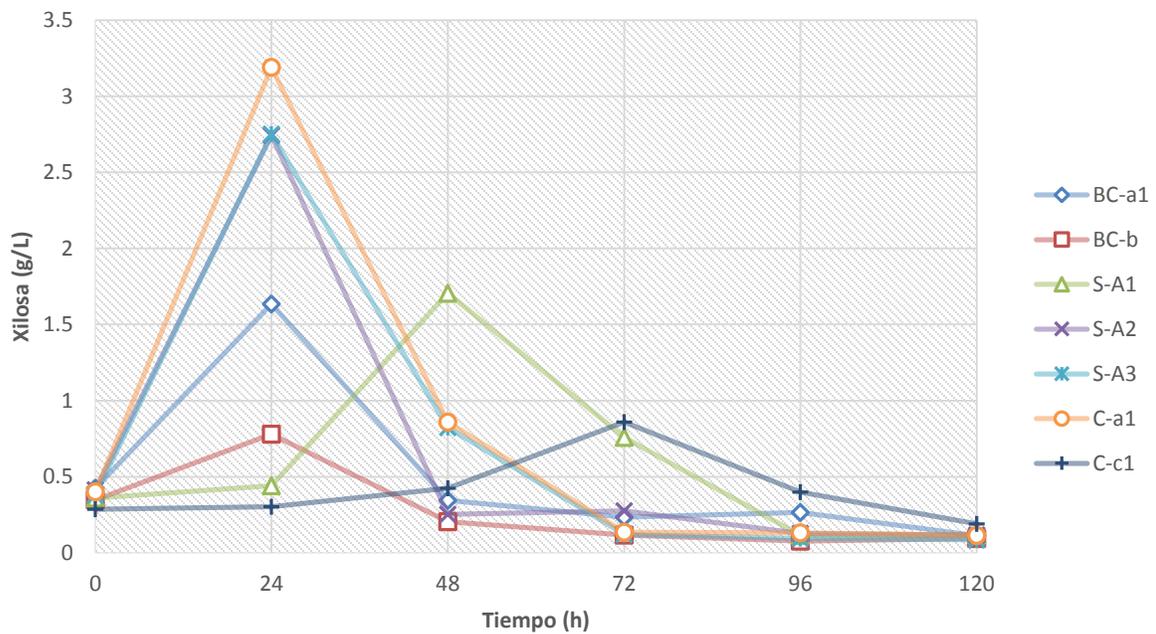
Como se observan en las Figuras 3.11 los hongos presentaron una absorbancia de 6.97 y en la Figura 3.12 la mayor absorbancia fue de 0.425, los hongos presentaron mayor capacidad de crecimiento en el medio de XIL con respecto a las bacterias esto debido a la capacidad de segregación de enzimas, los hongos poseen la capacidad de segregación de endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasa, y las bacterias en su mayoría producen endoglucanasas, lo que los coloca en desventaja con respecto a los hongos (Gaitan y Perez, 2007).

3.3.3.1 Determinación de xilosa

La determinación de azúcares reductores mostrados en las Figuras 3.13 y 3.14 para hongos y bacterias respectivamente, podemos observar que los hongos poseen mayor capacidad de hidrólisis de xilano a xilosa.



a)



b)

Figura 3.13 Determinación de xilosa en: (a) hongos de madera, (b) bagazo de caña, sorgo y coco, en SMF de 120 h en medio de XIL

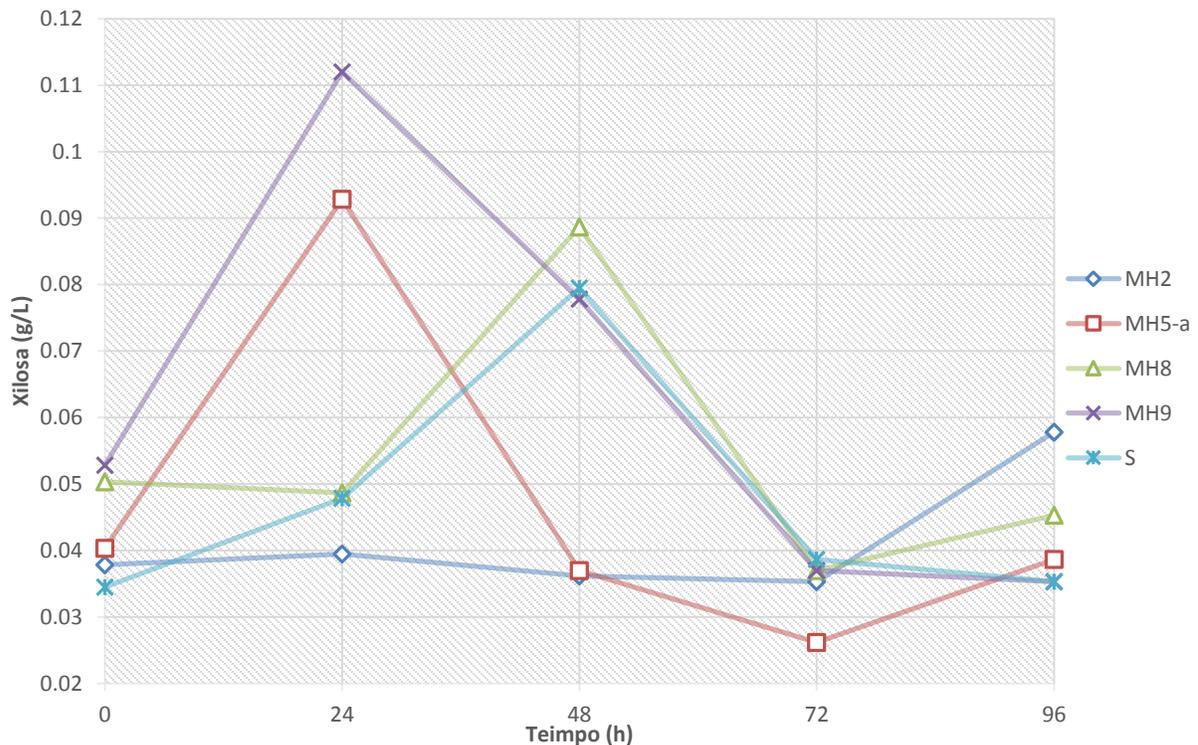


Figura 3.14 Determinación de xilosa en bacterias en SMF de 96 h en medio de XIL

Con las cepas codificadas como MH1-a, MH1-b, M2H10 y C-a1 se obtuvo una concentración de xilosa de 3.24, 3.96, 3.75 y 3.18 g/L en diferentes tiempos de incubación siendo estas las cepas con mayor capacidad de hidrólisis de xilano a xilosa. En comparación con lo obtenido por Rezende *et al.*, (2002) quienes usando *Trichoderma harzianum* por fermentación en estado sólido y usando bagazo de caña como sustrato obtuvo una concentración de 1.24 g/L de xilosa después de 7 días de incubación. Muestra que los microorganismos aislados poseen buena capacidad de hidrólisis de xilano, dichos microorganismos pasaron a la obtención de extractos enzimáticos por fermentación en estado sólido.

3.4 Fermentación en estado sólido

Se realizó una cinética de fermentación bajo dos estudios diferentes:

3.4.1 Fermentación en estado sólido utilizando bagazo de sorgo dulce con tratamiento ácido-alkalino

El tratamiento combinado ácido-alkalino permite eliminar la hemicelulosa (tratamiento ácido) y la lignina (tratamiento alcalino) dando acceso a la celulosa, por tal motivo se seleccionó este pretratamiento para la determinación de actividad enzimática y obtención del extracto enzimático con actividad celulasa, los resultados de la fermentación al final de los 5 días de incubación se muestran en la Figura 3.15.

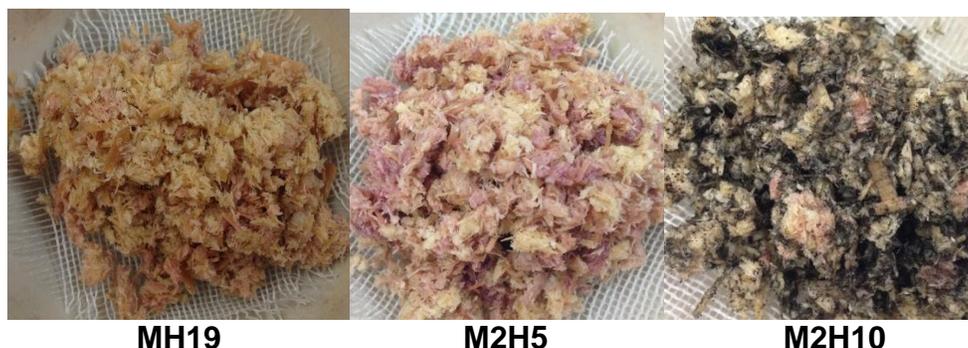


Figura 3.15 Fermentación sólida en bagazo de sorgo con tratamiento ácido-alkalino de las cepas seleccionadas con actividad celulasa.

Como se puede observar en la Figura 3.15, después de los 5 días de incubación, el hongo logró crecer en el bagazo pretratado, mostrando que estos microorganismos liberaron enzimas celulasas, para convertir la celulosa en glucosa, y obtener así su fuente de carbono, también se puede observar que cada microorganismos posee una coloración diferente, identificándolos como tres tipos diferentes de hongos.

En la Figura 3.16 se observan la cinética obtenida a partir de la medición de glucosa durante la fermentación en estado sólido.

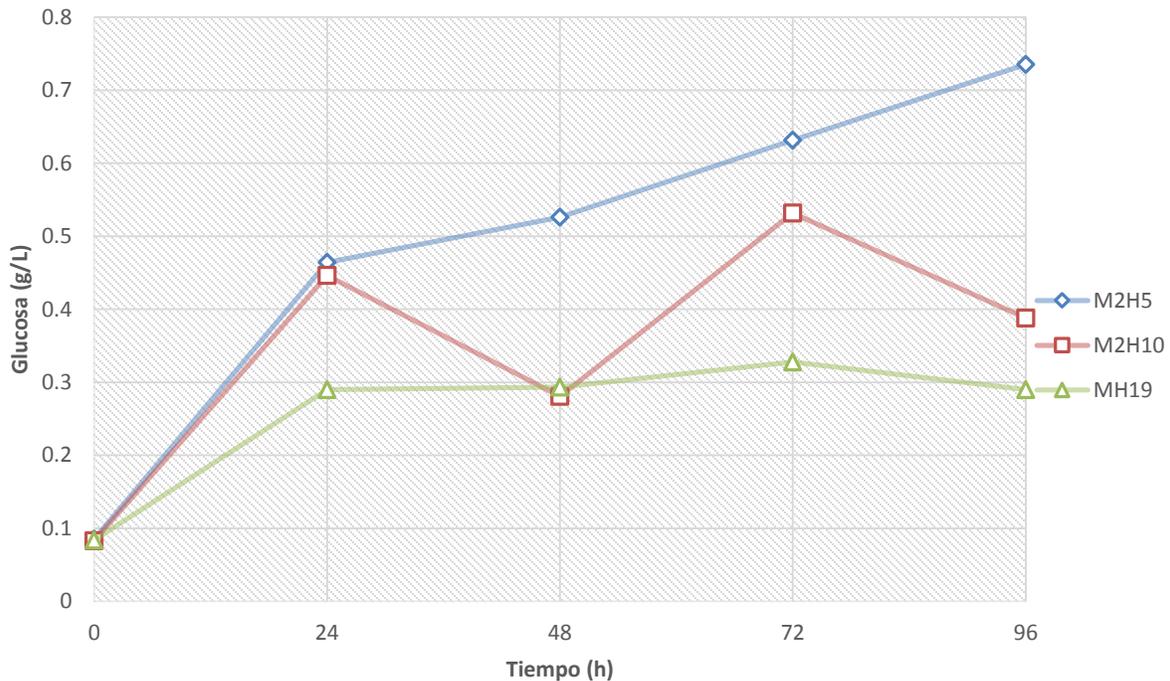


Figura 3.16 Fermentación en estado sólido en celulosa de sorgo

Como se puede observar a partir de las 72 h de incubación se obtiene la mayor concentración de glucosa (g/L), lo que indica que se obtiene la mayor actividad de las enzimas producidas por el microorganismo, para lograr hidrolizar la celulosa y obtener glucosa como su fuente de carbono.

3.4.2 Fermentación en estado sólido utilizando bagazo de sorgo dulce con tratamiento alcalino

El tratamiento alcalino permite eliminar la lignina y mantiene completamente la celulosa y parte de la hemicelulosa, por tal motivo se empleó bagazo de sorgo con pretratamiento alcalino para realizar la cinética de fermentación sólida con las cepas

seleccionadas con actividad xilanasa, los resultados de la fermentación al final de los 5 días de incubación se muestran en la Figura 3.17.

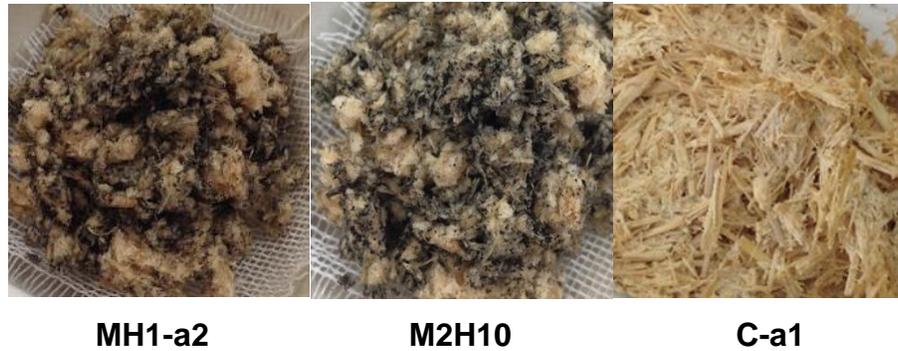


Figura 3.17 Fermentación sólida en bagazo de sorgo con tratamiento alcalino de las cepas seleccionadas con actividad xilanasa.

La determinación de producción de xilosa se realizó por DNS. En la Figura 3.18 se observan los resultados obtenidos en la cinética de fermentación en estado sólido para las cepas seleccionadas.

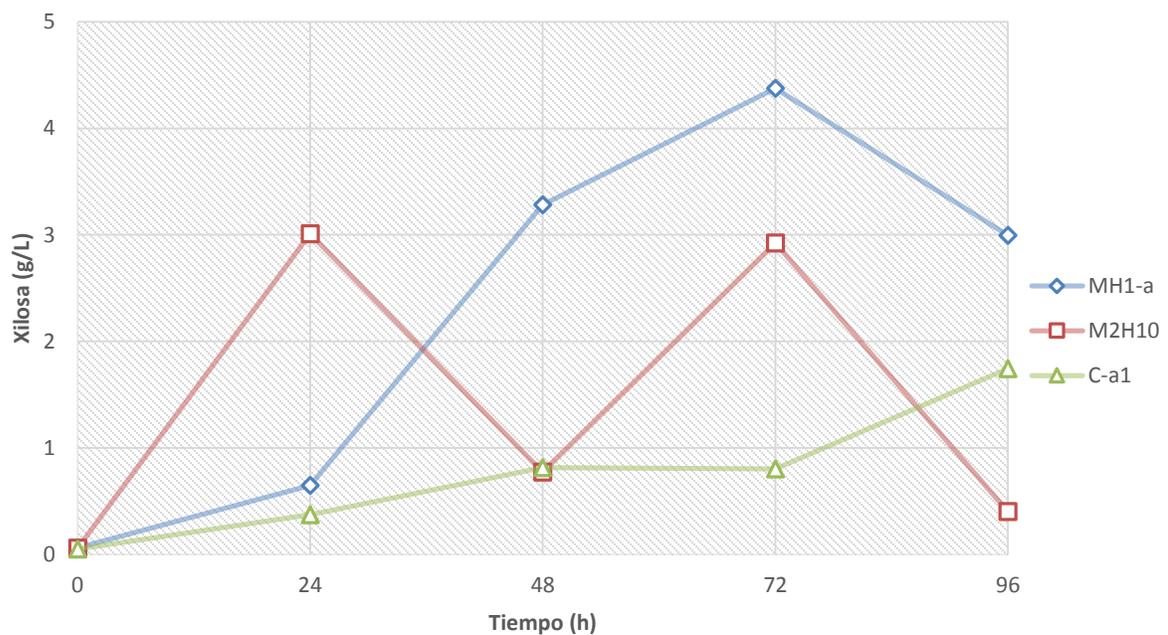


Figura 3.18 Fermentación en estado sólido en celulosa-hemicelulosa de sorgo

Como se puede observar la mejor cepa productora de enzimas xilanasas es la cepa codificada como MH1-a2, debido a que en las 72 h obtuvo la mayor producción de xilosa con respecto a los otros dos microorganismos lo que demuestra que tiene la capacidad de producir enzimas para hidrolizar hemicelulosa a xilosa.

3.5 Determinación de pH óptimo

Para la determinación del pH óptimo de operación del extracto enzimático, se mantuvieron fijos los siguientes factores: temperatura 30°C, velocidad de agitación 250 rpm y tiempo de desarrollo de cinética de 96 h, los resultados se expresan con respecto a la actividad enzimática y proteína extracelular.

3.5.1 Determinación de pH óptimo en extracto con actividad celulasa

El extracto enzimático de la cepa M2H5 se empleó para la determinación de pH óptimo debido a que fue el microorganismo que obtuvo mayor capacidad de hidrólisis de CMC, en la Figura 3.19 se observa el efecto del pH con respecto a la actividad enzimática.

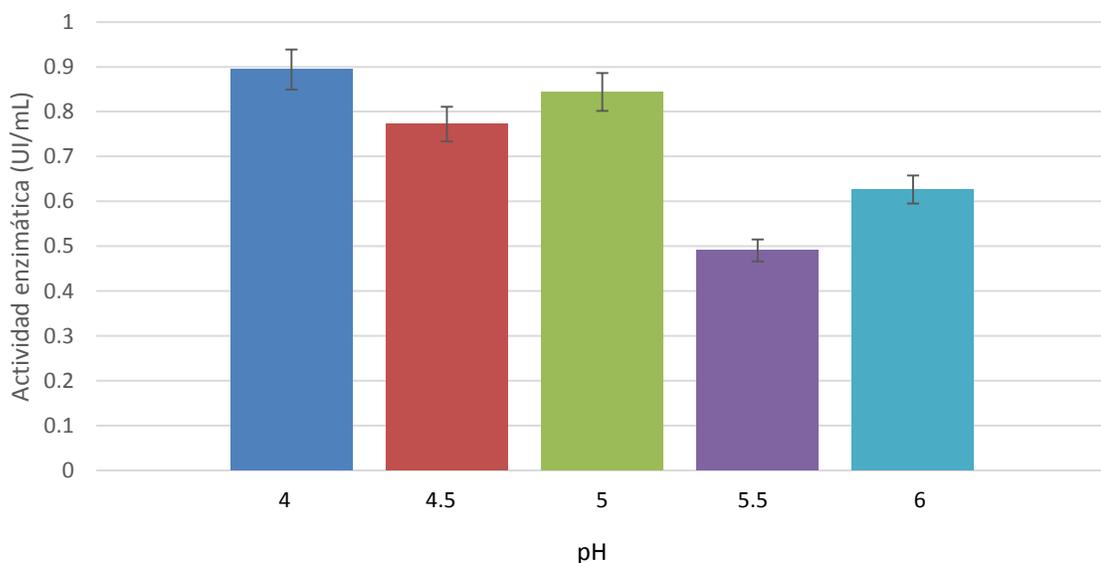


Figura 3.19 Efecto del pH sobre la actividad celulasa.

Como se puede observar a pH 4 y 5, el extracto enzimático presenta una diferencia de actividad enzimática de 5.58 % por lo cual su rango de trabajo le permite adaptarse y trabajar con extractos en esos rangos de pH. El rango de trabajo de la enzima, permite determinar la resistencia de la actividad a variaciones de pH, debido a que valores extremos de pH ocasionarían la desnaturalización de la misma. Es preferible trabajar a pH más cercanos al básico debido a que la mayoría de las soluciones se preparan en agua destilada (pH 7), y se aminora el uso de reactivos, por lo tanto menor cantidad de posibles agentes inhibitorios, es necesario mantener los rangos de pH debido a que las enzimas se ven afectadas por la concentración de iones hidrogeno, lo que implica que a valores muy bajos o muy altos de pH podría provocar la desnaturalización de la enzima.

3.5.1.1 Determinación de proteína extracelular

La proteína extracelular se determinó como medida indirecta de la producción de enzima del microorganismo (Figura 3.20).

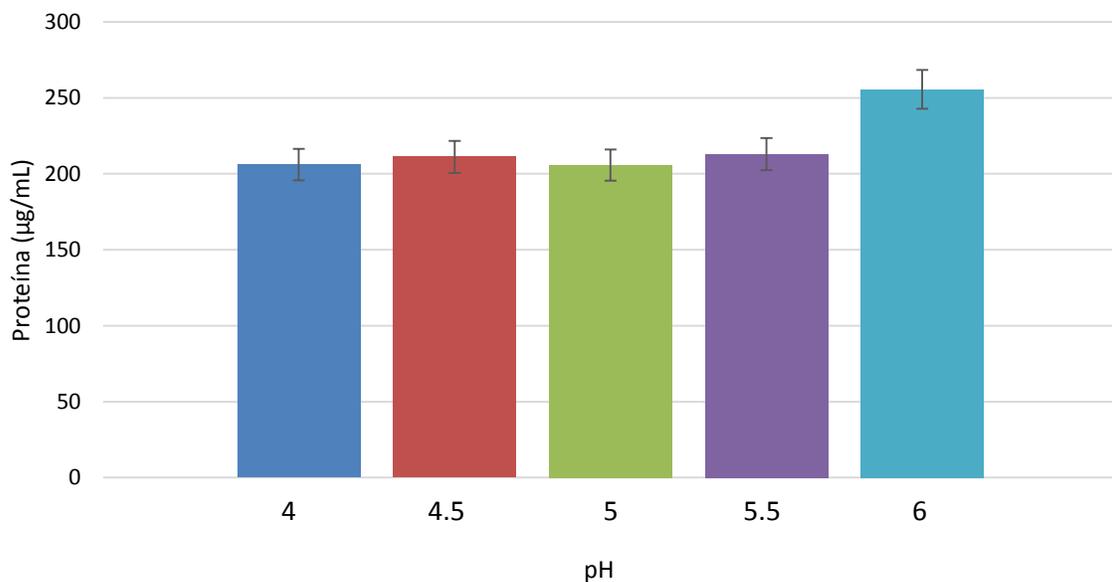


Figura 3.20 Efecto del pH con respecto a la proteína extracelular

La figura 3.20 muestra la producción de proteína extracelular a diferentes pH, manteniendo la temperatura a 30°C (temperatura de crecimiento del microorganismo), debido a que los extractos enzimáticos no son purificados, a partir de las 48 h de incubación se observó la presencia del crecimiento del microorganismo en forma de pellets (Figura 3.21), lo que implica que debido a la temperatura los restos de esporas presentes en el extracto permitieron el crecimiento del microorganismo, según estos resultados podemos asociar la producción de la enzima del hongo M2H5 con respecto a la actividad enzimática.

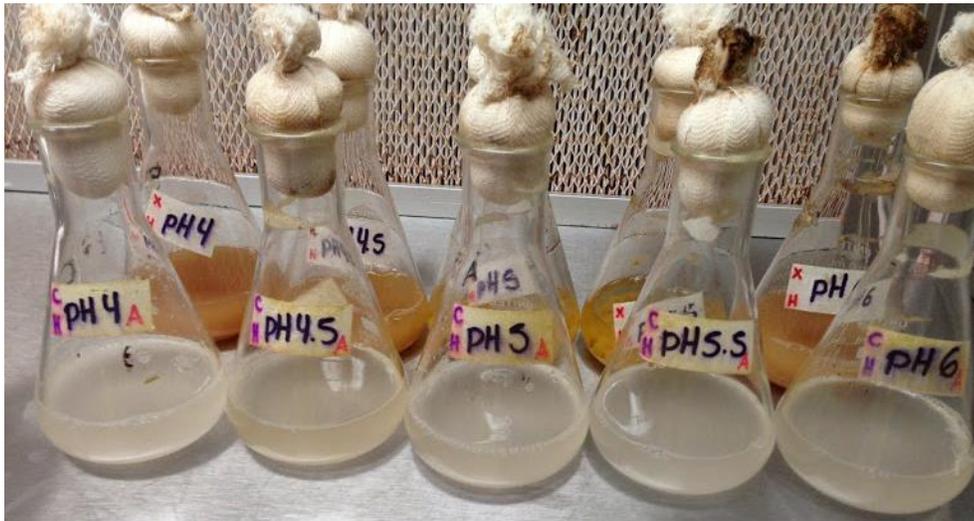


Figura 3.21 Determinación de actividad enzimática celulasa a diferentes pH

Como se puede observar a pH 6 se tiene la mayor producción de proteína extracelular, debido a que el pH y la temperatura permitieron el desarrollo del microorganismo y por lo tanto aumentar la producción de proteína extracelular. Esta prueba se realiza como medida indirecta de la producción o presencia de enzima.

3.5.2 Determinación de pH óptimo en extracto con actividad xilanasa

Al extracto obtenido a partir de la cepa codificada MH1-a2, se le realizó la determinación de pH óptimo de trabajo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.22.

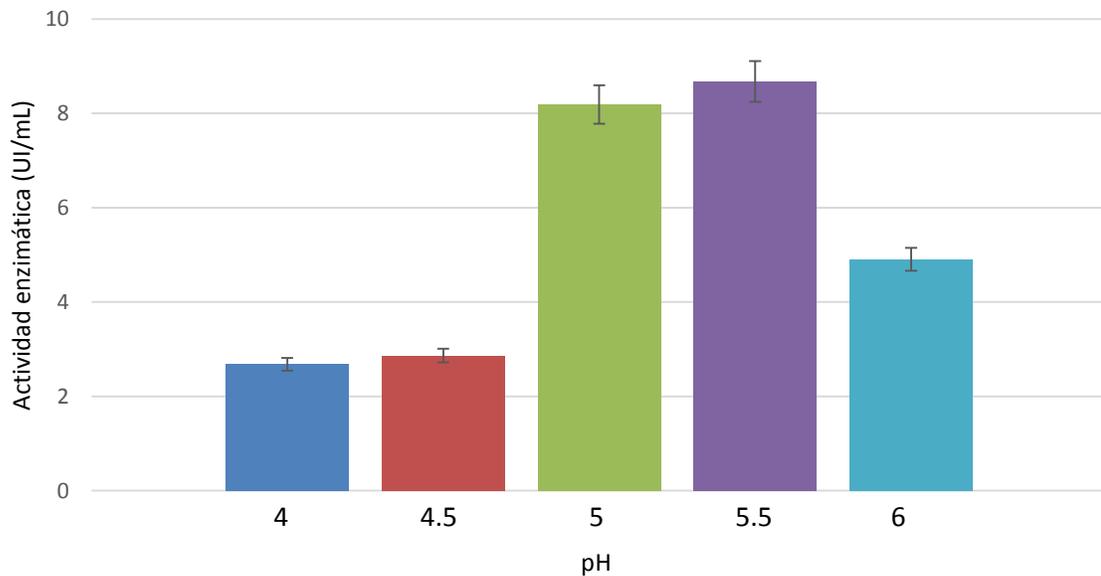


Figura 3.22 Efecto del pH sobre la actividad xilanasa

Como se puede observar el extracto enzimático trabaja de forma similar en pH 5 y pH 5.5, con una variación del 5.64 % lo que le proporciona un rango de trabajo óptimo, se puede observar que a pH 4, 4.5 y 6 se presenta la desnaturalización de la enzima por lo tanto se observa la disminución de la actividad enzimática.

3.5.2.1 Determinación de proteína extracelular

La determinación de proteína extracelular nos muestra de forma indirecta la producción de enzima que sintetizó el microorganismo. La Figura 3.23 muestra la relación entre el pH y la segregación de proteína extracelular.

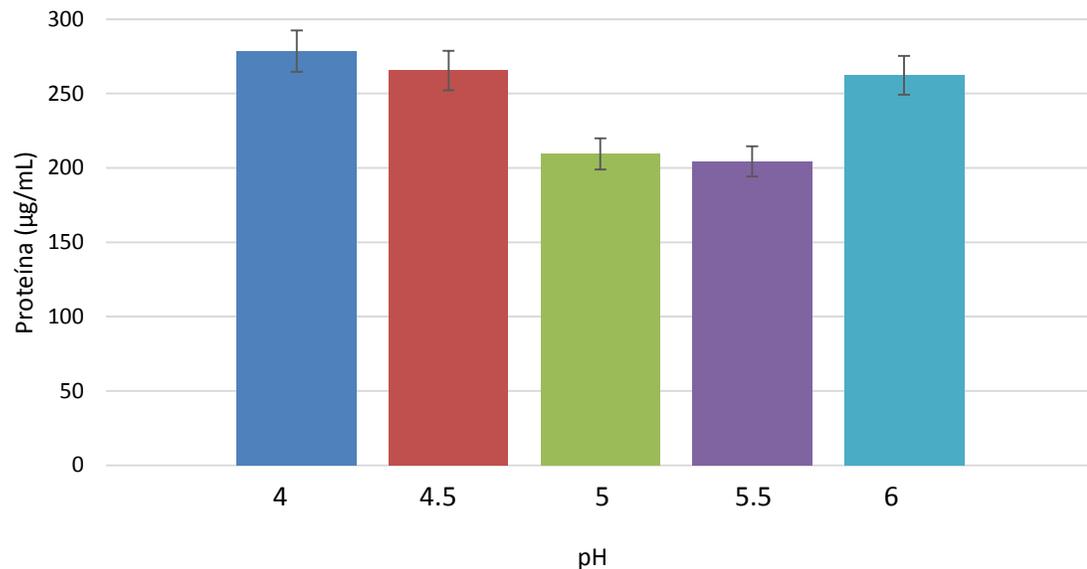


Figura 3.23 Efecto del pH con respecto a la proteína extracelular

La figura 3.23 muestra la producción de proteína extracelular a diferentes pH, manteniendo la temperatura a 30°C (temperatura de crecimiento del microorganismo), los extractos enzimáticos crudos (no purificados) mostraron formación de pellets esto debido a la presencia de esporas en el extracto enzimático crudo obtenido del hongo MH1-a2 (Figura 3.24), lo que implica que debido a la temperatura los restos de esporas presentes en el extracto permitieron el crecimiento del microorganismo.

Como se puede observar a pH 4, 4.5 y 6 se tiene la mayor producción de proteína extracelular, debido a que el pH y la temperatura permitieron el desarrollo del microorganismo y por lo tanto aumentar la producción de proteína extracelular. Esta prueba se realiza como medida indirecta de la producción o presencia de enzima.

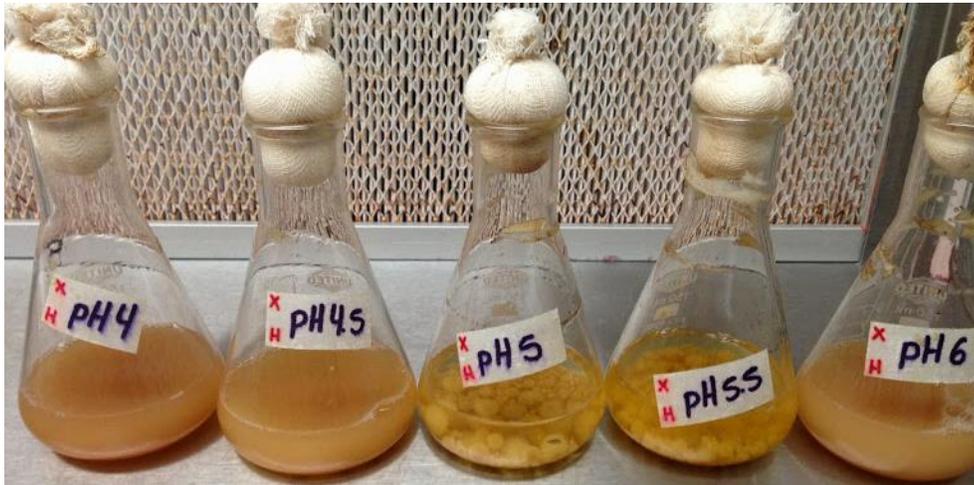


Figura 3.24 Determinación de actividad enzimática xilanasa a diferentes pH

En la Figura 3.24 a pH 5, y 5.5 se observa formación de pellets, en cultivos en fermentación sumergida. La formación de pellets puede considerarse como un balance entre el tipo de inóculo, su concentración y el propio medio de cultivo (pH, temperatura, etc.)

3.6 Determinación de temperatura óptima

A partir de los datos obtenidos de pH óptimo para los extractos enzimáticos se mantuvo el pH fijo a 5, debido a que ambos extractos poseen la mayor actividad a ese rango de pH.

3.6.1 Determinación de temperatura óptima en extracto con actividad celulasa

La variación de temperatura con respecto a la actividad enzimática del extracto se muestra en la Figura 3.25.

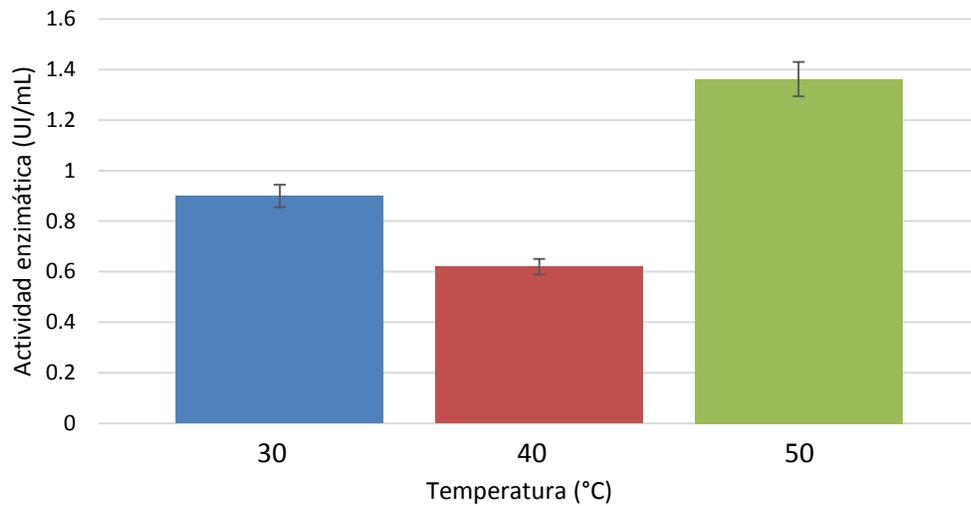


Figura 3.25 Efecto de la temperatura sobre la actividad celulasa

Como se puede observar la mayor actividad por parte del extracto enzimático se obtiene a los 50°C y pH 5, con una actividad de 1.36 UI/mL. En comparación con Farinas *et al.*, (2015), quienes por SSF con *Aspergillus niger* obtuvieron extracto enzimático con actividad celulasa y xilanasas cuyas máximas actividades se obtuvieron a pH 4.5 y 55°C. Rubeena *et al.*, (2013) a partir de hongos *T. resei* obtuvieron extracto enzimático crudo por SMF con CMC (5%) con actividad celulasa cuya mayor actividad se obtuvo a pH 4 y 33°C. Costa *et al.*, (2012) a partir del hongo *Aspergillus ficuum* por fermentación sólida en canola obtuvo extracto enzimático con actividad xilanasas y celulasa determinándose para esta última la mayor actividad a pH 7 y 60°C.

Con respecto a esta investigación se obtuvieron condiciones similares a Farinas *et al.*, (2015), en rangos similares de pH y temperatura, lo que implica que este trabajo sentará las bases para el estudio del extracto enzimático, al realizar los procesos de purificación subsecuentes manteniendo los valores de pH y temperatura obtenidos se podría mejorar la actividad enzimática y por lo tanto aumentar la obtención de azúcares reductores.

3.6.2 Determinación de temperatura óptima en extracto con actividad xilanasa

La determinación se llevó a cabo bajo la variación de la temperatura manteniendo el pH constante, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.26.

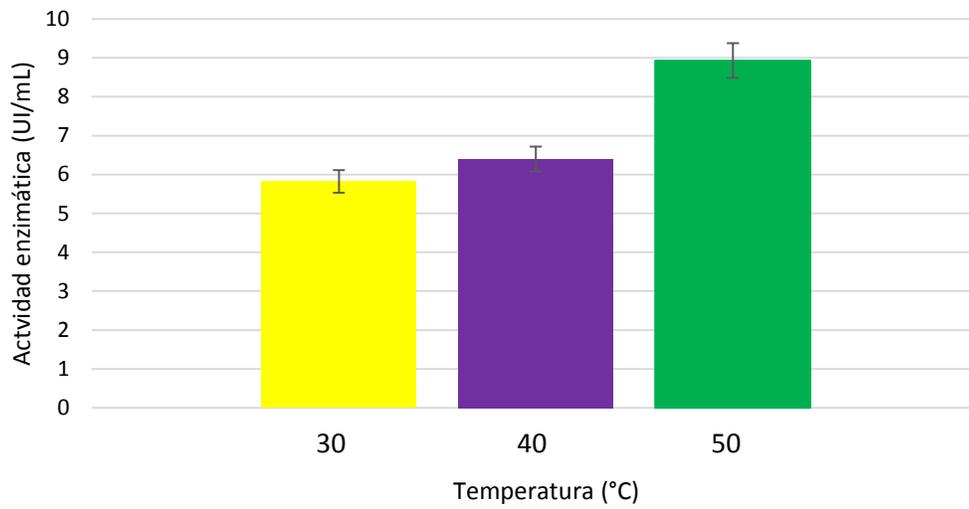


Figura 3.26 Efecto de la temperatura sobre la actividad xilanasa

Como se puede observar la mayor actividad se observa a la 50°C y pH 5, de igual manera que en el extracto enzimático de celulasa. En comparación con lo reportado por Costa *et al.*, (2012) a partir del hongo *Aspergillus ficuum* por fermentación sólida en canola obtuvo extracto enzimático con actividad xilanasa y celulasa para la actividad xilanasa encontró la mayor actividad a pH 5.4 y 45°C. Fengxia *et al.*, (2008) a partir del hongo *Aspergillus ficuum* por fermentación sólida con paja de trigo obtuvo extracto enzimático crudo con actividad xilanasa, encontraron que su mayor actividad se encontraba a pH 5 y 45°C. Con respecto a esta investigación se obtuvieron condiciones similares de pH y temperatura con estas condiciones se esperaba que al realizar la purificación del extracto se obtenga mayor actividad enzimática y a su vez mayor producción de azúcares reductores.

3.7 Determinación de las condiciones de operación

La determinación se realizó para los dos tipos de extractos, determinando la mayor producción de azúcares reductores.

3.7.1 Determinación de condiciones de operación para el extracto enzimático de actividad celulasa

Los resultados obtenidos para el diseño de experimentos 2^2 para el extracto con actividad celulasa se expresan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Diseño de experimentos 2^2 para el extracto con actividad celulasa

Experimento	C_{Extracto} (A)	V_{Agit} (B)	Y glucosa (g/L)	
			Normal	Replica
1	-1	-1	0.424	0.429
2	1	-1	0.320	0.348
3	-1	1	0.366	0.374
4	1	1	0.483	0.486

El análisis de varianza (ANOVA) del diseño de experimentos 2^2 para el extracto con actividad celulasa, muestra la interacción entre los factores con respecto a la producción de azúcares reductores (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 ANOVA para el diseño de experimentos 2^2 para extracto con actividad celulasa

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	Razón F	Estadísticamente Significativo
C_{Extracto} (A)	1	0.0002	2.25	No
V_{Agit} (B)	1	0.0044	40.86	Si
AB	1	0.0215	198.61	Si
Error	4	0.0001		
Total	7	0.0265		

Como se observa en el ANOVA, el factor significativo es la velocidad de agitación (rpm), y la interacción de la misma con la concentración de extracto, lo que demuestra que la actividad de hidrólisis del extracto influye de manera significativa con respecto a la velocidad de agitación.

La Figura 3.27 muestra el efecto principal (V_{Agit}) y la interacción de los factores con respecto a la obtención de Glucosa (g/L).

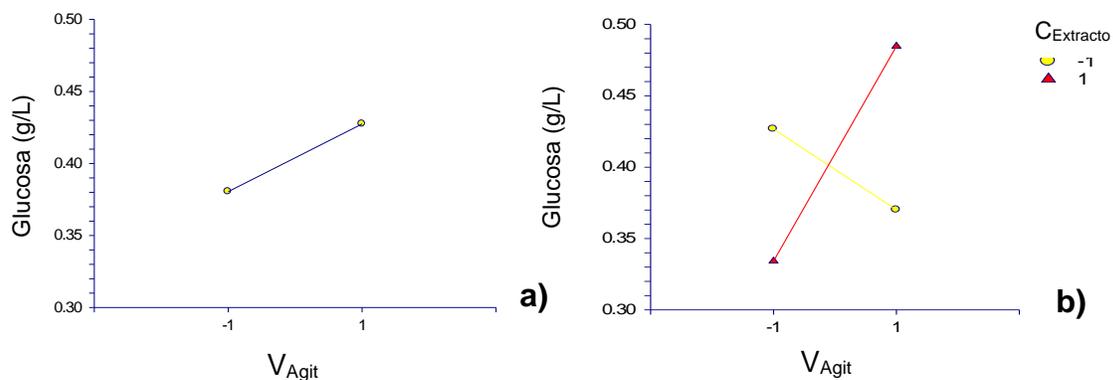


Figura 3.27 Efecto principal (V_{Agit}), y la interacción de las (V_{Agit}) con la concentración de extracto del diseño de experimentos 2^2 para extracto con actividad celulasa. a) Efecto de (V_{Agit}) (-1= 200 rpm, 1=300 rpm), b) Efecto de (V_{Agit}) (-1= 200 rpm, 1=300 rpm) con la concentración de extracto (-1=1mL, 1=2mL).

En la Figura 3.27 a) Se observa que a niveles altos de V_{Agit} (300 rpm) se obtiene la mayor concentración de glucosa (g/L), debido a que permite que el extracto interactúe con el medio aumentando la capacidad de hidrólisis.

La Figura 3.27 b) muestra que al interactuar ambos factores, se tiene que a niveles altos de ambos factores 300 rpm y 2 mL de extracto se obtiene la mayor obtención de glucosa (g/L).

El análisis de residuales se muestra en la Figura 3.28, donde se observa que todos los factores convergen a una media en común, a excepción de dos valores inusitados que pueden deberse a error humano o fallas en el equipo de medición.

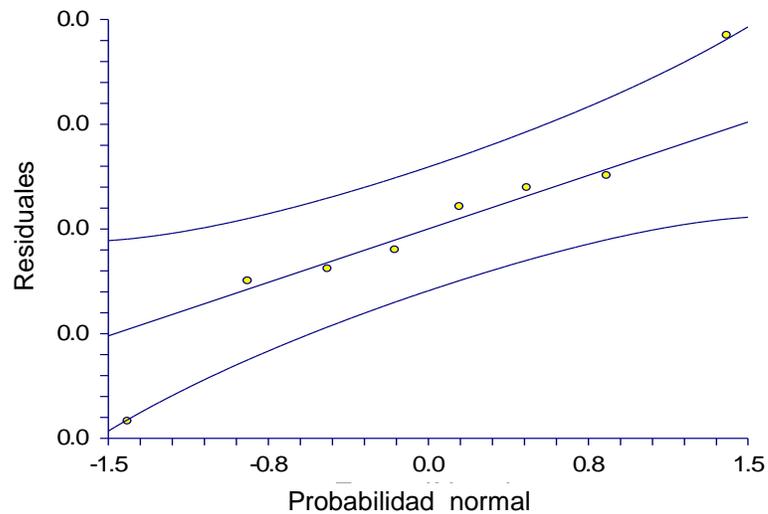


Figura 3.28 Residuales del experimento del extracto con actividad celulasa con respecto a la obtención de Glucosa (g/L).

Los resultados obtenidos del diseño de experimento 2^2 para extracto con actividad celulasa se ajustan mediante el siguiente modelo:

$$\text{Glucosa (g/L)} = 0.4039 + 0.0055 C_{\text{Extracto}} + 0.0235 V_{\text{Agit}} + 0.0518 C_{\text{Extracto}} * V_{\text{Agit}} \quad (3.1)$$

El polinomio de regresión muestra una R^2 de 0.9837 lo que demuestra la idoneidad del modelo.

3.7.2 Determinación de condiciones de operación para el extracto enzimático de actividad xilanasa

Los resultados obtenidos para el diseño de experimentos para el extracto con actividad celulasa se expresan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Diseño de experimentos 2^2 para el extracto con actividad xilanasa

Experimento	C_{Extracto} (A)	V_{Agit} (B)	Y xilosa (g/L)	
			Normal	Replica
1	-1	-1	5.463	5.522
2	1	-1	4.862	4.929
3	-1	1	5.321	5.501
4	1	1	6.317	6.355

El análisis de varianza (ANOVA) del diseño de experimentos 2^2 para el extracto con actividad xilanasa, muestra la interacción entre los factores con respecto a la producción de azúcares reductores (Tabla 3.6).

Tabla 3.6 ANOVA para el diseño de experimentos 2^2 para extracto con actividad xilanasa

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	Razón F	Estadísticamente Significativo
C_{Extracto} (A)	1	0.0539	10.34	Si
V_{Agit} (B)	1	0.9225	176.91	Si
AB	1	1.1577	222.02	Si
Error	4	0.0052		
Total	7	2.1550		

La Tabla 3.6 muestra que todos los factores son significativos sin embargo la velocidad de agitación presenta el valor más alto, por lo tanto hay relación directa entre la concentración del extracto y la velocidad de agitación.

La Figura 3.29 muestra el efecto principal (V_{Agit}) y la interacción de las rpm con la concentración de extracto con respecto a la obtención de Xilosa (g/L).

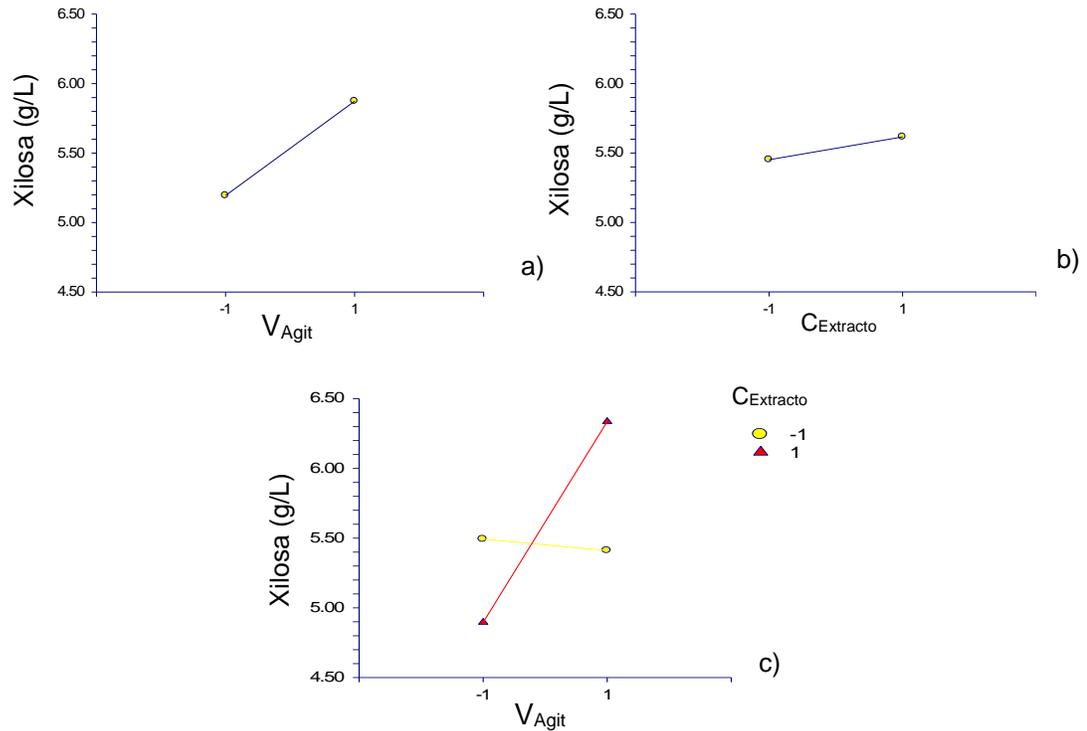


Figura 3.29 Efecto principal (V_{Agit}) y la interacción de las (V_{Agit}) con la concentración de extracto del diseño de experimentos 2^2 para extracto con actividad xilanasa. a) Efecto de V_{Agit} (-1= 200 rpm, 1=300 rpm), Efecto de la concentración de extracto (-1= 1 mL, 1=2 mL) con las V_{Agit} (-1=200 rpm, 1=300 rpm) y c) Efecto de V_{Agit} (-1= 200 rpm, 1=300 rpm) con la concentración de extracto (-1=1mL, 1=2mL).

En la Figura 3.29 a) se observa que a niveles altos de V_{Agit} (300 rpm) se obtuvo la mayor concentración de xilosa (5.8 g/L) lo que indica que la velocidad de agitación tiene una influencia significativa. Figura 3.29 b) muestra que a nivel alto de concentración de extracto (2 mL) se obtiene la mayor concentración de xilosa (5.6 g/L), con una variación del 11 % con respecto al nivel bajo de extracto (1 mL), la Figura 3.29 c) muestra la interacción de los dos factores en la que se demuestra que a niveles altos de cada factor se obtiene la mayor concentración de xilosa (6.4 g/L), sin embargo la agitación muestra ser el factor más significativo para la obtención de xilosa (g/L).

El análisis de residuales se muestra en la Figura 3.30, donde se observa que todos los factores convergen a una media en común, a excepción de dos valores alejados de la media, esto se puede deber a errores de calibración en el equipo o error humano.

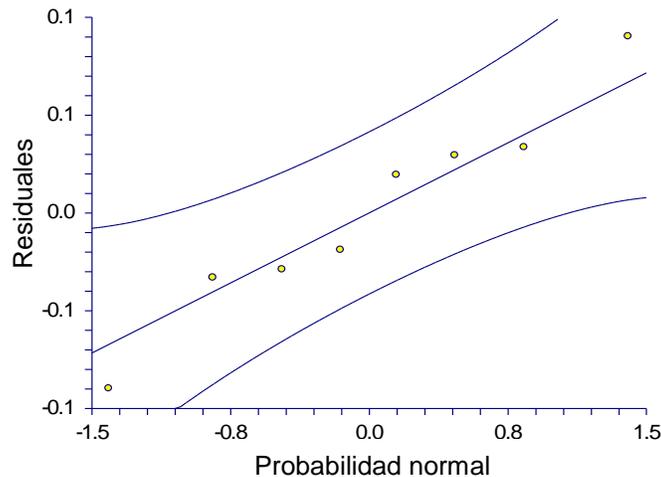


Figura 3.30 Residuales del experimento del extracto con actividad xilanasa con respecto a la obtención de Xilosa (g/L).

Los resultados obtenidos del diseño de experimento 2² para extracto con actividad xilanasa se ajustan mediante el siguiente modelo:

$$\text{Xilosa (g/L)} = 5.5337 + 0.082C_{\text{Extracto}} + 0.0339V_{\text{Agit}} + 0.3804C_{\text{Extracto}} * V_{\text{Agit}} \quad (3.2)$$

El polinomio de regresión muestra un valor de R² de 0.9903 lo que demuestra la idoneidad del modelo.

3.8 Determinación de parámetros cinéticos por fermentación sumergida

A cada tipo de extracto crudo se le realizó la determinación de parámetros cinéticos K_m, V_{max} y K_{cat} por fermentación sumergida. Se determinó con base a diferentes concentraciones de sustrato las diversas velocidades de reacción (V_m) con ayuda del programa Matlab 2013a.

3.8.1 Determinación de K_m , V_{max} y K_{cat} en extracto crudo con actividad celulasa

Para la determinación de los parámetros cinéticos se realizaron cinéticas a diferentes concentraciones de sustrato manteniendo pH, temperatura y agitación constantes (Figura 3.31).

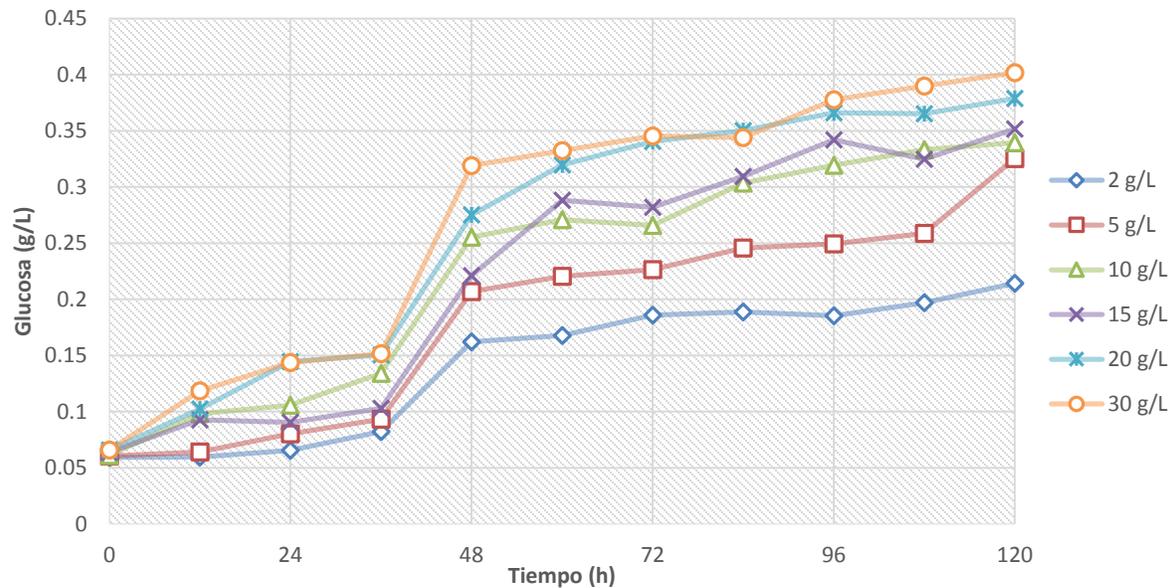


Figura 3.31 Formación de producto a diferentes concentraciones de sustrato (CMC)

La Figura 3.31 muestra la cinética de reacción o curva de avance de reacción, en la cual podemos observar la formación de producto (glucosa), a las diferentes concentraciones de sustrato empleadas en función del tiempo. A medida que la reacción ocurre, la velocidad de acumulación disminuye debido al consumo de sustrato de la reacción. La máxima concentración de glucosa (0.4 g/L) se obtuvo con 30 g/L de (CMC).

Con base a los resultados de producto (Glucosa (g/L)) obtenidos a partir de las diferentes cinéticas a diferentes concentraciones de sustrato se determinó la velocidad de reacción V_m con ayuda del programa Matlab 2013^a, con los cuales se construyeron los diferentes gráficos de velocidades para cada una de las concentraciones a diferentes tiempo de reacción (Figura 3.32).

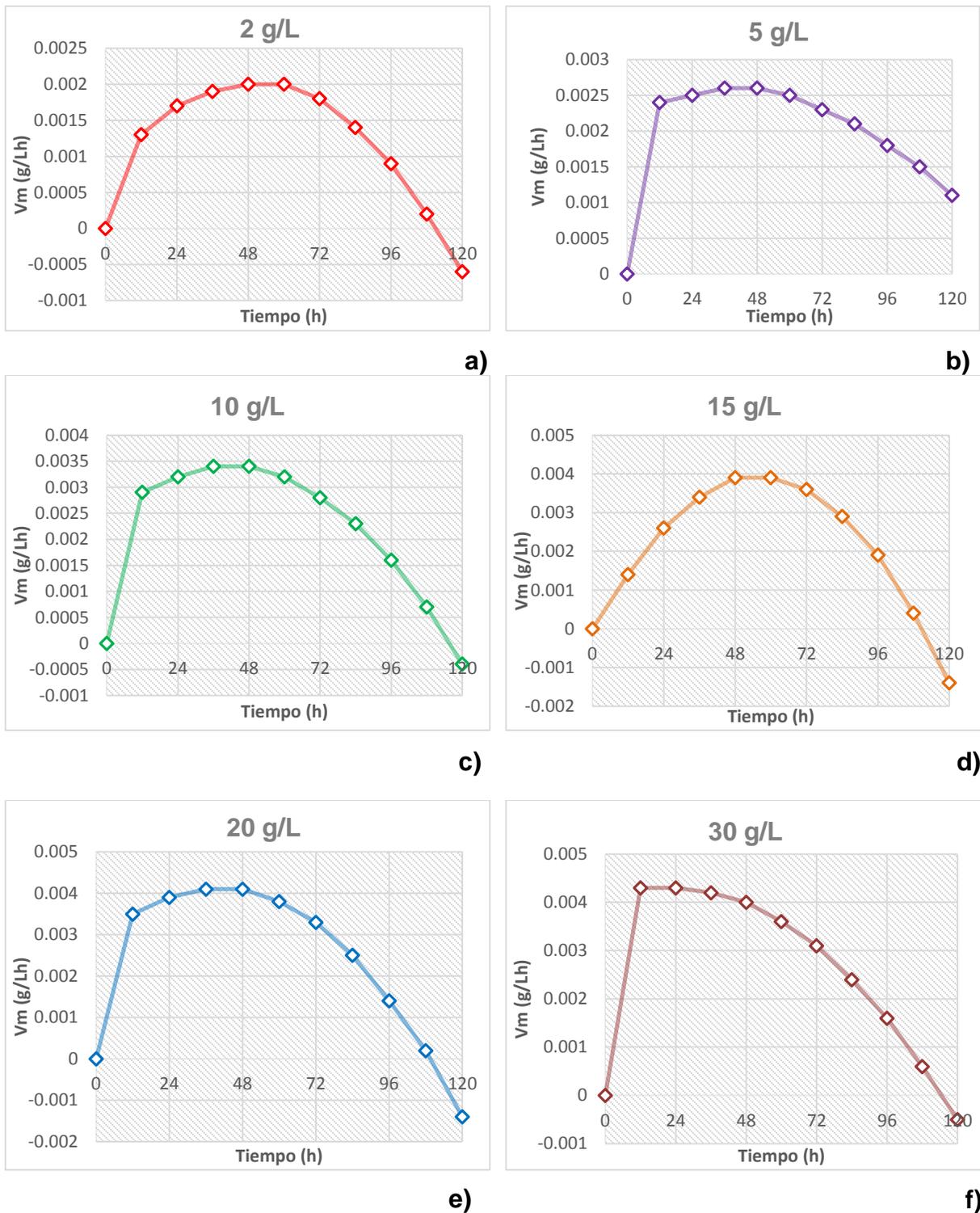


Figura 3.32 Velocidades medias a diferentes concentraciones de sustrato (CMC)

Como se observa en la Figura 3.32 a), b), c), d) y e) la máxima velocidad se obtuvo a las 48 h de reacción, a diferencia de la Figura 3.32 f) en donde la máxima velocidad se obtuvo a partir de las 24 h de reacción, esto se debe a que la enzima alcanzó la velocidad máxima en la que puede trabajar, debido a la sobresaturación del medio de CMC.

En la Tabla 3.7 muestra las velocidades máximas de reacción obtenidas para cada concentración de sustrato, utilizados para la realización del gráfico de Lineweaver-Burk.

Tabla 3.7 Velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sustrato (CMC)

C_{Sustrato} (g/L)	V_m (g/Lh)	$\frac{1}{C_{\text{Sustrato}}}$ (g/L)	$\frac{1}{V_m}$ (g/Lh)
2	0.002	0.5000	500.0000
5	0.0026	0.2000	384.6154
10	0.0034	0.1000	294.1176
15	0.0039	0.0667	256.4103
20	0.0041	0.0500	243.9024
30	0.0043	0.0333	232.5581

La Figura 3.33 muestra la ecuación para el cálculo de K_m , V_{max} y K_{cat} a partir de la ecuación de Lineweaver-Burk (Ec. 2.2).

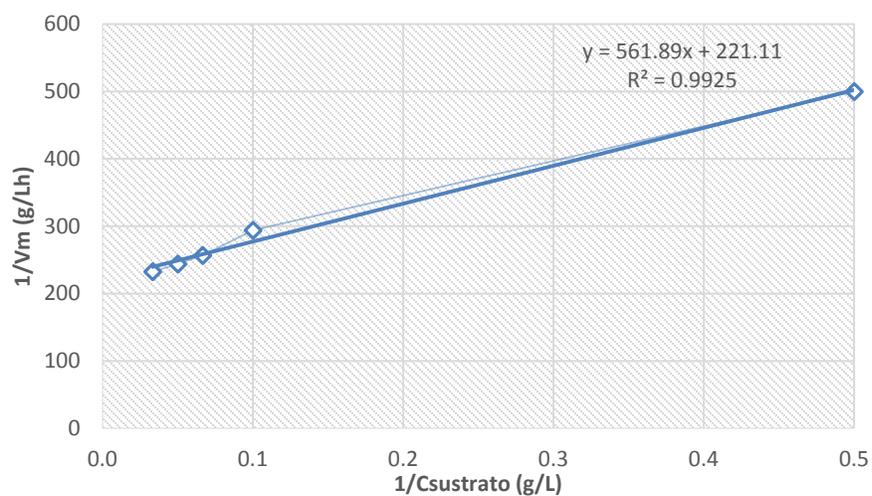


Figura 3.33 Regresión lineal en base al modelo de Lineweaver-Burk para Celulasas

Los valores aparentes (debido a que el extracto no es purificado) de K_m , V_{max} y K_{cat} fueron 2.541 g/L, 4.5226×10^{-3} g/Lh y $0.102524 \text{ min}^{-1}$ respectivamente. La constante de Michaelis K_m , es un parámetro relacionado con la afinidad de una enzima al sustrato, valores pequeños de K_m demuestra una alta afinidad de la enzima por el sustrato, y valores altos de K_m una baja afinidad de la enzima por el sustrato.

Con base a los valores obtenidos el modelo cinético se presenta en la ecuación 3.3.

$$V_m = \frac{V_{max} C_A}{K_m + C_A} = \frac{4.5226 \times 10^{-3} C_A}{2.541 + C_A} \quad (3.3)$$

La comparación de los datos de velocidad obtenidos a partir de las cinéticas con respecto al modelo cinético se muestra en la Figura 3.34.

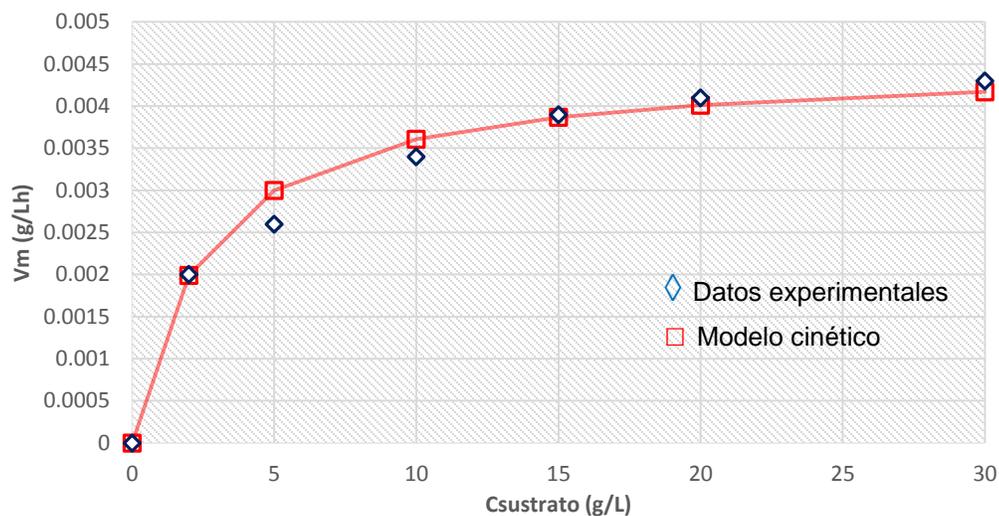


Figura 3.34 Comparación de datos de velocidades con respecto al modelo cinético para celulasas

La Figura 3.34 muestra que el modelo cinético se ajusta a los datos experimentales, lo que comprueba la idoneidad del modelo, por lo consiguiente la actividad enzimática celulasa refleja un comportamiento Michaeliano, en la cual se observa la formación de la curva de saturación.

En comparación con lo obtenido por Dueñas *et al.*, (2008) quienes obtuvieron enzimas celulasas y xilanasas por extracción en corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) determinando por SMF con CMC a concentraciones de 0.01 a 2 mg/mL en acetato sodio-ácido acético 100 mM, obtuvieron valores cinéticos para las celulasas de $K_m=0.279$ mg/mL, $V_{max}=0.00014$ UI. En este trabajo se obtuvieron valores de 2.54 g/L (2.54 mg/mL) y 4.5226×10^{-3} g/Lh (0.041839 UI), por consiguiente los parámetros cinéticos obtenidos en esta investigación muestran que el extracto enzimático crudo es factible de ser aprovechado en hidrolisis enzimática, sin embargo el realizar etapas de purificación subsecuentes, mejoraría su capacidad hidrolítica.

Marín (2007) obtuvo enzimas celulasas a partir de una bacteria de origen antártico, determinando sus parámetros cinéticos por SMF con CMC a rangos de concentración de 0.1 a 10 mg/mL manteniendo el pH 7 y 40°C encontrando valores de $K_m=10.8$ mg/mL, $V_{max}=357$ UI/mL y $K_{cat}=5.6 \times 10^{-3}$ s⁻¹. En este trabajo se obtuvieron por SMF con CMC valores de $K_m=2.54$ g/L (2.54 mg/mL), $V_{max}=4.5226 \times 10^{-3}$ g/Lh (0.041839 UI) y $K_{cat}=0.102524$ min⁻¹ (1.7087×10^{-3} s⁻¹), como se puede observar el valor de K_{cat} obtenido en este trabajo es menor al reportado por Marín (2007), lo que implica que la enzima requiere que el sustrato este menor tiempo en el centro activo para lograr convertirlo en producto, los valores de K_m y V_{max} implican que la enzima requiere mayor tiempo para llegar a la saturación en el cual no existan centros activos libres.

3.8.2 Determinación de K_m , V_{max} y K_{cat} en extracto crudo con actividad xilanasas

La determinación de los parámetros cinéticos se realizó en base a diferentes cinéticas con diferentes concentraciones de sustrato (xilano) (Figura 3.35).

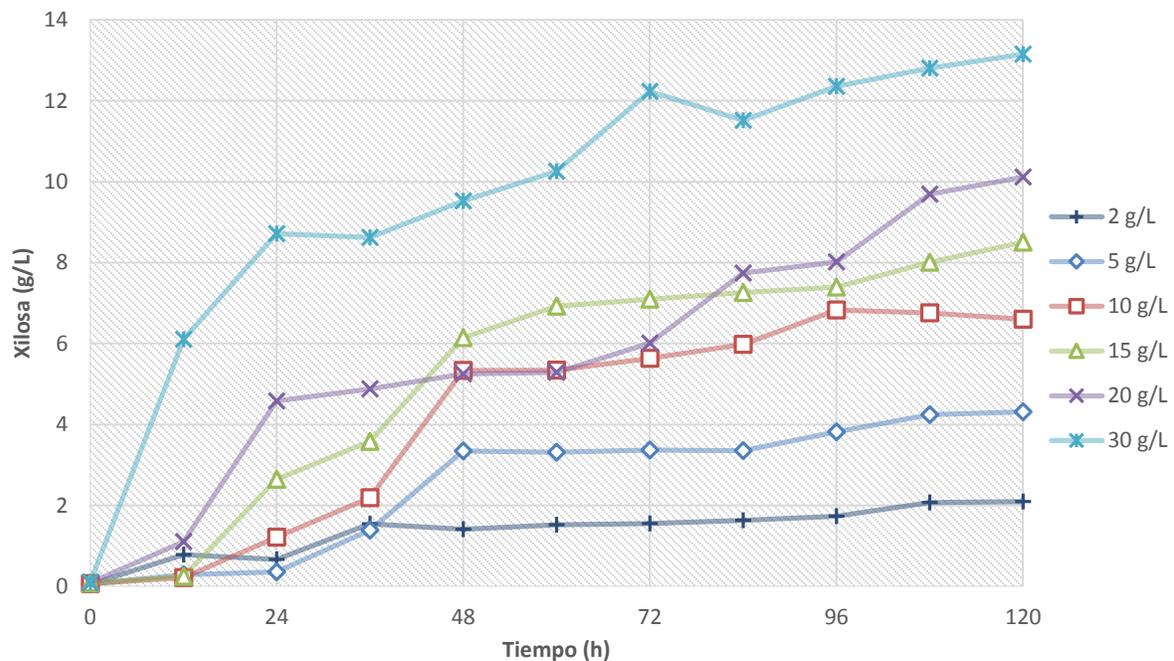


Figura 3.35 Formación de producto a diferentes concentraciones de sustrato (xilano)

La Figura 3.35 muestra la cinética de reacción de formación de producto (xilosa), a las diferentes concentraciones de sustrato empleadas en función del tiempo. A medida que la reacción ocurre, la velocidad de acumulación disminuye debido al consumo de sustrato de la reacción. La máxima concentración de xilosa (13.15 g/L) se alcanzó con 30 g/L de (Xilano).

Con base a los resultados de producto (Xilosa (g/L)) obtenidos a partir de las diferentes cinéticas a diferentes concentraciones de sustrato se determinó la velocidad de reacción V_m con ayuda del programa Matlab 2013^a, con los cuales se construyeron los diferentes gráficos de velocidades para cada una de las concentraciones a diferentes tiempo de reacción (Figura 3.36).

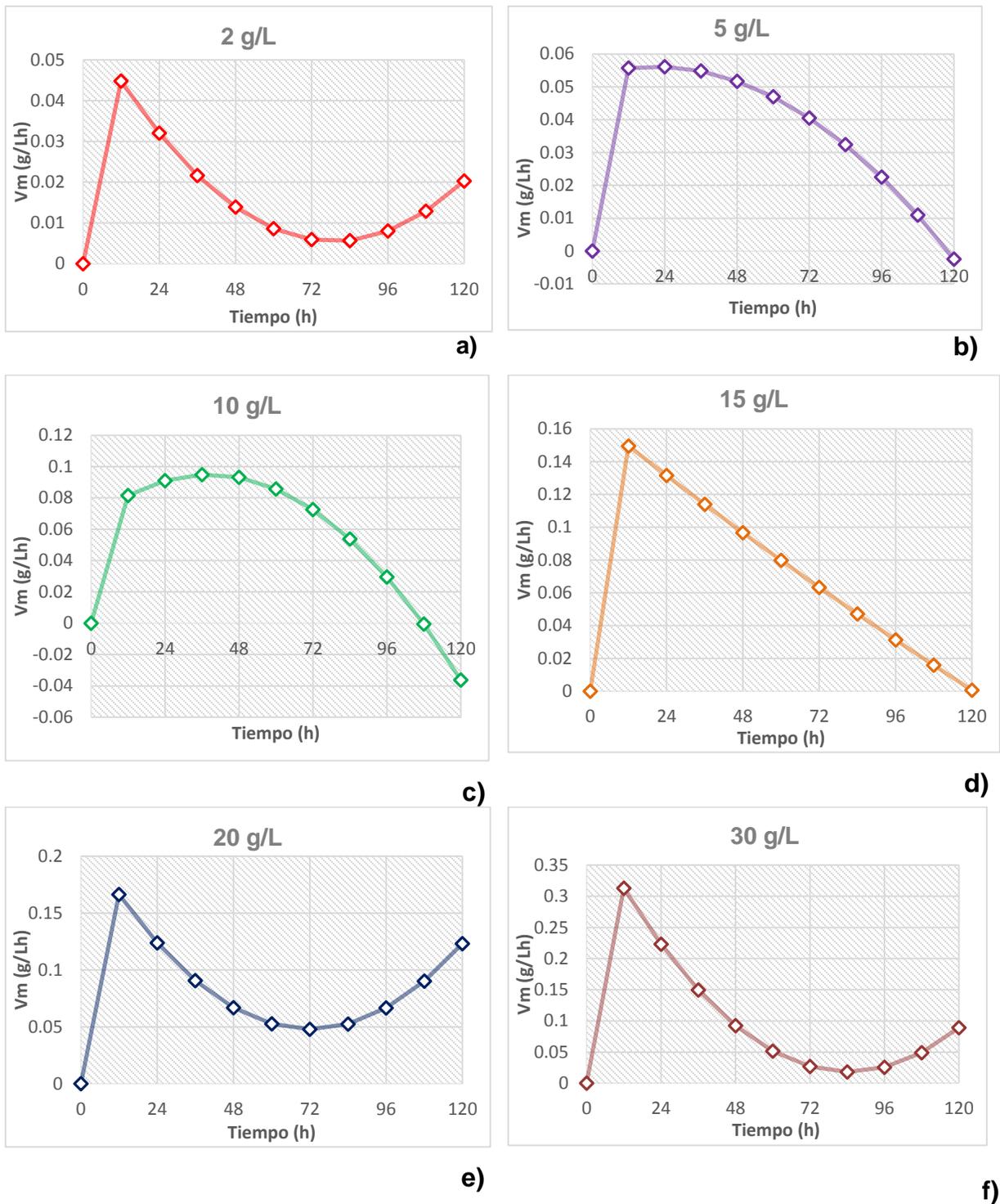


Figura 3.36 Velocidades medias a diferentes concentraciones de sustrato (Xilano)

Como se observa en la Figura 3.36 a), b), d), e) y f) la máxima velocidad se obtuvo a las 12 h de reacción, a diferencia de la Figura 3.36 c) en donde la máxima velocidad se obtuvo a partir de las 36 h de reacción. Los gráficos muestran los diferentes tiempos de reacción en que la enzima alcanzó la velocidad máxima en la que puede trabajar, debido a la falta de sitios activos libres, por lo tanto el sustrato debe esperar para lograr llegar a un sitio activo y ser transformado a glucosa, lo que provoca la sobresaturación.

En la Tabla 3.8 se muestran las velocidades máximas de reacción para cada concentración de sustrato, para la construcción del gráfico de Lineweaver-Burk.

Tabla 3.8 Velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sustrato (Xilano)

$C_{Sustrato}$ (g/L)	V_m (g/Lh)	$\frac{1}{C_{Sustrato}}$ (g/L)	$\frac{1}{V_m}$ (g/Lh)
2	0.0448	0.5000	22.3214
5	0.0561	0.2000	17.8253
10	0.0949	0.1000	10.5374
15	0.1494	0.0667	6.6934
20	0.1663	0.0500	6.0132
30	0.3128	0.0333	3.1969

La Figura 3.37 muestra la ecuación para el cálculo de K_m , V_{max} y K_{cat} a partir de la ecuación de Lineweaver-Burk (Ec. 2.2). En base a la ecuación de Lineweaver-Burk, los valores aparentes (debido a que el extracto no es purificado) de K_m , V_{max} y K_{cat} fueron 11.2948 g/L, 0.2967 g/Lh y 0.16434 min^{-1} respectivamente.

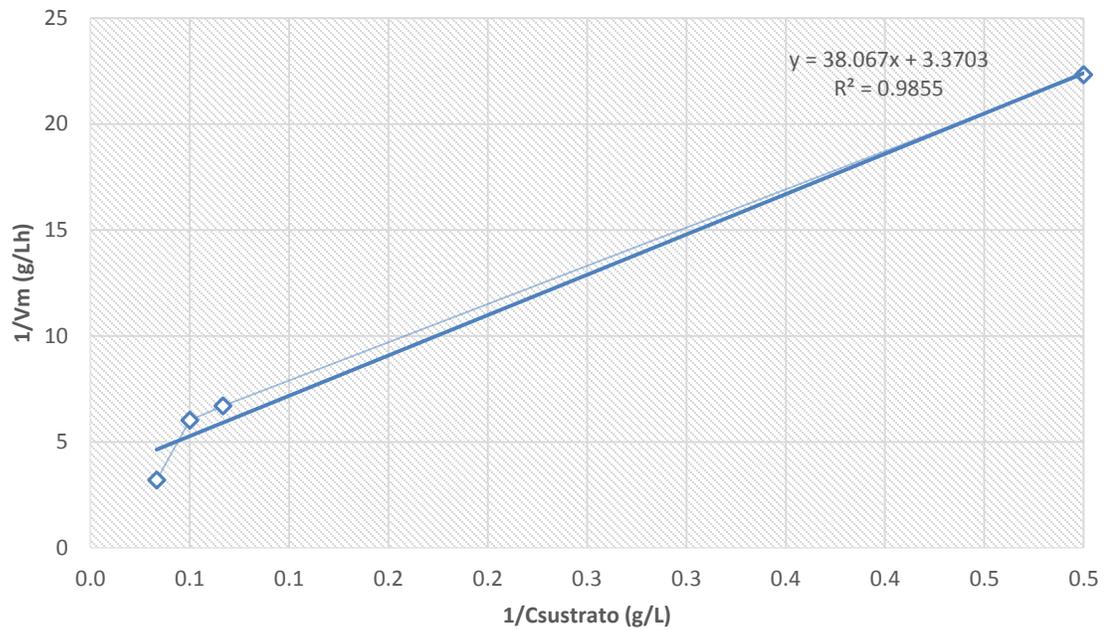


Figura 3.37 Regresión lineal en base al modelo de Lineweaver-Burk para xilanasas

Con base a los valores de los parámetros cinéticos obtenidos el modelo cinético obtenido queda de la siguiente manera (ecuación 3.4).

$$V_m = \frac{V_{\max} C_A}{k_m + C_A} = \frac{0.2967 C_A}{11.2948 + C_A} \quad (3.4)$$

La comparación de los datos de velocidad obtenidos a partir de las cinéticas con respecto al modelo cinético se muestra en la Figura 3.38.

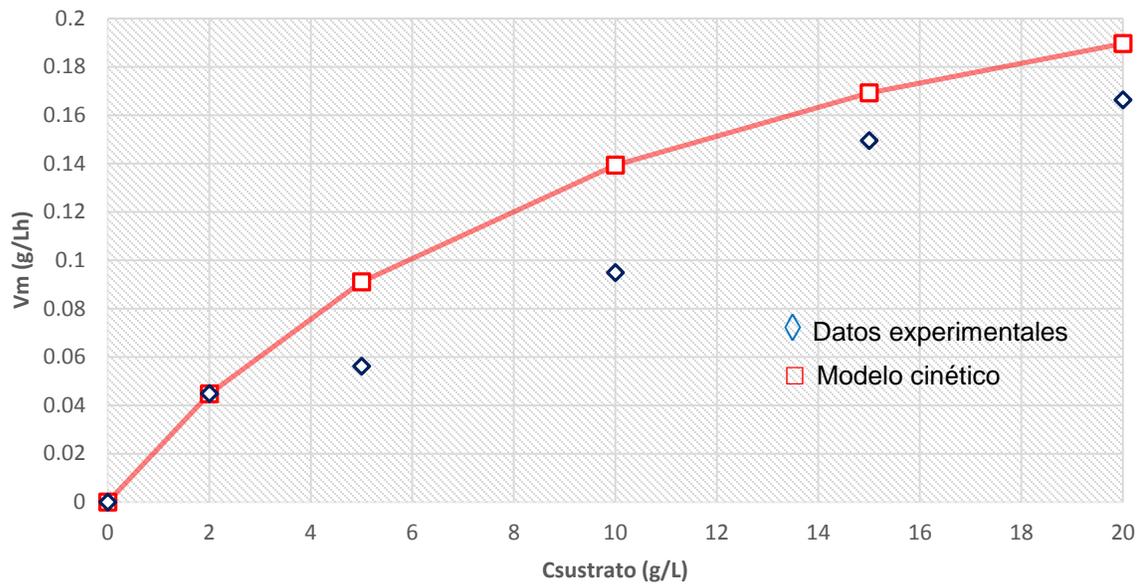


Figura 3.38 Comparación de datos de velocidades con respecto al modelo cinético para xilanasas

La Figura 3.38 muestra que el modelo cinético y los datos experimentales tienen la misma tendencia sin embargo no poseen el mismo comportamiento poseen un % de desviación entre 11% y 30% con respecto a los datos obtenidos por el modelo cinético, esto puede deberse al hecho de que hay enzimas que no obedecen la ecuación de Michaelis-Menten. Estas enzimas alostéricas cuya gráfica no es una hipérbola sino una sigmoide, que se explica en grandes variaciones en la velocidad de reacción debido a que a diferentes concentraciones de sustrato.

En comparación con lo reportado por Dueñas *et al.*, (2008) obtuvieron enzimas celulasas y xilanasas por extracción en corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) determinando por SMF en xilano a concentraciones de 0.006 a 2 mg/mL en acetato sodio-ácido acético 100 mM valores cinéticos para xilanasas de $K_m=0.073$ mg/mL y $V_{max}=0.0011$ UI. En este trabajo empleando el extracto enzimático crudo en SMF con xilano se obtuvieron valores de $K_m=11.2948$ g/L (11.2948 mg/mL) y $V_{max}=0.2967$ g/Lh (2.7448 UI), estos valores implican que la enzima requiere mayores cantidades de sustrato para llegar a la saturación.

Valenzuela *et al.*, (2012) emplearon xilanasas recombinantes codificadas como Xyn30D y Xyn-CM en SMF con xilano de beechwood como sustrato obtuvieron valores de $K_m=14.72$ mg/mL, $K_{cat}=1,510$ min⁻¹ y $K_m=11.2948$ mg/mL, $K_{cat}=2.024$ min⁻¹, respectivamente. En este trabajo empleando el extracto con actividad xilanasa por SMF se obtuvieron valores de $K_m=11.2948$ g/L (11.2948 mg/mL) y $K_{cat}=0.16434$ min⁻¹ estos valores son similares a los de ambas cepas, pero coincide con los valores reportados para la cepa Xyn-CM, lo que demuestra que el extracto enzimático posee capacidad de hidrólisis de xilano y el centro activo de las enzimas requiere de menor tiempo para la conversión de sustrato a producto.

3.9 Determinación de parámetros cinéticos por fermentación con bagazo de sorgo

A cada tipo de extracto crudo se le realizó la determinación de parámetros cinéticos K_m , V_{max} y K_{cat} por fermentación con bagazo de sorgo con diferentes tratamientos, para el caso de la determinación de actividad celulasa se empleó bagazo hidrolizado ácido-alcalino y para la actividad xilanasa se empleó bagazo tratamiento alcalino. Se determinó con base a diferentes concentraciones de sustrato las diversas velocidades de reacción (V_m) con ayuda del programa Matlab 2013a.

3.9.1 Determinación de K_m , V_{max} y K_{cat} en extracto crudo con actividad celulasa

Los parámetros cinéticos K_m , V_{max} y K_{cat} se determinaron con la realización de diferentes cinéticas variando la concentraciones de sustrato en este caso bagazo de sorgo ácido-alcalino este tratamiento permitió que la enzima tenga acceso a la celulosa del material lignocelulósico, la toma de muestra se realizó cada 12 h por 5 días, manteniendo pH, temperatura y agitación constantes, se determinó la formación de producto (glucosa (g/L)) mediante el reactivo DNS (Figura 3.39).

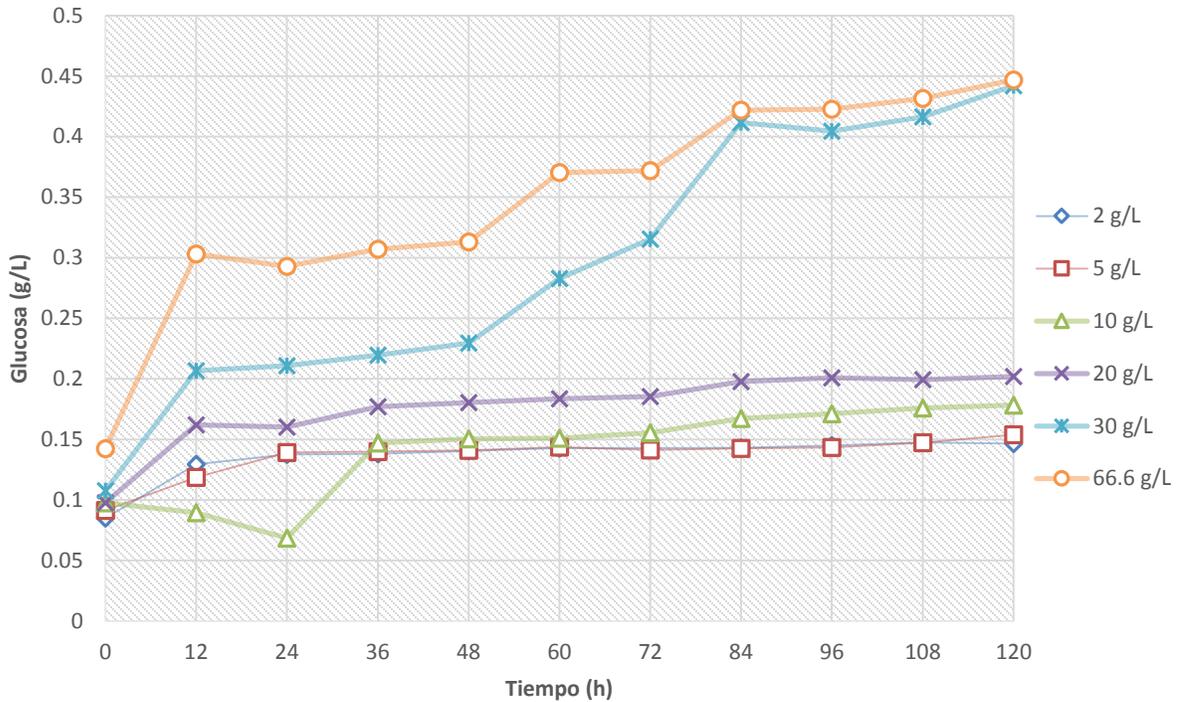


Figura 3.39 Formación de producto a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo ácido-alcalino)

La Figura 3.39 muestra la cinética de reacción a diferentes concentraciones de sustrato en función del tiempo, en donde se observa que a medida que aumenta la concentración del sustrato aumenta la velocidad de reacción. La máxima concentración de glucosa (0.447 g/L) se obtuvo con 66.6 g/L de (bagazo de sorgo ácido-alcalino).

Las diferentes determinaciones de glucosa (g/L) se emplearon para la determinación de las velocidades de reacción (V_m) en el programa Matlab 2013a (Figura 3.40).

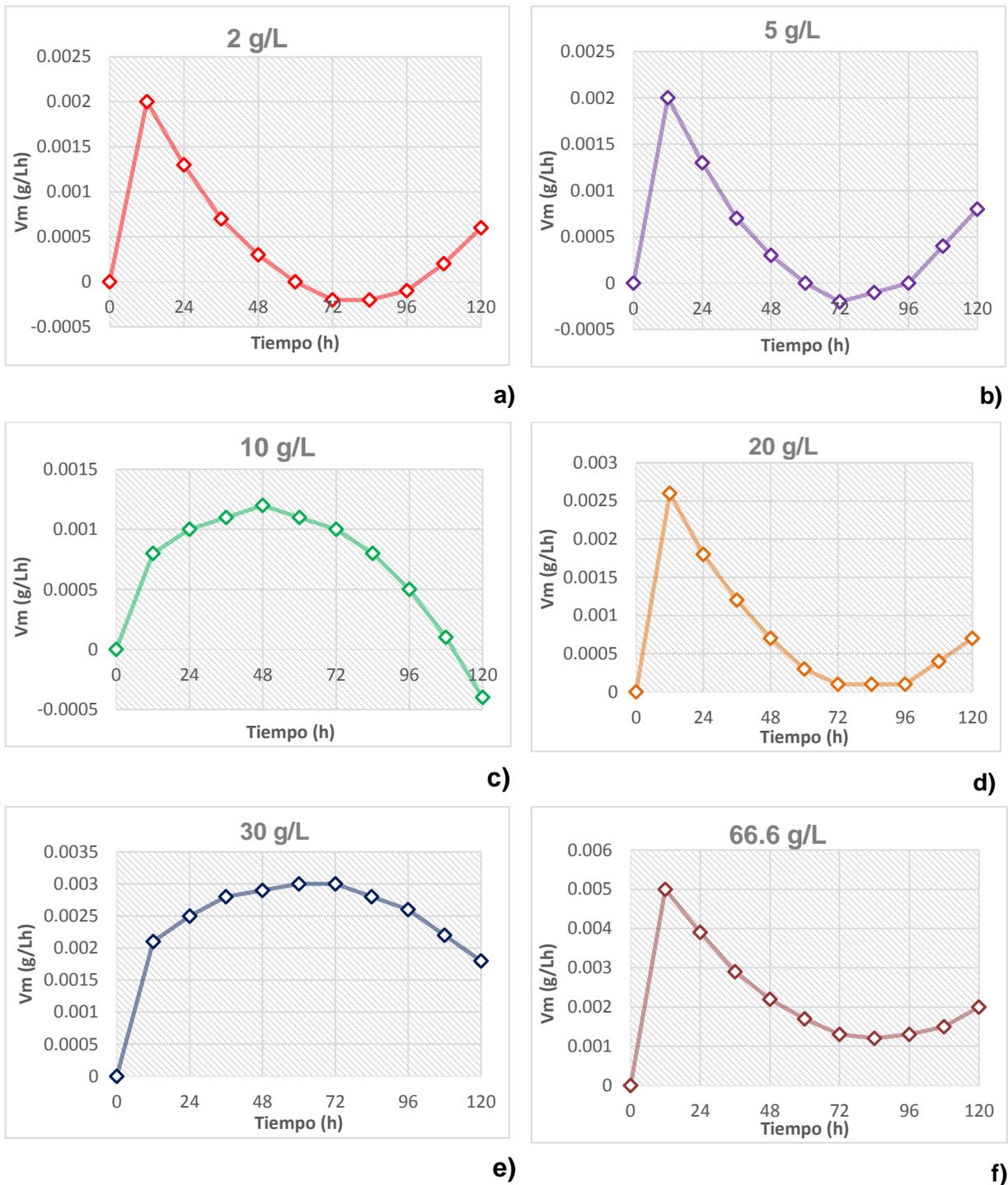


Figura 3.40 Velocidades medias a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo ácido-alcalino)

La Figura 3.40 a), b), d) y f) la máxima velocidad se obtuvo a las 12 h de reacción, a diferencia de la Figura 3.40 c) en donde la máxima velocidad se obtuvo a partir de las 48 h de reacción y la Figura 3.40 e) que la máxima velocidad de reacción la obtuvo a las 60 h de reacción. Lo anterior es debido a que la enzima alcanza su velocidad máxima al llegar al punto de saturación del medio en el cual no hay suficientes sitios activos libres para lograr la transformación del sustrato al producto.

La Tabla 3.9 muestran las velocidades de reacción para cada concentración de sustrato (bagazo de sorgo ácido-alcalino) empleadas para la determinación de K_m , V_{max} y K_{cat} .

Tabla 3.9 Velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo ácido-alcalino)

$C_{Sustrato}$ (g/L)	V_m (g/Lh)	1	1
		$C_{Sustrato}$ (g/L)	V_m (g/Lh)
2	0.002	0.5000	500.0000
5	0.002	0.2000	500.0000
10	0.0012	0.1000	833.3333
20	0.0026	0.0500	384.6154
30	0.003	0.0333	333.3333
66.6	0.005	0.0150	200.0000

En base a la ecuación de Lineweaver-Burk se muestra en la Figura 3.41, los valores aparentes (debido a que el extracto no es purificado) de K_m , V_{max} y K_{cat} fueron 0.898 g/L, 2.893×10^{-3} g/Lh y $6.558 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ respectivamente.

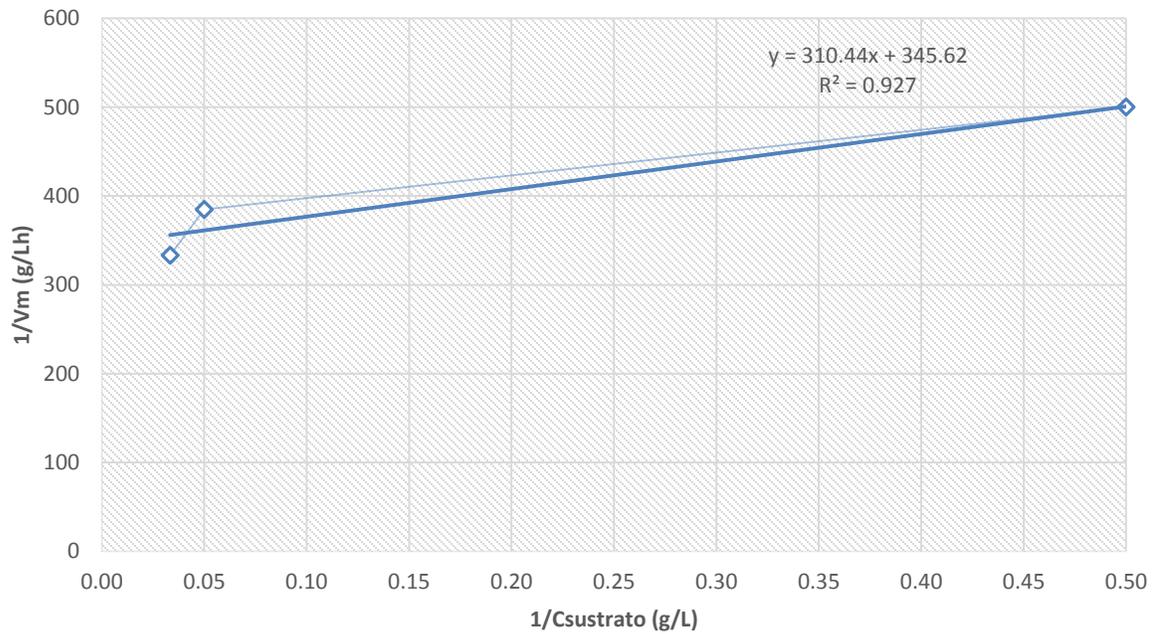


Figura 3.41. Regresión lineal en base al modelo de Lineweaver-Burk para celulasas enSSF

Con base a los datos experimentales el modelo cinético obtenido se muestra en la Ec. 3.5.

$$V_m = \frac{V_{\max} C_A}{k_m + C_A} = \frac{2.893 \times 10^{-3} C_A}{0.898 + C_A} \quad (3.5)$$

La comparación de los datos de velocidad obtenidos a partir de las cinéticas con respecto al modelo cinético se muestra en la Figura 3.42.

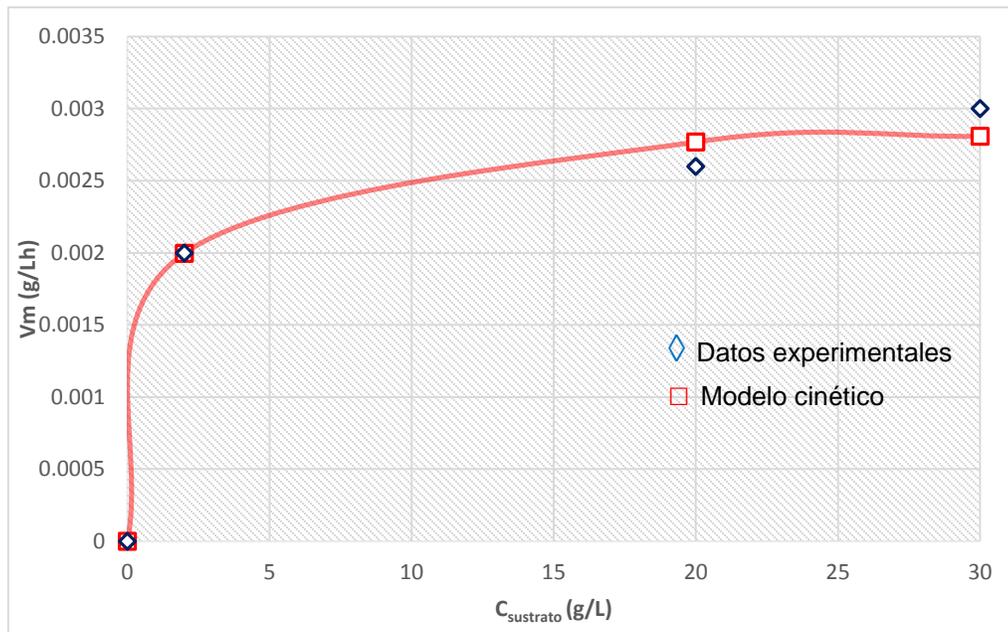


Figura 3.42 Comparación de datos de velocidades con respecto al modelo cinético para celulasas en bagazo de sorgo ácido-alcálido

La Figura 3.42 muestra que los datos experimentales y el modelo cinético muestran similitud, lo que demuestra la idoneidad del modelo, por lo consiguiente la actividad enzimática celulasa refleja un comportamiento Michaeliano, el cual se observa en la formación de la curva de saturación.

3.9.2 Determinación de K_m , V_{max} y K_{cat} en extracto crudo con actividad xilanasa

En base a los datos obtenidos de las cinéticas a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo alcálido) (Figura 3.43).

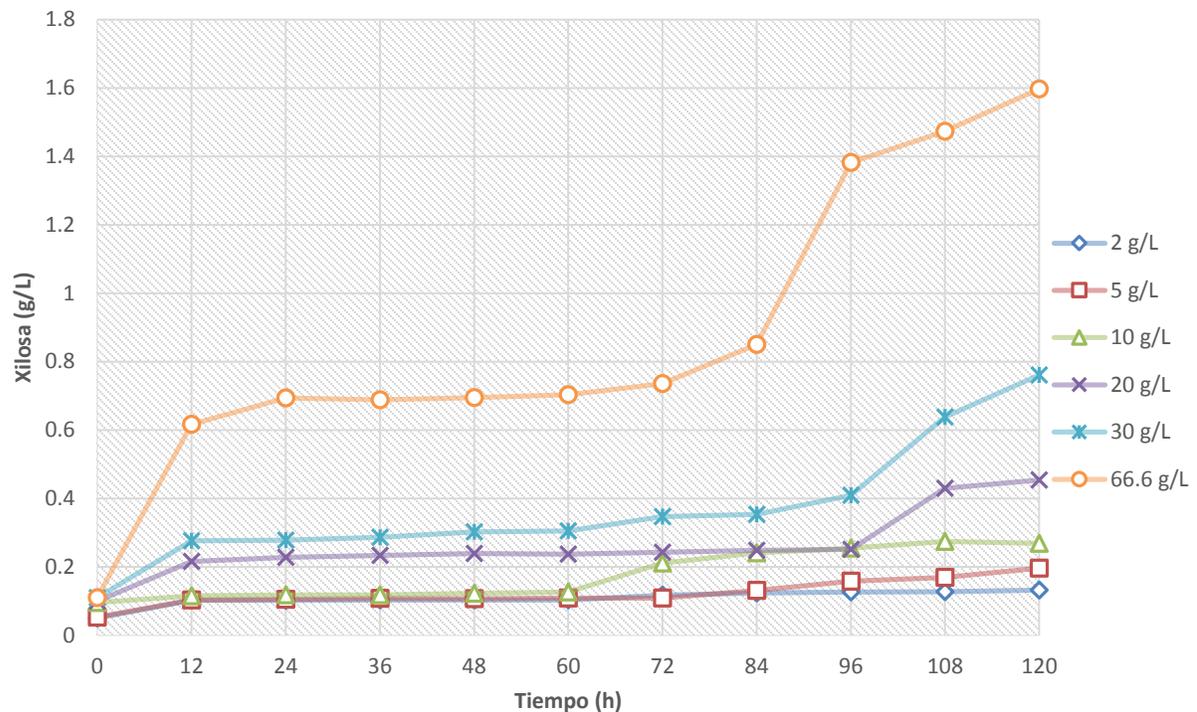


Figura 3.43 Formación de producto a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo alcalino)

La cinética de reacción se muestra en la Figura 3.43 en donde se observa la formación de producto (xilosa) en función del tiempo de reacción, a diferentes concentraciones de sustrato, la velocidad de acumulación disminuye debido al consumo de sustrato de la reacción. La máxima concentración de xilosa (1.59 g/L) se obtuvo con 66.6 g/L de bagazo de sorgo alcalino. Cada valor de la formación de xilosa (g/L) para cada una de las concentraciones de sustrato empleadas se utilizó para la determinación de las velocidades de reacción (V_m) en el programa Matlab 2013a (Figura 3.43).

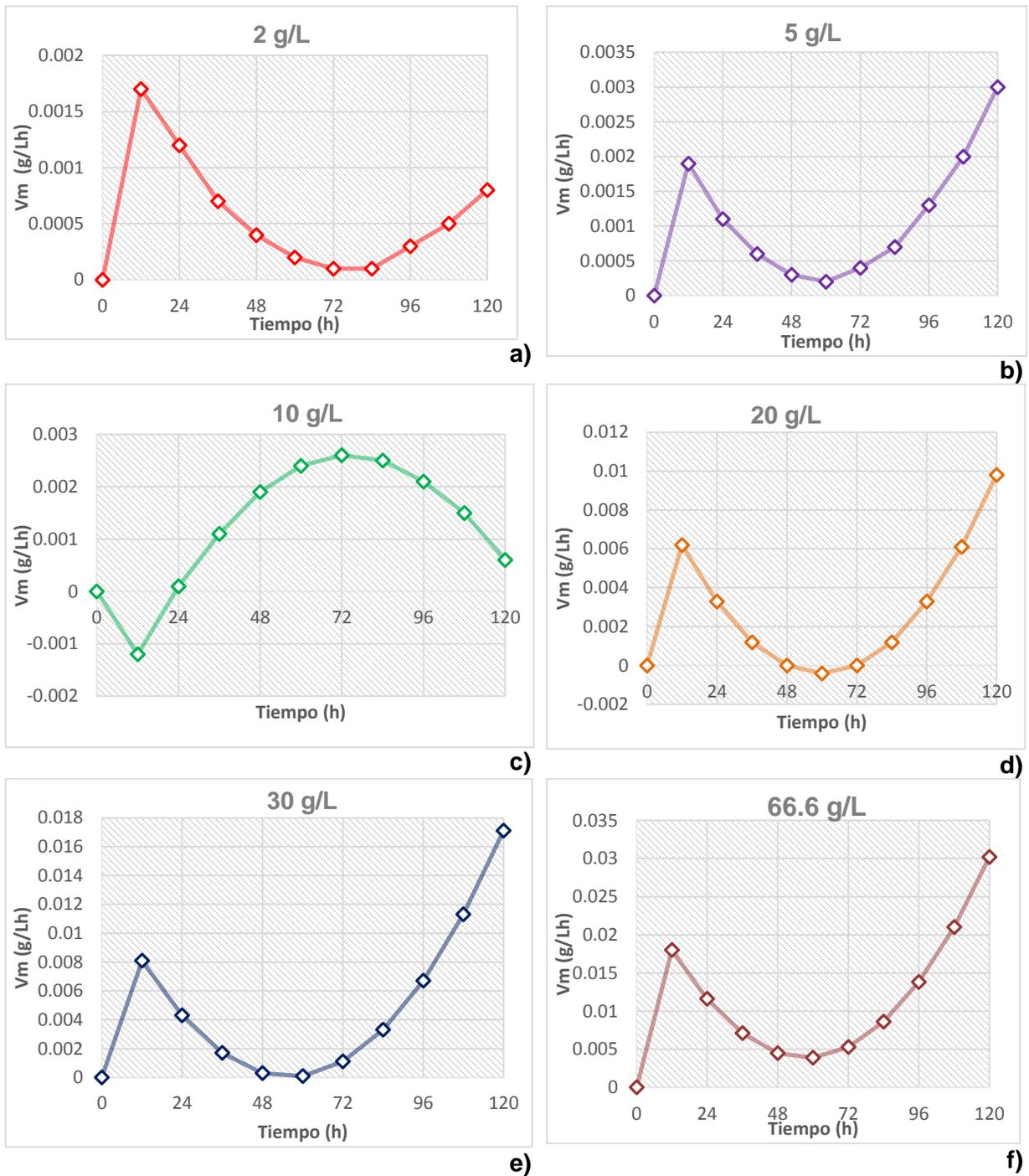


Figura 3.44 Velocidades medias a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo alcalino)

La Figura 3.44 a) la máxima velocidad se obtuvo a las 12 h de reacción, a diferencia de la Figura 3.44 b), d), e) y f) en donde la máxima velocidad se obtuvo a partir de las 120 h de reacción y la Figura 3.44 c) que la máxima velocidad de reacción la obtuvo a las 72 h de reacción. Estas variaciones de velocidades se presentan al alcanzar la velocidad máxima de reacción en donde la enzima llegó al punto de saturación en el cual no existen sitios activos libres y el sustrato debe esperar hasta poder ser transformado en producto.

La Tabla 3.10 muestran las velocidades de reacción para cada concentración de sustrato (bagazo de sorgo alcalino).

Tabla 3.10 Velocidades de reacción a diferentes concentraciones de sustrato (bagazo de sorgo alcalino)

C_{Sustrato} (g/L)	V_m (g/Lh)	1	
		C_{Sustrato} (g/L)	V_m (g/Lh)
2	0.0017	0.5000	588.2353
5	0.003	0.2000	333.3333
10	0.0026	0.1000	384.6154
20	0.0098	0.0500	102.0408
30	0.0171	0.0333	58.4795
66.6	0.0302	0.0150	33.1126

Usando la ecuación de Lineweaver-Burk se muestra en la Figura 3.45, los valores aparentes (debido a que el extracto no es purificado) de K_m , V_{max} y K_{cat} fueron 28.2898 g/L, 0.0247 g/Lh y 0.01368 min^{-1} respectivamente.

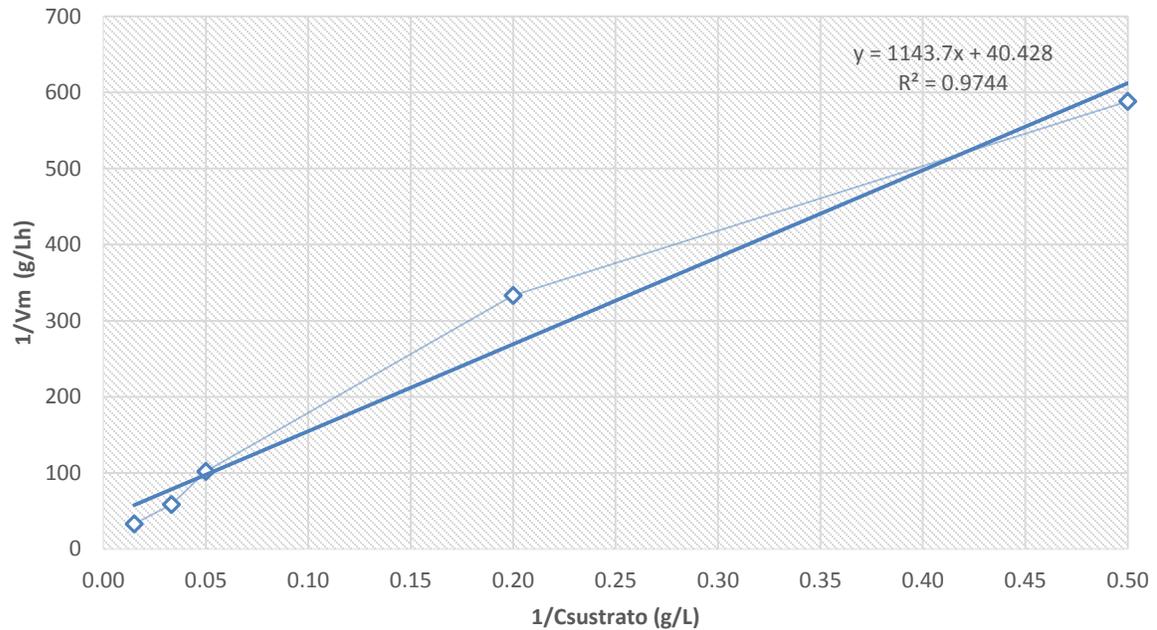


Figura 3.45 Regresión lineal en base al modelo de Lineweaver-Burk para xilanasas en SSF

El modelo cinético obtenido queda de la siguiente manera (ecuación 3.6).

$$V_m = \frac{V_{\max} C_A}{k_m + C_A} = \frac{0.0247 C_A}{28.2898 + C_A} \quad (3.6)$$

La comparación de los datos de velocidad obtenidos a partir de las cinéticas con respecto al modelo cinético se muestra en la Figura 3.46.

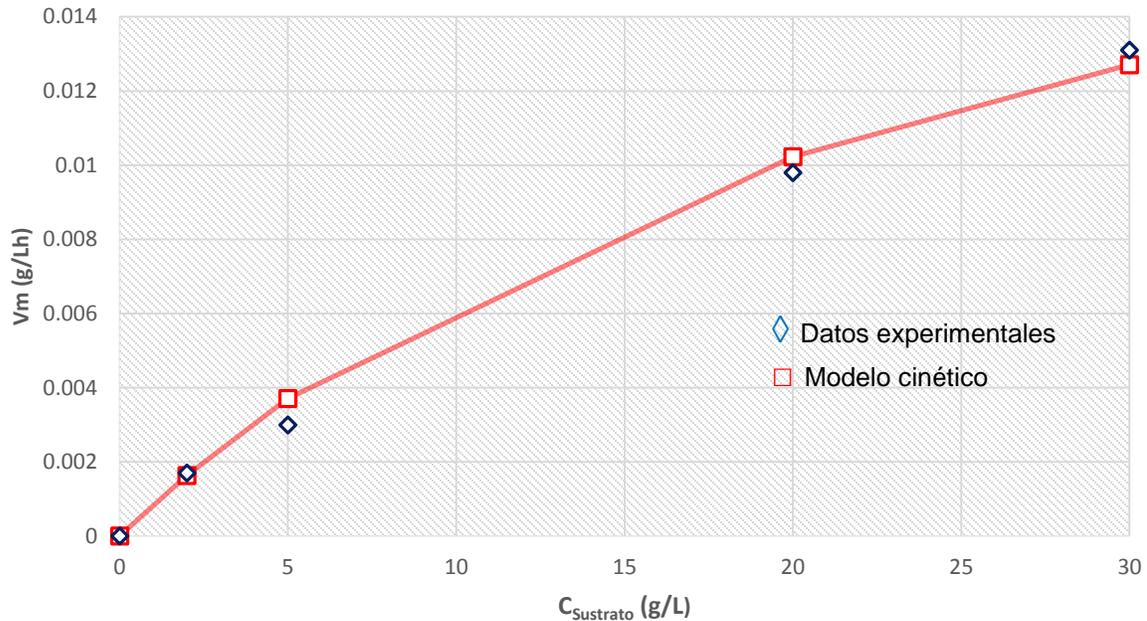


Figura 3.46 Comparación de datos de velocidades con respecto al modelo cinético para xilanasas en bagazo de sorgo alcalino

La Figura 3.46 muestra que los datos experimentales y el modelo cinético son similares, lo que demuestra la idoneidad del modelo. Debido a la similitud de los datos experimentales con el modelo cinético el comportamiento es de tipo Michaeliano, el cual se observa en la formación de la curva de saturación.

Salcedo *et al.*, (2012) empleando un preparado enzimático de mezclas de enzimas comerciales donadas por Genecor® International. Las cuales tuvieron las siguientes actividades: Celulasa 27.53 UFP /ml, Endoglucanasa 1782.1 CMC/ml, Exoglucanasa 0.37 UI/ml, β -glucosidasa 550 p NPG U/ml, Xilanasas 28.23 UI/ml, Galactosidasa 7.11 UI/ml, Mananasa 2.76 UI/ml, Ramnosidasa 14.63 UI/ml., determinaron los parámetros cinéticos por fermentación con bagazo de caña por SSF en relación de enzima-sustrato (E/S) de 1.5, 0.75, 0.5, 0.375, 0.25, 0.187 y 0.125 manteniendo el

pH 4.2 y 50°C, obtuvieron valores de $K_m=20.37$ g/L y $V_{max}=39$ g/Lh. En este trabajo se obtuvieron valores de $K_m=0.899$ g/L, $V_{max}=2.893 \times 10^{-3}$ g/Lh, para actividad celulasa y de $K_m=28.2898$ g/L, $V_{max}=0.0247$ g/Lh en actividad xilanasa, ambas obtenidas por SSF con bagazo de sorgo. Los valores obtenidos son menores a los reportados por Salcedo *et al.*, (2012) debido a que el extracto enzimático no ha sido purificado, sin embargo en la actividad xilanasa se obtuvo un valor similar de K_m , es posible que al realizar la purificación de ambos extractos pueden ser empleados en conjunto debido a que ambos extractos trabajan bajo condiciones similares de operación, temperatura y pH.

Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de la ecuación de Lineweaver-Burk para los diferentes tipos de sustrato empleados para determinar los diferentes modelos cinéticos se muestra en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11 Valores aparentes de K_m , V_{max} y K_{cat} de extractos enzimáticos crudos con actividad celulasa y xilanasa

Actividad	Medio sintético		Bagazo de sorgo	
	Celulasa	Xilanasa	Celulasa	Xilanasa
Sustrato	CMC	Xilano	Celulosa	Celulosa Hemicelulosa
Lineweaver-Burk	$y = 561.89x + 221.11$	$y = 38.067x + 3.3703$	$y = 310.44x + 345.62$	$y = 1143.7x + 40.428$
R^2	0.9925	0.9855	0.977	0.9744
K_m aparente (g/L)	2.54	11.2948	0.898	28.2898
V_{max} (g/Lh)	4.5226×10^{-3}	0.2967	2.893×10^{-3}	0.0247
K_{cat} (min^{-1})	0.102524	0.16434	6.558×10^{-3}	0.01368

La Tabla 3.11 se muestra la ecuación empleada para el cálculo de K_m , V_{max} por Lineweaver-Burk y K_{cat} calculada en base a la ecuación 2.5. El extracto con actividad celulasa presento valores de K_m de 2.54 g/L y 0.898 g/L, los valores de K_m pequeños indican que la enzima requiere de pequeñas cantidades de sustrato para llegar a la

saturación. Por lo tanto, la velocidad máxima de la enzima se alcanza a concentraciones de sustrato relativamente bajas. El extracto con actividad xilanasa presento valores de K_m de 11.2948 g/L y 28.2898 g/L, los valores grandes de K_m indican la necesidad por altas concentraciones de sustrato para lograr la velocidad de reacción máxima.

El valor de K_{cat} obtenido por las celulasas en SMF fue de $0.102524 \text{ min}^{-1}$ y en SSF de $6.558 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, estos valores implican el número máximo de moléculas de sustrato que cada centro activo de la enzima es capaz de transformar en producto (glucosa) por unidad de tiempo, por tal motivo a menores valores de tiempo indican que los centros activos trabajan rápidamente para la transformación del sustrato a producto. El valor obtenido de K_{cat} para las xilanasas por SMF fue de 0.16434 min^{-1} y en SSF de 0.01368 min^{-1} , estos valores son mayores a las obtenidas en la actividad celulasa lo que implica que a los centros activos de la enzima le toma un tiempo mayor el poder transformar el sustrato a producto (xilosa).

CONCLUSIONES

Aislamiento y selección

Se emplearon muestras de bagazo de caña, bagazo de sorgo y residuos de madera, cada uno seleccionado con respecto al grado de descomposición y presencia de hongos. En el caso de la madera se emplearon cortezas de árboles con crecimiento de hongos, todas las muestras se etiquetaron con su lugar de origen y fecha de recolección. Posteriormente incubaron las muestras en agua peptonada para obtener crecimiento de los diferentes microorganismos presentes en cada muestra, se realizó el crecimiento en placa en medios selectivos, las colonias diferentes se resebraron hasta obtener sepas puras. Se obtuvieron un total de 96 cepas, de las cuales 49 en CMC y 47 en xilano, la selección primaria permitió la diferenciación cualitativa de capacidad de hidrólisis en medio sólido con la prueba de rojo Congo, donde solo las mejores cepas fueron seleccionadas en esta etapa, un total de 21 en CMC y 24 en xilano pasaron a la selección cuantitativa o selección secundaria en fermentación sumergida (SMF).

Caracterización cinética de producción de enzimas

Las mejores cepas obtenidas de la selección primaria pasaron a la etapa cuantitativa de selección en SMF. Se realizaron las cinéticas de crecimiento y desarrollo de cada microorganismo en un término de 120 h para hongos y 72 h para bacterias, se evaluó de forma cuantitativa la producción de azúcares reductores (glucosa y xilosa). Las mejores cepas en actividad celulasa fueron: M2H10, M2H5 y MH19 con 0.6312 g/L, 0.36 g/L y 0.46 g/L, respectivamente. Las mejores cepas en actividad xilanasa fueron: MH1-a2, M2H10 y C-a1 con 3.96 g/L, 3.75 g/L y 3.18 g/L, respectivamente. Las mejores cepas pasaron a la prueba en SSF en bagazo de sorgo, para determinar actividad celulasa se probó en bagazo con tratamiento ácido-alcalino logrando la eliminación de lignina y hemicelulosa quedando expuesta la celulosa del material lignocelulósico, para actividad xilanasa se empleó bagazo con tratamiento alcalino donde se eliminó la lignina y se dejó expuesto la celuloso–hemicelulosa del material

lignocelulósico, el material se preparó en relación sólido-líquido (1:2) la cinética se realizó de tipo destructiva para facilitar la toma de muestra debido al bajo contenido de humedad. Las tres cepas evaluadas para cada actividad fueron M2H10, M2H5, MH19 (hongos con actividad celulasa) con 0.5316 g/L, 0.735 g/L y 0.328 g/L, respectivamente y MH1-a2, M2H10, C-a1 (Hongos con actividad xilanasa) con 4.376 g/L, 3.009 g/L y 1.74 g/L, respectivamente. El extracto enzimático para cada actividad se obtuvo por SSF empleando la mejor cepa de cada actividad, el extracto enzimático de actividad celulasa se obtuvo de la cepa M2H5 y el extracto con actividad xilanasa se obtuvo a partir de la cepa MH1-a2.

Efecto de pH y temperatura del extracto enzimático

Cada extracto enzimático obtenido se evaluó manteniendo el pH constante para determinar temperatura o en su caso manteniendo la temperatura constante para evaluar el pH las cinéticas se realizaron en SMF. Para determinar el pH óptimo de actividad se mantuvo la temperatura de trabajo a 30 °C debido a que esta era la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos, una vez determinado el pH óptimo para cada actividad se evaluaron los rangos de temperatura. Para el extracto con actividad celulasa se encontró que a pH 4 y 5 a 50°C se obtiene la mayor actividad de 1.36 (UI/mL), en tanto que para el extracto con actividad xilanasa, las mejores condiciones se determinaron a pH 5 a 5.5 y una temperatura de 50 °C, con una actividad enzimática de 8.93 (UI/mL). Ambos tipos de extractos enzimáticos crudos trabajan a rangos similares de pH y temperatura, lo que permite su utilización en forma sinérgica.

Determinación de las mejores condiciones de operación

Las mejores condiciones a evaluar fueron la velocidad de agitación (rpm) y la concentración de extracto enzimático (mL), ambos extractos se trabajaron a pH 5 y 50°C en SMF en una concentración de 10 g/L de CMC o XIL. Se empleó un diseño de experimento 2² teniendo como variable de respuesta la producción de azúcares reductores (glucosa y xilosa). Para el extracto con actividad celulasa se obtuvo 0.48

g/L de glucosa y para el extracto con actividad xilanasa se obtuvo 6.3 g/L de xilosa. Se encontró que ambos extractos se ven afectados de forma directa con la velocidad de agitación esto debido a que el extracto mantiene mayor contacto con el sustrato a hidrolizar.

Determinación de parámetros cinéticos (K_m , V_{max} y K_{cat})

Para determinar los parámetros cinéticos de cada extracto enzimático se realizaron diversas cinéticas variando la concentración de sustrato, se tomaron muestras cada 12 h. Los parámetros cinéticos encontrados para cada extracto crudo se determinaron en base a las velocidades de reacción a partir de la formación de producto en función del tiempo, se determinó que para el extracto crudo con actividad celulasa en las pruebas realizadas con CMC se obtuvo un valor de $K_m=2.54$ g/L, $V_{max}=4.5526 \times 10^{-3}$ g/Lh y $K_{cat}=0.102524$ min⁻¹, para las realizadas en celulosa de sorgo se obtuvo un valor de $K_m=0.898$ g/L, $V_{max}=2.893 \times 10^{-3}$ g/Lh y $K_{cat}=6.558 \times 10^{-3}$ min⁻¹ lo que demuestra que la mayor afinidad de la enzima por el sustrato se presentó en el bagazo de sorgo, los valores de K_{cat} nos indican el tiempo que requiere la enzima para transformar el sustrato en producto. Para el extracto enzimático con actividad xilanasa en las pruebas realizadas con XIL se obtuvo un $K_m=11.2948$ g/L, $V_{max}=0.2967$ g/Lh y $K_{cat}=0.16434$ min⁻¹, para celulosa-hemicelulosa de sorgo se obtuvo un valor de $K_m=28.2898$ g/L, $V_{max}=0.0247$ g/Lh y $K_{cat}=0.01368$ min⁻¹, la mayor afinidad de la enzima por el sustrato se presentó en el medio con xilano. Al comparar las velocidades de reacción se tiene que las xilanasas poseen las velocidades de reacción mayores en comparación con las celulasas.

RECOMENDACIONES

Aislamiento y selección

Para el mejoramiento de la etapa de aislamiento se propone determinar el hongo específico que se quiere aislar y de esta manera mejorar la eficiencia del proceso. Al término de las diversas etapas de selección solo se obtuvieron 6 cepas capaces de producción de extractos enzimáticos, pero solamente la mejor cepa se empleó para obtener el extracto enzimático de estudio, se propone probar cada una de las cepas restantes para obtención de extracto enzimático y determinar actividad lacasa a cada una de las cepas debido a que no solamente pueden poseer un solo tipo de actividad.

Caracterización cinética de producción de enzimas

Se recomienda que los dos microorganismos en cada actividad que no pasaron a la obtención de extractos enzimáticos se probará su factibilidad en el uso sinérgico de los extractos enzimáticos de cada uno de los tres microorganismos que calificaron como cepas factibles de aprovechamiento para la producción de extractos enzimáticos crudos.

Efecto de pH y temperatura y condiciones de operación de los extractos enzimáticos.

Una vez de tener la identificación del tipo de microorganismo que se está trabajando se recomienda que a partir de datos de bibliografía se evalué su actividad de hidrólisis bajo el pH y temperatura óptimas.

Determinación de parámetros cinéticos (K_m y V_{max})

Debido a que se emplearon extractos crudos los valores de K_m , V_{max} y K_{cat} obtenidos son aparentes por lo que se recomienda realizar la purificación de los extractos y realizar nuevamente la determinación de sus valores óptimos de K_m , V_{max} y K_{cat} .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Basanta R., García M., Cervantes J.E., Mata H. y Bustos G. 2007. **Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la agroindustria azucarera: una revisión.** Redalyc. 5 (4): 293-305.

Beguín P, y Aubert J.1993. **The biological degradation of cellulose.** FEMS Microbiology Reviews. 13: 25-58.

Brink J., y Vries R. 2011. **Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation.** Appl Microbiol Biotechnol. 91: 1477-1492.

Bueno G., Cordevés M. y Delgado G. 2009. **Sorgo dulce: sus potencialidades productivas.** Redalyc. 43 (3): 15-21.

Chávez-Sifones y Domine M. 2013. **Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial.** Avances de ciencia e Ingeniería. 4 (4): 15-46.

Costa M., Torres M., Magariños H. y Reyes A. 2010. **Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales.** Revista colombiana de biotecnología. 12 (2):163-175.

Costa M., Torres M., Magariños H. y Reyes A. 2012. **Caracterización de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* producidas en fermentación sólida sobre torta de canola.** Revista colombiana de biotecnología. 1: 208-215.

Cruz M., Castellanos D. y Argúello H. 2009. **Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la Sabana de Bogotá.** Revista colombiana de ciencias hortícolas. 3 (2): 237-249.

COVECA. 2008. **Reporte anual del estado de Veracruz.** Consultado el 08 de octubre de 2014. Disponible en: http://portal.veracruz.gob.mx/portal/page?_pageid=653,1&_dad=portal&_schema=PORTAL.

Díaz. 2001. **Sector forestal en México.** Consultado 09 de octubre de 2014. Disponible en <http://www.gestiopolis.com/recursos/documentos/fulldocs/eco/secformx.htm>

Dueñas, Y.M., Narváez, E. y Sánchez, R. 2008. **Búsqueda de las mejores condiciones para la extracción y medida de actividad celulasa y xilanasa extraídas de la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*).** Acta biológica colombiana. 13 (1): 217-228.

Fanchini, C., Temer, B., Teixeira, M. y Cano, E. 2010. **Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*.** Bioresource technology. 101: 4139-4143.

Farinas C., Moitas M., Baraldo A., Tardioli P., Bertucci V. y Couri S. 2015. **Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature.** Biotechnology. 27: 810-815.

Fernández F. 2012. **Producción de xilanasas por cepas de *Aspergillus niger* en cultivo sólido sobre salvado de avena y salvado de trigo.** Tesis de maestría en ciencias y tecnología de alimentos. Universidad autónoma de Querétaro.

Fengxia L., Mei L., Zhaoxin L., Xiaomei B., Haizhen Z. y Yi W. 2008. **Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98**. Bioresource technology. 99: 5938-5941.

Ferrer-Marcelo Y., León-Rodríguez M., Michelena-Álvarez G., Dustet-Mendoza J.C., Duque-Ortiz A., Ibañez-Fuentes M. Torroló-Cabañas K. 2011. **Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales**. Redalyc. 45 (1): 3-12.

Gaitan D. M y Perez L.I. 2007. **Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema gradiflora*)**. Tesis de microbióloga industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C.

Izarra M., Santayana M., Villena G. y Gutiérrez-Correa M. 2010. **Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasa por *Aspergillus niger***. Revista colombiana de biotecnología. 12 (2): 139-150.

Lago D. y Hernández M. 2000. **Purificación y caracterización parcial de la enzima xilanasa a partir del preparado comercial Novoban 240 Cultivos Tropicales**. Redalyc. 21 (2): 27-31.

Maki M., Tn K. y Wesheng Q. 2009. **The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences***. 5 (5): 500-516.

Mandels, M. y Weber, J. 1969. **The Production of cellulases**. Adv. Chem. Series 95. 391-414.

Manjarrés, K., Piñeros, Y., Rodríguez-Sandoval, E. 2011. **Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus sp.* y *Trichoderma sp.* en fase sólida sobre residuos de palma.** Bioagro. 23 (1): 10-23.

Marín, R.M. 2007. **Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico.** Memoria para optar por el título de ingeniero civil en biotecnología. Universidad de Chile. Santiago de Chile.

Medina, D., Núñez, M. y Ordoñez, M. 2010. **Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano.** Revista tecnológica ESPOL 23 (1): 81-88.

Mikán, V. y Castellanos, S. 2004. **Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas.** Revista colombiana de biotecnología. 6 (1): 58-71.

Miller, G. 1959. **Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.** Analytical Chemistry 31:p. 426- 428.

Montoya, S. 2008. **Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del micromiceto *Grifola frondosa*.** Tesis de Maestría en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales.

Ovando-Chacón S. y Waliszewski K. 2005. **Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos.** Universidad y ciencia. 21 (42): 111-120.

Paredes, D. 2010. **Obtención de enzimas celulasas a partir de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*)**. Tesis de Ingeniería en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.

Rahman A., Sugitani N., Hatsu M, y Takamizawi K. 2003. **A role of xilanasa, alfa-L-arabinofuranosidase, and xilosidase in xylan degradation**. Canadian Journal of Microbiology. 49: 58-64.

Riaño A., Gutiérrez M. Muñoz H. y Barrero R. 2010. **Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos**. Ciencia Química. 5, 61-91.

Romero M., Moya M., Cara C., Ruiz E. y Castro E. 2009. **La poda del Olivar como fuente de energía renovable: obtención de biocombustible**. Universidad de Jaén, Congreso de Cultura del olivo.

Rubeena M., Neethu K., Sajith S., Sreedevi S., Priji P., Unni K., Sarath M., Jisha V., Pradeep S. y Sailas B. 2013. **Lignocellulolytic activities of a novel strain of *Trichoderma harzianum***. Advances in Bioscience and Biotechnology. 4: 214-221.

Sadhu S. y Kanti T. 2013. **Cellulase Production by Bacteria: A Review**. British Microbiology Research Journal. 3 (3): 235-258.

SAGARPA, 2013. **Principales estados productores. Avances de siembra y cosecha**. Consultado el 8 de octubre del 2014. Disponible en: <http://www.infoasercia.gob.mx/claridades/revistas/234/ca234-22.pdf>

Salcedo, J., Galán, J. y Pardo, L.M. 2012. **Hidrólisis enzimática de residuos de la cosecha de caña de azúcar**. Revista colombiana de biotecnología. 14 (1): 1-13.

SEMARNAT, 2012. **Anuario estadístico de la producción forestal 2012**. Consultado 9 de Octubre de 2014. Disponible en: http://web2.semarnat.gob.mx/temas/gestionambiental/forestalsuelos/Anuarios/ANUARIO_2012.pdf

SIAP, 2014. **Impactos de la caña de azúcar**. Consultado 08 de octubre de 2014. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura.aspx>.

Subramaniyam R. y Vimala R. 2012. **Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study**. *Internacional journal of science and nature*. 3 (3): 480-486.

Sugden C, y Bhat M. 1994. **Cereal straw and pure cellulose as carbon sources for growth and production of plant cell wall degrading enzymes by *Sporotrichum thermophile***. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10: 444-451.

Umsza-Guez M., Díaz A., Ory I., Blandino A., Gomes E. y Caro I. 2011. **Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace**. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42, 1585-1597.

Valenzuela, S.V. Diaz, P. y Pastor, J. 2012. **Modular glucuronoxylan-specific xylanase with family CBM35 carbohydrate-binding module**. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (11): 3923-3931.

Xing-hua L., Hua-jun., Bhaskar R., Dan W., Wan-fu Y. Li-jun J., Enoch Y., Park y Yun-gen. 2009. **The most stirring technology in future: Cellulase enzyme and biomass utilization**. *African Journal of Biotechnology*. 8 (11): 2418-2422.

Zhuang J., Marchant M., Nokes S. y Strobel H. 2007. **Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol**. American Society of Agricultural and Biological Engineers. 23 (5): 679-687.