UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS
BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

Producción de enzimas xilanolíticas por inmovilización de la bacteria FT3 anaeróbica termófila en alginato de calcio

Elaborado por:

Lic. Neida Rios Manrriquez

Asesores :

Alberto Giménez Turba Ph.D.
Enrique Terrazas Siles Ph.D.
María Teresa Álvarez Aliaga Ph.D.

La Paz – Bolivia
2011

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial a la cooperación francesa IRD, por el apoyo en realización del curso de Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas.

Este trabajo ha sido realizado gracias al soporte económico recibido de ASDI/SAREC – Suecia, en el desarrollo del Proyecto Biodiversidad Microbiana del Lago Poopó y Río Desaguadero.

Agradecer al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, por haber me acogido desde algún tiempo en la realización de este y otros trabajos.

Por toda su colaboración y enseñanza a los doctores Enrique Terrazas y María Teresa Álvarez, quienes además de asesorarme en el ámbito científico, me han brindado su amistad y apoyo incondicional, muchísimas gracias.

Quiero agradecer de forma especial a mi familia, a mi mami Polonia Manrriquez quien siempre ha sido para mí un ejemplo de valor y lucha constante en la vida, gracias mamita. A mis hermanas Melissa y Grisel por apoyarme y confiar en mí siempre; a mi linda pulguita Ilkay que aun sin saberlo es muchas veces el motivo de seguir luchando y superando las trabas que nos presenta la vida.

Así también agradecer a mi amiga incondicional Carolina, que aunque nuestras vidas hayan tomado rumbos diferentes la amistad nos mantendrá unidas siempre.

A mis amigos y compañeros de trabajo: Raquel, Roxana, Iván, Fabiola, Esther, Georgina y Alvaro, gracias por todos los momentos compartidos y por hacer nuestro lugar de trabajo un ambiente agradable lleno de confianza y amistad.

Finalmente y lo más importante, Gracias Dios mío por hacer todos mis sueños realidad y por mantenerme en el camino correcto.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN 2
CAPITULO II. ANTECEDENTES 5
1.PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS 6
2.BACTERIAS EXTREMÓFILAS 8
2.1 Bacterias Termófilas 9
3.MICROORGANISMOS ANAERÓBICOS 10
4.DESECHOS AGROINDUSTRIALES 14
4.1 Paja de trigo como Residuo Agrícola 15
4.2 Residuos agrícolas de soya 16
4.3 Cascarilla de arroz como residuo agrícola 16
4.4 Pretratamiento residuos agrícolas 17
5.ENZIMAS HIDROLÍTICAS 19
5.1Degradación de xilanos y otras hemicelulosas 19
6.XILANASAS 20
7.Sistemas de Inmovilización de células-Encapsulación en Alginato de calcio 23
8.CULTIVO CONTINUO 26
8.1Optimización 27
8.2Cultivo continuo 28
CAPITULO III. JUSTIFICACIÓN 29
CAPITULO IV. OBJETIVOS 31
1.OBJETIVO GENERAL 32
2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32
CAPITULO V. MATERIALES Y MÉTODOS 33
1.Muestras y condiciones de cultivo 34
1.1Cultivo en batch 34
1.2 Aislamiento Primario a través de las Técnicas Tradicionales y no Tradicionales 34
1.3Cultivo Continuo 35
2.Encapsulación en perlas de alginato 36
2.1Influencia de la concentración de alginato 36
3. Establecimiento del biorreactor 37
4. Optimización de las condiciones de cultivo: Fuentes de carbono y nitrógeno 37
4.1Fuente de Carbono 38
4.2 Fuente de nitrógeno 38
4.3 Diseño factorial: Optimización de las concentraciones de fuentes de carbono y nitrógeno 39
5. Optimización del sistema de encapsulación en alginato de calcio 40
6. Pretratamiento de los residuos agrícolas 40
7.DETERMINACIONES ANALÍTICAS 41
CAPITULO VI. RESULTADOS Y DISCUSION 45
1.Aislamiento y selección de la bacteria bacteriana 46
2.Caracterización morfológica, bioquímica de la bacteria FT3 46
3. Cinética de crecimiento de la bacteria FT3 47
4.Cinética de producción de las actividades hidrolíticas 48
5.Rendimiento cultivo en batch 50
6.Optimización de la encapsulación 50
7.Optimización de las condiciones de cultivo de la bacteria FT3 en relación a las fuentes de carbono y nitrógeno 51
7.1 Pretratamiento de los residuos agrícolas 52
7.2 Optimización de la fuente de carbono y Sistema de cultivo 52
7.3 Optimización de la fuente de nitrógeno y Sistema de cultivo 56
7.4 Optimización de las concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno 58
8.Cultivo continuo 60
8.1 Diseño de biorreactor 60
CAPITULO VII. CONCLUSIÓN 63
REFERENCIAS 65
ANEXOS 70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ambientes Extremófilos 8
Figura 2. Respiración anaeróbica 11
Figura 3. Gasificación del medio con nitrógeno en la Técnica de Hungate 13
Figura 4. Desarrollo de colonias en el agar, dentro de la botella 13
Figura 5. Sitios de ataque enzimático 20
Figura 6. Esquema de acción de las diferentes enzimas xilanoliticas sobre una hemicelulosa hipotética. 21
Figura 7. Composición del polímero alginato 23
Figura 8. Polimerización del alginato en presencia de Ca 2+ 24
Figura 9. Esquema general de la Técnica de Encapsulación en alginato de calcio 25
Figura 10. Formación de perlas de alginato, en constante agitación 25
Figura 11. Cámara de anaerobiosis 37
Figura12.Biorreactor con células bacterianas inmovilizadas en alginato cálcico 38
Figura 13. Reacción ácido dinitrosalicílico-azúcares reductores 41
Figura 14. Morfología de la bacteria FT3, mediante tinción Gram 47
Figura 15. Curva de crecimiento bacteria FT3 corregida con logaritmo, crecida en xilano como fuente carbono estándar 48
Figura 18. Diferencia de crecimiento de células inmovilizadas en alginato cálcico 50
Figura 19. Influencia de la concentración y viscosidad de alginato cálcico en la producción de xilanasas 51
Figura 21. Optimización del tipo de fuente de carbono en sistema de cultivo de células libres y encapsuladas 54
Figura 22. Producción de xilanasas dependiente de la relación entre la fuente de nitrógeno 57
Figura 23. Optimización de concentraciones de Fuente de Nitrógeno y Fuente de Carbono 59
Figura 24. Producción de xilanasas (♦) y producción de azucares totales (°) en cultivo. A) Cultivo continuo con células encapsuladas Fuente de Carbono xilano (2g/L) y Fuente de Nitrógeno cloruro de amonio (1g/L), B) Medio con Fuente de Carbono xilano (2g/L) y Fuente de Nitrógeno extracto de levadura (1g/L), C) cambio en la fuente de carbono residuos de soya D) Concentraciones optimizadas de residuos de soya 5 g/L y extracto de levadura 0,2 g/L 61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de paja de trigo 15
Tabla 2. Composición de residuos de soya 16
Tabla 3. Composición cascarilla de arroz 17
Tabla 4. Diseño experimental para optimizar 38
Tabla 5. Diseño experimental para optimizar -Fuente de nitrógeno 38
Tabla 6. Diseño experimental para optimizar 39
Tabla 7. Diseño factorial para la optimización de la concentración y viscosidad de alginato para la encapsulación .. 40
Tabla 8. Selección de bacteria productora de xilanasas 46
Tabla 9. Caracterización bioquímica 47
Tabla 10. Rendimiento de producción en cultivo en batch 50
Tabla 11. Optimización del tipo de Fuente de carbono en sistema de cultivo de células libres y encapsuladas 54
Tabla 12. Rendimiento de producción Optimización Fuente de Carbono 55
Tabla 13. Análisis de varianza de la relación entre la Fuente de nitrógeno y el sistema de cultivo: células libres y encapsuladas 56
Tabla 14. Rendimiento de producción Optimización fuente de nitrógeno –Células libres 58
Tabla 15. Rendimiento de producción Optimización fuente de nitrógeno –Células encapsuladas 58
Tabla 16. Optimización de concentraciones de Fuente Nitrógeno y Fuente de Carbono 59
Tabla 17. Condiciones determinadas para el funcionamiento del biorreactor 60

RESUMEN

Las xilanasas son endoglucanasas capaces de degradar xilano. Estas enzimas se pueden aplicar en varios procesos industriales como en la degradación de residuos agrícolas para obtener azucares los cuales se fermentan para producir etanol. La aplicación industrial sin embargo, requiere estabilidad principalmente a elevadas temperaturas, por ello existe gran interés en el estudio de microorganismos termófilos. En la presente investigación, se estudio la producción de xilanasas en un sistema de inmovilización con alginato de calcio de la bacteria FT3 anaeróbica termófila, aislada de la Región altiplánica de Bolivia. Los resultados muestran que en un cultivo en batch suplementado con cloruro de amonio como fuente de nitrógeno y xilano como fuente de carbono la actividad xilanolítica fue de 0,2 UI/mL, y un rendimiento de producción de 0,004 mUI de xilanasa/g de xilano. Esta actividad fue incrementada a 1,2 UI/mL (0,009 mUI/g), en cultivo en batch con células encapsuladas en alginato cálcico de alta viscosidad al 2 %. En la optimización de fuentes de carbono y nitrógeno, la actividad incrementó únicamente en el sistema de células encapsuladas, mientras que en el de células libres esto parece no influir. Es así, que las condiciones optimas de cultivo en base a las fuentes carbono y nitrógeno fueron residuos de soya y extracto de levadura, a una concentración de 5 g/L y 0,2 g/L respectivamente, obteniéndose una actividad de 1,8 UI/mL (0,1 mUI/g). El sistema inmovilizado fue ensayado en cultivo continuo que permitió la producción de la enzima libre de células. Se logró incrementar la actividad hasta 1,3 UI/mL (0,13 mUI/g). El cambio de NH_4Cl por extracto de levadura como fuente de nitrógeno en cultivo continuo incrementó la actividad enzimática en el biorreactor hasta 3,3 UI/mL (0,15 mUI/g). Así mismo el cambio de la fuente de carbono de xilano por hidrolizado de residuos de soya no incrementó la actividad enzimática, sin embargo ésta se mantuvo estable.

ABSTRACT

Xylanases are endoglucanases capable to degrade xylane. These enzymes can be applied in several industrial processes such as agricultural waste degradation for fermentable sugars production for bioethanol. However for industrial application, stability to high temperatures is needed. Therefore a great interesting in the thermophile microorganism study exist. In order to improve the xylanases production, a bacterial immobilization was tested. The strain FT3 a thermophile anaerobic bacterium was used for immobilization in calcium alginate. FT3 was isolated from the Andean region in Bolivia. According to results in batch culture with ammonia chloride and yeast extract the xylanolytic activity was 0.2 UI/mL obtained 0.004 mUI for each gram of substrate. In batch culture the best immobilisation was achieved with calcic alginate of high viscosity at 2%, improving the enzymatic activity to 1.2 IU/mL (0.009 mIU/g). In optimization of nitrogen and carbon source, increase the activity only in immobilized culture. The best carbon and nitrogen source sere soy waste and yeast extract at 5g/L and 0.2 g/L respectively, obtained 1.8 UI/mL (0.1mIU/g). When a continuous system of immobilized cells was used in order to recovery enzyme, the activity was increased to 1.3 IU/mL (0.13mIU/g). When ammonium chloride was replenished by yeast extract, the enzymatic activity was improved to 3.3 IU/mL (0.15mIU/g) in the bioreactor. The replenished of xylane for soy waste don't increase the activity only this was kept. On the other hand, the enzyme has showed stability to 80 °C and pH 8.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los avances logrados tanto en terapia médica y producción de fármacos etc., se han logrado gracias a la aplicación de microorganismos o componentes de ellos, por ejemplo el desarrollo de procesos industriales sostenibles.

Es en ese sentido que algunos reportes económicos estiman que al menos el 5% de las ventas químicas globales son derivados de la biotecnología industrial y esta producción podría duplicarse hasta el 2010 (Anon., 2004). Se ha sugerido que algunos de estos bioprocesos podrían resultar de técnicas emergentes principalmente de tecnología de DNA recombinante, ingeniería metabólica, bioinformática, genómica funcional y proteómica. Pero pese a la importancia que generan estos procesos se sabe también que pueden ser rápidamente desplazados por procesos químicos catalíticos tradicionales (Rogers *et al.*, 2005). Por otro lado, la necesidad de implementar un control sobre la contaminación estimula y potencia el uso de materiales de residuos agrícolas renovables en estos procesos.

Dentro de los procesos industriales, el desarrollo de algunas investigaciones están basadas en microorganismos extremófilos debido a la estabilidad que presentan sus metabolitos (Turner *et al.* 2007). Estos ofrecen ventajas en procesos industriales, por su función rápida y eficaz en condiciones extremas como ser pH, temperatura, concentraciones de sal, etc. Por ejemplo las enzimas de los termófilos son capaces de catalizar reacciones a temperaturas elevadas, además de presentar mayor estabilidad y vida media más prolongada que los mesófilos (Posada *et al.*, 2004).
Por otro lado, los desechos agrícolas son la mayor fuente de residuos y de potencial contaminante a nivel mundial. En la actualidad la acumulación de éstos es uno de los problemas más preocupantes, por lo que se viene planteando diferentes soluciones biológicas que permitan al mismo tiempo su disminución y aplicación. Por lo general estos poseen gran cantidad de hemicelulosas y celulosas, y un bajo porcentaje de ligninas, por lo que puede brindar grandes cantidades de fuente de carbono ya que son fácilmente degradables por bacterias con capacidad de hidrolizar dichos componentes.

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en plantas es soluble en álcali y está estrechamente relacionado a la celulosa. Está compuesta por unidades de glucosa, galactosa, manosa, xilosa y arabinosa (Bhat y Hazlewood, 2001) las enzimas capaces de degradar se denominan en general hemicelulasas y que han sido ampliamente estudiadas (Gonzáles, 2004; Lynd *et al.*, 2002). Sin embargo, sus actividades hidrolíticas son afectadas por una serie de factores físicos y químicos que limitan su aplicación a nivel industrial. Por ello, existe necesidad de aislar bacterias con mejores rendimientos además de mantener la calidad de dichas enzimas, con elevada estabilidad a condiciones extremas (Ramírez y Coha, 2003). Por esta razón, los microorganismos termófilos han sido sugeridos como fuentes alternativas por la termoestabilidad de sus enzimas, propiedad ventajosa en aplicaciones industriales.

La reutilización de las enzimas es una de las formas que permite la reducción de costos, siendo la inmovilización biológica una técnica mediante la cual moléculas, enzimas, organismos o células son fijados a superficies o atrapados en matrices para ser reutilizados protegiendo el material biológico frágil (Calvo, sin año; Ruminot *et al.*, 2001).

Una dificultad en los procesos biotecnológicos es la baja productividad, una posible solución a este problema es incrementar la concentración celular (Mukesh *et al*, 2008). Esta desventaja puede ser superada a través del establecimiento de cultivos continuos o el uso de sistemas fed- batch. Así también, se puede conseguir una alta productividad en biorreactores con células inmovilizadas (Zhu *et al.*, 2002).

En este trabajo se realizó la optimización de las condiciones de cultivo en batch, en células encapsuladas y libres para la producción de xilanasas de la bacteria termófila anaeróbica Ft3 proveniente de la región altiplánica de Bolivia, así también se probaron distintas condiciones en un sistema continuo con células encapsuladas para incrementar la producción de la enzima.

CAPITULO II.

ANTECEDENTES

1. PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

La biotecnología es una actividad multidisciplinaria que está definida como la aplicación de los principios científicos y de la Ingeniería al procesamiento de materiales por agentes biológicos para proveer bienes y servicios (Rogers *et al.*, 2005). Los agentes biológicos pueden ser células microbianas, animales, vegetales y enzimas, entendiéndose por bienes a cualquier producto industrial relacionado con alimentos, bebidas, productos medicinales, etc., y por servicios a aquellos vinculados a la purificación de aguas y tratamiento de efluentes o cualquier otro proceso relacionado a la bioremediación o industria (Microbiología Industrial). En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances principalmente en el desarrollo de procesos industriales en diferentes campos (Arroyo 1998).

Es así, que se ha estimado que el 5% de las ventas químicas globales son derivados de la industria biotecnológica, con tendencia de incrementarse en el futuro, sugiriendo que si bien varios procesos resultan de técnicas emergentes como ser tecnología del DNA recombinante ingeniería metabólica, genómica funcional y proteómica, bioinformática, estos pueden ser rápidamente remplazados por procesos tradicionales catalíticos naturales (Rogers *et al.*, 2005)

Para los microbiólogos y genetistas moleculares los temas actualmente importantes consisten en producir microorganismos robustos y estables con capacidad de alto rango de conversión y eficiencia en procesos a gran escala (Rogers *et al.*, 2005). Esto puede lograrse usando microorganismos no recombinantes que tengan por naturaleza las características necesarias para su aplicación industrial.

Las aplicaciones industriales de la biotecnología estuvieron por muchos años referidos hacia la biotecnología médica. Sin embargo en los últimos años las aplicaciones biotecnológicas se han estado enfocando hacia los sectores industriales, sugiriendo que en el futuro el impacto económico que tendrá la biotecnología será significante (Bull et al., 1998).

Por otro lado el desarrollo de la biotecnología relacionada con otras disciplinas origina que emerjan procesos que resultan de una combinación de química tradicional y biotecnología para convertir recursos biológicos a químicos. Un ejemplo de esto son los estudios pilotos dedicados a la producción de acido succínico y polioles a partir de fuentes de agricultura (Bull *et al.,* 1998). En otros casos la biotecnología es introducida para el mejoramiento de procesos ya establecidos, estos son algunos ejemplos de sectores de diversos químicos, pulpa y papel, comida, textiles, etc.

Nuevos productos de biotecnología industrial incluye productos funcionales como ser polímeros biodegradables, químicos ópticamente activos, enzimas para uso en detergentes y alimentos. Los biocatalizadores ayudan a hacer posible el desarrollo de productos viables. Estos pueden ofrecer más funcionalidad por aproximadamente el mismo costo de los productos a ser reemplazados (Bull *et al.*, 1998).

Las enzimas industriales han tenido una revolución sorprendente, el crecimiento del mercado de éstas se ha extendido a cerca de 85 enzimas, las cuales son actualmente usadas en la producción comercial. Con el descubrimiento de una variedad de enzimas y más activas aun, las enzimas comerciales han sido valoradas en $ 1.7-2.0 billones en el 2006. (Jitender *et al.,* 2006).

La importancia de los biocatalizadores radica fundamentalmente en que ofrecen a la industria procesos y productos puros ya que son más específicos y más selectivos que otros productos no biológicos. Los procesos biotecnológicos permiten generar biocatalizadores que pueden ser producidos rápidamente y de forma controlada (Bull *et al.,* 1998), además de ello según la aplicación pueden utilizarse organismos vivos con actividad catalítica o sus constituyentes catalíticos solamente. Por otro lado se sabe también que el desarrollo de los organismos involucrados en estos procesos es fácil ya que pueden utilizar residuos agroindustriales, como fuente de carbono por lo que la obtención de sus enzimas resulta tener un bajo costo. Para que una enzima pueda ser usada en la industria esta debe ser producida a bajo costo y debería poder ser reutilizada reproduciendo resultados eficientemente. Para lograr esto se han desarrollado diferentes técnicas de inmovilización en diferentes soportes que permitan la estabilidad enzimática. Para

aplicaciones industriales la inmovilización de la enzima en geles o soportes pueden ofrecer varias ventajas además del uso repetido de la enzima, la fácil separación de productos (Jitender *et al.*, 2006). La biotecnología industrial brinda claros beneficios ya sean económicos o medioambientales el poder de estas herramientas siguen creciendo (Bull *et al.*, 1998) y con esto el impacto sobre algunos aspectos de la industria.

2. BACTERIAS EXTREMÓFILAS

Una de las principales líneas de investigación en la actualidad está constituida por el estudio de las extremozimas ya que ofrecen una variedad de ventajas en comparación a las enzimas que son producidas por organismos mesófilos, sobre todo si se toma en cuenta la aplicación industrial. Estas enzimas debido a sus características de crecimiento (Fig. 1) pueden aplicarse en procesos que requieren condiciones extremas por ejemplo: petroquímica, producción de energía, producción de alimentos, tratamiento de residuos, etc. (Bull *et al.*, 1998)

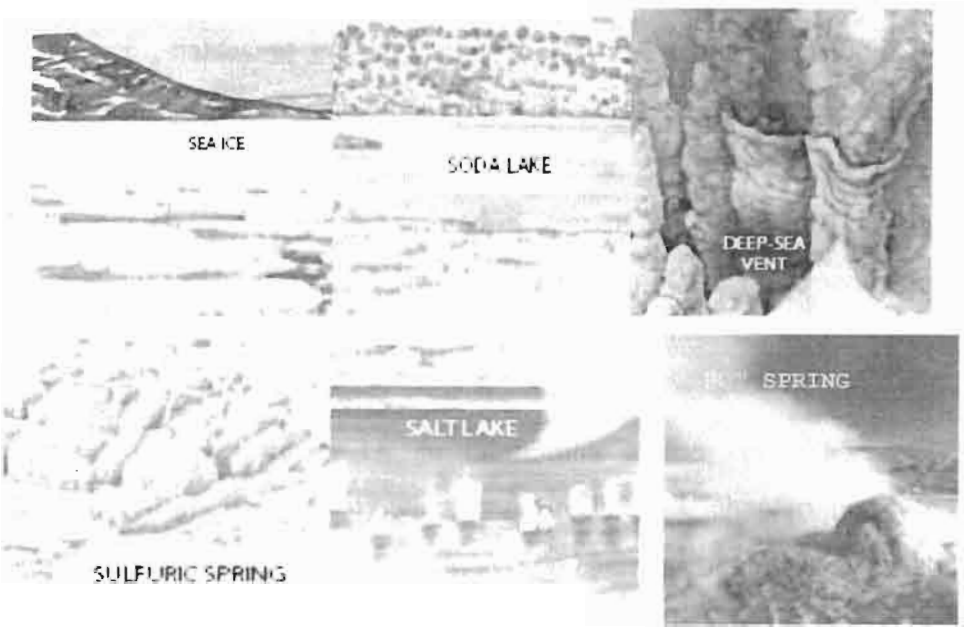


Figura 1. Ambientes Extremófilos
(Extraído de Extremophile, 2005)

Sin embargo pueden presentar también desventajas para la aplicación industrial, por ejemplo uno de los problemas principales es la fragilidad ya que se necesita grandes cantidades de agua por lo tanto la productividad volumétrica es baja y por ende el costo del catalizador también. Algunos de estos problemas han direccionado hacia el diseño de biorreactores para mejorar la producción enzimática de hecho con estos procesos se ha visto que las enzimas son manejables y presentan un mejoramiento en procesos continuos.

Así también se ha visto que existen impedimentos técnicos para la aplicación de las enzimas en la industria, esto principalmente por la infraestructura de las industrias quienes deben implementar nueva infraestructura para poder adoptar los procesos biotecnológicos.

2.1 Bacterias Termófilas

Estas bacterias tienen la característica de vivir a elevadas temperaturas, debido a ello sus proteínas y enzimas deben ser estables al calor. Sus enzimas tienen alta estabilidad térmica debida principalmente a redes de interacciones iónicas y modificaciones de la membrana plasmática.

La membrana es rica en ácidos grasos saturados, con punto de fusión elevado. En bacteria presentan alargamiento de las cadenas de ácidos grasos (C_{18}-C_{24}), incremento de ácidos grasos saturados, presencia de ramificaciones y ciclos hopanoides.

Las bacterias hipertermófilas tienen en su membrana grasas conocidas como ésteres, de temperatura de fusión muy elevada; proteínas termoresistentes, chaperoninas y compuestos de moléculas sencillas como glicerol y fosfato; este tipo de bacterias tiene la característica de fabricar muy rápidamente pequeñas moléculas que hacen de intermediarios energéticos.

Además poseen otro tipo de moléculas que ayudan a mantener la estabilidad a la temperatura por ejemplo:

-Presencia de proteínas de unión al DNA que impiden su fusión (plegamiento del DNA en una

conformación consistente con la estabilidad termal).

- DNA girasa reversa: Superenrrollamientos (+) en el DNA.

- Altas proporciones de G y C en el DNA que le da estabilidad y aumenta el punto de fusión de este ácido nucleico.

Tienen enzimas que no se desnaturalizan a altas temperaturas y protegen al ADN para evitar su degradación.

3. MICROORGANISMOS ANAERÓBICOS

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

El crecimiento anaeróbico es una de las características principales de los procariotes y bastante raro en eucariotes. Su metabolismo es bastante similar al sistema aeróbico, utilizan las mismas enzimas, citocromos, etc. La diferencia radica en que los sistemas aeróbicos, el oxigeno molecular actúa como ultimo aceptor de electrones, a través de la cadena de transporte, mientras que en los sistemas anaeróbicos se usa otros aceptores como Fe^{3+}, NO^{3-}, NO^{2-}, S°, CO_2 y SO_4^{2}, entre otros (Brock, 1998). Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, ya sea autotrófico, que corresponde a los microorganismos que obtienen el carbono del CO_2 como las algas y algunas bacterias, y los heterotróficos que necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono (Microbiología Industrial).

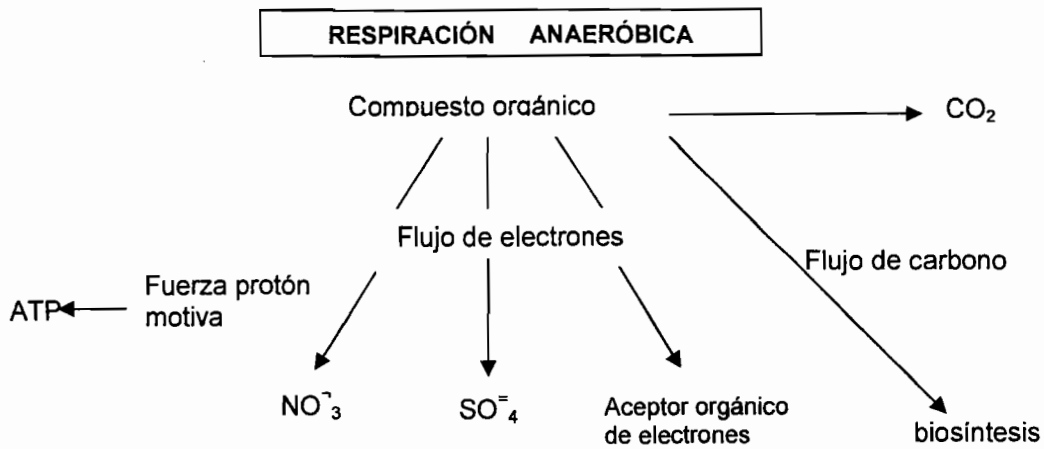


Figura 2. Respiración anaeróbica (Extraído de Hernández et al., 1999)

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

Sin embargo el desarrollo de métodos moleculares ha permitido estimar que la diversidad existente en la naturaleza se encuentra entre 10^5 y 10^7 especies (Roselló-Mora y Amann, 2001), de los cuales se estima que sólo el 1% de los microorganismos han sido cultivados y caracterizados. La caracterización de la diversidad microbiana por métodos tradicionales permite únicamente recuperar entre 0.1 y 10% de las bacterias en el ambiente, denominándose al restante 99-90 % viables no cultivables (Rondon *et al.*, 1999; Watts *et al.*, 1999; Tiedje y Stein, 1999; Handelsman *et al.*, 2002; Torsvik y Øvreås, 2002; Torsvik *et al.*, 2002).

Dejando una gran cantidad (más de 10.000 especies diferentes) sin explorar, el desconocimiento de esta enorme diversidad es una de las carencias más importantes que ha tenido la Biología, Microbiología y Enzimología.

Para explicar este fenómeno se han planteado diferentes puntos de vista uno de estos es que se desconocen los requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de un gran número de grupos microbianos en su ambiente natural. Sumado a esto, que la información que se tiene sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que mantienen los miembros de una comunidad microbiana es insuficiente (McDougald *et al.*, 1998; Tiedje y Stein, 1999; Zengler *et al.*, 2002; Keller y Zengler, 2004). También se ha propuesto que las bacterias no cultivables son microorganismos filogenéticamente similares a los cultivables, pero en un estado fisiológico que los hace recalcitrantes a ser cultivados. La base de esta explicación es que algunas bacterias cultivables pueden convertirse en viables, siempre y cuando las condiciones ambientales no se han adversas, y puedan revertirse a un estado cultivable en condiciones favorables (McDougald *et al.*, 1998).

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

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

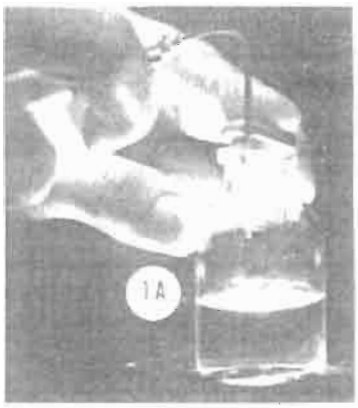


Figura 3. Gasificación del medio con nitrógeno en la Técnica de Hungate (Extraído de T. Miller y M.J. Wolin, 1973)

Fundamentalmente se basa en el uso de botellas de 100 mL, cerradas con tapones de caucho de butil selladas con anillas de aluminio. El medio está compuesto básicamente por minerales con la adición de un agente reductor, posteriormente es gasificado con un gas inerte libre de O_2-. Una vez que el medio ya está embotellado y sellado, puede esterilizarse (Figura 3). La inoculación posterior y la adición de algunos compuestos se agregan con una jeringa y aguja hipodérmica estéril.

Existen variaciones de la técnica original descrita por Hungate para el cultivo de microorganismos anaerobios estrictos. Una modificación de la técnica, denominada "Técnica Roller-tubes", la misma que incluye el crecimiento de colonias dentro de una matriz de agar-agar que es esparcido por las paredes de la botella (Figura 4).

Figura 4. Desarrollo de colonias en el agar, dentro de la botella (Extraído de T. Miller y M.J. Wolin, 1973)

A partir de los resultados obtenidos por Hungate (Miller y Wolin, 1973) sobre la microbiología de las bacterias anaerobias se produjo una rápida comprensión del proceso.

4. DESECHOS AGROINDUSTRIALES

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

La disposición final de los residuos orgánicos sólidos es un problema que afecta al medio ambiente en todas las regiones del mundo. Actualmente se trata de reducir los residuos aplicando métodos biotecnológicos que tienden a reducir su volumen y favorecer su reutilización (Diorio *et al.,* 2003). Estos materiales, constituidos principalmente por celulosa, hemicelulosas y lignina pueden ser tratados con microorganismos con capacidad de degradación

En las últimas décadas una variedad de métodos anaerobios se están aplicando en forma creciente en el tratamiento de residuos industriales provenientes de plantas químicas, farmacéuticas, papeleras y alimenticias (lácticas, cerveceras, frigoríficas, de conservas, etc.) para remover materia orgánica soluble y suspendida de las corrientes líquidas residuales (Mussati *et al.,* 2000). Esta tendencia favorable en la aplicación de la tecnología anaerobia ha dado lugar a numerosos trabajos de investigación.

La biorremediación se puede definir como el uso intencional de procesos de degradación biológicos para eliminar sustancias contaminantes ambientales que han sido vertidos con conocimiento o accidentalmente en el medio ambiente. Los procesos de remediación pueden efectuarse en el mismo lugar donde ha ocurrido el derrame, o bien separando la porción

contaminada y trasladándola a un reactor (Yullo, 2003). Tal es el caso de efluentes industriales o domiciliarios que se tratan previamente al vertido hacia el medio ambiente.

Históricamente el compostaje fue una primitiva forma de biorremediación en donde los residuos, restos orgánicos, inorgánicos, residuos industriales, etc. son puestos en contenedores permitiendo que puedan ser biodegradados por microorganismos (Senior y Balba, 1990). El uso de los materiales crudos renovables principalmente residuos agroindustriales y ganaderos es en la actualidad de gran interés durante el desarrollo de procesos sostenibles de energía alternativa, para reemplazar a los hidrocarburos, ya que además de representar una fuente renovable existe una disminución de contaminantes ambientales producidos por los hidrocarburos, y es en ese sentido que se propone diseñar bio-procesos, y técnicas moleculares que coadyuven en la investigación.

4.1 Paja de trigo como Residuo Agrícola

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

Tabla 1. Composición de paja de trigo
(Extraído de Forrajes)

COMPOSICIÓN QUIMICA- PAJA DE TRIGO	
MS%	91,4
MO %	83,3
PC %	4
FDN %	70,5
FDA %	48,8
HEMI %	21,7
CELU %	31,1
LIG %	8,3

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

4.2 Residuos agrícolas de soya

Los residuos de soya ricos en proteínas grasas, fibras y azucares, lo cual hace q estos residuos pueden ser usados potencialmente como suplemento para medio de alta calidad para fermentación microbiana (Chienyan y Fan-Chiang, 2004) los valores de los residuos de soya en la producción de ácidos orgánicos, enzimas, y proteína celular ha sido investigada en diferentes fermentaciones en la industria (Kara et al., 1995).

Tabla 2. Composición de residuos de soya
(Extraído de Khare et al., 1995)

Constituyente	Cantidad % (db)
Proteina cruda	28
Aceite	6
Carbohidratos totales	50
Carbohidratos libres	20
Minerales mg/100g	
Calcio	260
Magnesio	163
Hierro	6
Potasio	1046
Vitaminas (mg/100g)	
Riboflavina	0-59
Tiamina	0-04
Niacina	0,10

4.3 Cascarilla de arroz como residuo agrícola

La cascarilla de arroz es un tejido vegetal constituido por Celulosa, hemicelulosa y lignina. El uso de la cascarilla en diferentes trabajos donde éste es usado como materia prima para la producción de biocombustibles representa un aporte significativo a la preservación de los recursos naturales y un avance en el desarrollo de tecnologías limpias y económicas en la producción de arroz uno de los principales cereales (Scientia et Technica,2007).

Tabla 3. Composición cascarilla de arroz
(Extraído de Morton Satin FAO, 2002)

Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
41	24	18
35	35	6
40-55	20-35	25-30
	(%)	

La composición de las hemicelulosa incluye la unión de heteropolímeros de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosas, galactosa, glucosa), y acido urónico. El xilano es el mayor constituyente de la hemicelulosa y el segundo más abundante recurso renovable, con alto potencial de degradación a ser usado a productos finales (Diorio *et al.*, 2003; Michenlin *et al.*, 2008). Las xilanasas microbianas 1,4-β-D-xilano xilanohidrolasa, EC 3.2.1.8 catalizan la hidrólisis del xilano debido a su alta especificidad. Durante las pasadas décadas, las xilanasas han sido interesantes para la investigación por sus potenciales aplicaciones industriales (Michelini *et al.*, 2008), en diferentes procesos biotecnológicos. La hidrólisis parcial enzimática del xilano cambia las propiedades físicas y químicas, la cual concierne la calidad de diferentes productos de la industria.

4.4 Pretratamiento residuos agrícolas

La hidrólisis enzimática de la lignocelulosa es limitada por varios factores. Varios investigadores han concluido que la cristalinidad de la celulosa es uno de los factores. Otro factor es el grado de polimerización contenido de humedad, disponibilidad de superficie del área y el contenido de lignina (Koullas *et al.*, 1992; Chang and Holtzapple, 2000; Laureano-Pérez *et al.*, 2005). Existen varios métodos de pretramiento, que tratan de facilitar la hidrólisis enzimática actuando de diferentes formas.

Tratamiento alcalino

Durante el tratamiento alcalino la primera reacción está dada por la solvatación y saponificación. El xilano puede ser selectivamente removido con hidróxido de potasio acuoso, se mantiene la temperatura baja durante la extracción, sin embargo por lo general la hemicelulosa no es recuperada en su totalidad ya que gran parte se encuentra en forma de monómeros.

Tratamiento ácido

El pretratamiento de la lignocelulosa con acido a temperatura ambiente solubiliza la hemicelulosa por lo que hace que la celulosa pueda estar más accesible, la hemicelulosa solubilizada puede ser sujeta a reacciones hidrolíticas produciendo Monómeros, compuestos furfurales y otros productos volátiles en medio ambiente acídico.

Durante el pretratamiento acídico este solubiliza la lignina la condensa rápidamente y precipita en acido. La solubilización de la hemicelulosa y la precipitación de la lignina solubilizada es más pronunciada cuando se trabaja con ácidos fuertes comparado con el pretratamiento con acido diluido.

Tratamiento con amonio

Otro pretratamiento consiste en la aplicación de amonio y dióxido de carbono. El objetivo del pretratamiento con amonio también llamado AFEX, este consiste en mezclar amonio a una proporción de 1:1 Kg amonio/Kg de biomasa a temperatura ambiente con un tiempo de duración de 10 a 60 días y a temperaturas de 120°C en pocos minutos. Se ha visto que con este pretratamiento se incrementa seis veces más la hidrólisis enzimática debido a la hinchazón de la celulosa y la delignificación de la materia.

Tratamiento térmico

Durante este pretratamiento el sustrato es calentado, si la temperatura incrementa sobre 150- 180 °C, parte de la lignocelulosa, primeramente la hemicelulosa y rápidamente después que la lignina, empezaría a solubilizarse.

La composición de la columna de la hemicelulosa y los grupos de las cadenas laterales están determinados la estabilidad de estos según el pretratamiento acido, alcalino, o termal. De los dos componentes dominantes de la hemicelulosa xilano y glucomanos, el xilano es termalmente de menor estabilidad, siendo el tamaño la única diferencia con los glucomanos. Por encima de los 180 ° C la hemicelulosa empieza a solubilizarse por una reacción exotérmica. Esta temperatura de 180

°C es probablemente justo una indicación de la temperatura a la cual la reacción exotérmica empieza ya que la reactividad termal de la biomasa lignocelulósica depende de la composición.

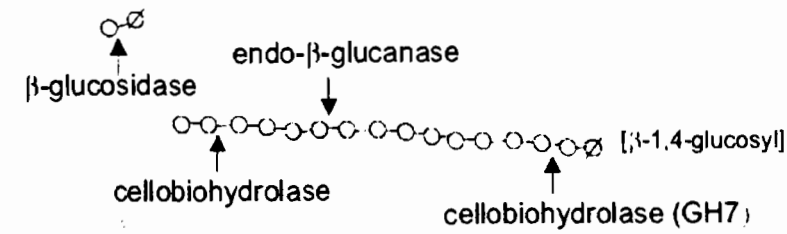
El tratamiento térmico con temperaturas de 160 °C y más altas causa además la solubilización de la hemicelulosa la solubilización de la lignina. Los componentes producidos son casi siempre productos fenólicos y tienen en algunos casos un efecto toxico o inhibitorio para la bacteria, levaduras, y arqueas. Estos componentes de la lignina solubles son muy reactivos y si no son removidos rápidamente, recondenesan y precipitan sobre la biomasa.

5. ENZIMAS HIDROLÍTICAS

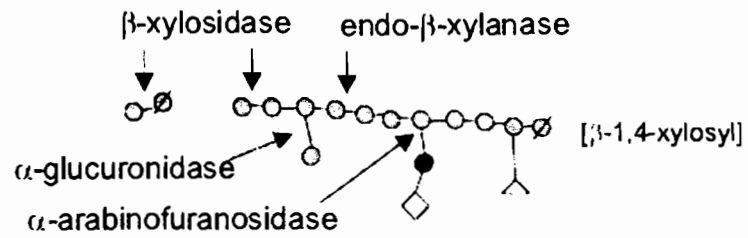
5.1 Degradación de xilanos y otras hemicelulosas

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

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



A. Hemicelulosa



B. Xilano

○ = glucosa ○ = xilosa ○ = ácido glucorónico ● = arabinosa
○ = manosa ● = galactosa △ = acetato ◇ = metilo

Figura 5. Sitios de ataque enzimático

6. XILANASAS

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos: presentan una gran actividad catalítica; muestran una gran especificidad de sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad); son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica (Arroyo, 1998).

La conversión eficaz de material del lignocelulósico a azúcares fermentables es necesaria, pero requiere condiciones extremas o sistemas enzimáticos que pueden convertir pentosas y hexosas, y además puedan tolerar las condiciones extremas. El uso de celulasas y hemicelulasas

termoestables, de microorganismos termofílicos para la degradación de material lignocelulósico presenta ciertas ventajas ya que minimiza el riesgo de contaminación y podría habilitar un proceso en un solo paso de hidrólisis enzimática y fermentación (Turner *et al.*, 2007).

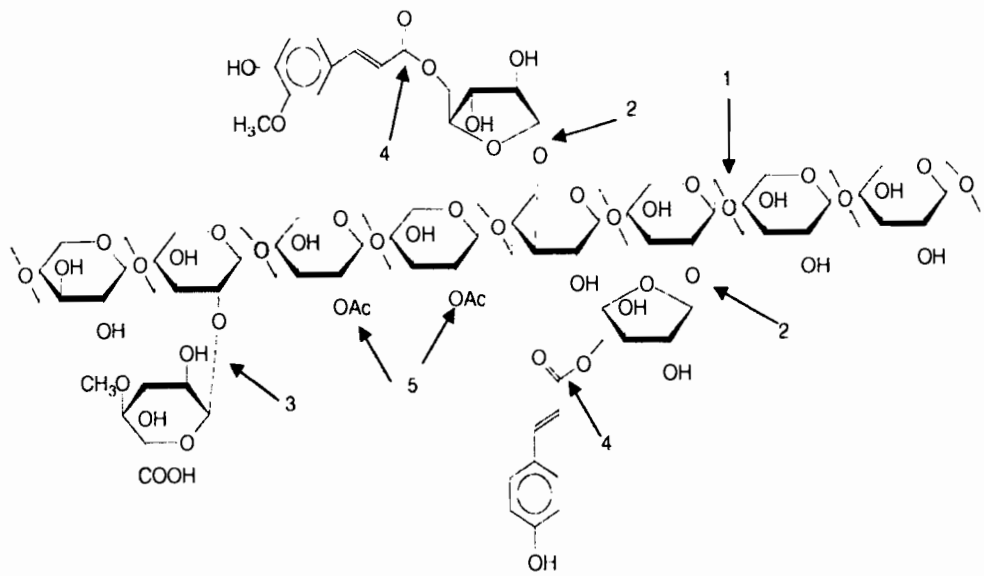


Figura 6. Esquema de acción de las diferentes enzimas xilanolíticas sobre una hemicelulosa hipotética. 1: endo-xilanasas; 2: α-L-arabinofuranosidasas; 3: α-D- glucuronidasas; 4: feruloil y coumaroil esterasas; 5: acetilesterasas.

Se encuentra aplicaciones para las xilanasas en la clarificación de jugos de frutas y vinos. En varios procesos las xilanasas son aplicadas en el mejoramiento de la filtración. La utilización de la xilanasa en la elaboración del pan mejora significantemente la textura el volumen y aumenta la vida de este producto. Preparaciones de enzimas son también ampliamente usadas en bio blanqueadores en la industria del papel. Estas facilitan la deslignificación de la pulpa de la planta en la producción de alta calidad del papel, dado que el contenido de cloro de los agentes blanqueadores es un serio problema ecológico que puede ser reducido.

Empezando los tratamientos del material lignocelulósica en medio acuoso (auto hidrólisis o tratamiento hidrotermal) bajo condiciones optimizadas lleva a la solubilización de hemicelulosa, dando una fase sólida enriquecida en ambos celulosa y lignina. Esta fase sólida puede ser utilizada para obtener una variedad de productos comerciales, por ejemplo: hidrólisis enzimática y

destruir las propiedades estructurales requeridas de las microfibrillas de celulosa. Una ventaja de este proceso es minimizar el uso de cloro que es reducido a cloro orgánico tóxico producido durante los procesos químicos (Marichiamy y Mattiasson, 2005).

7. Sistemas de Inmovilización de células-Encapsulación en Alginato de calcio

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

El alginato es uno de los biopolímeros más utilizados en los procedimiento de encapsulación, el cual tiene la propiedad de gelificarse en presencia de iones divalentes como el Ca^{2+} (Ruminot *et al., 2005*). El alginato es un polisacárido que se obtiene de algunas "algas marrones", el alginato resulta ser el mayor componente estructural de la pared celular y de la matriz intercelular proveyendo propiedades mecánicas a estas algas (Youssef *et al.,* 2001), por lo general las algas son de gran tamaño, entre las que se encuentran fundamentalmente *Laminaria hyperborea*, que prolifera en las costas de Noruega.

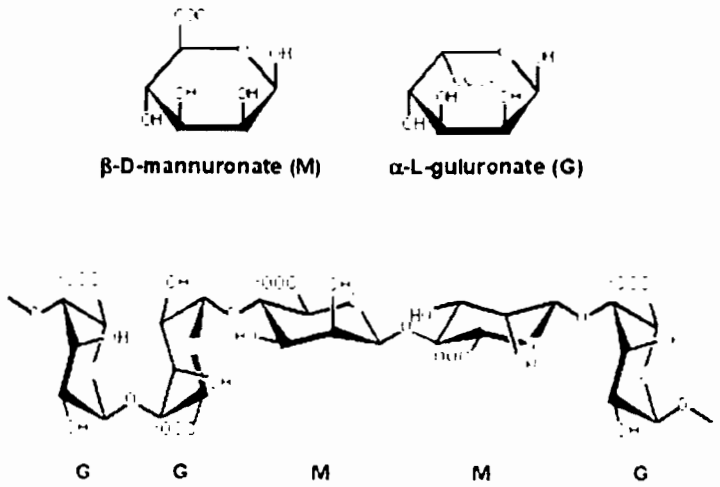


Figura 7. Composición del polímero alginato (Extraído de Sriamomsak et al., 2007)

El alginato está formado por dos tipos de monosacáridos, La cadena polimérica esta compuesta de ácidos manurónico (M) y glucorónico (G) en proporciones dispuestos secuencialmente .Los monómeros pueden ser unidos por iones cálcicos a través de uniones consecutivas de bloques de ácido glucorónico para formar los geles. La conformación secuencial depende de las propiedades del alginato como ser solubilidad, viscosidad, y la habilidad para intercambiar iones, y esto a su vez depende del origen del mismo (Youssef *et al.* 2001).

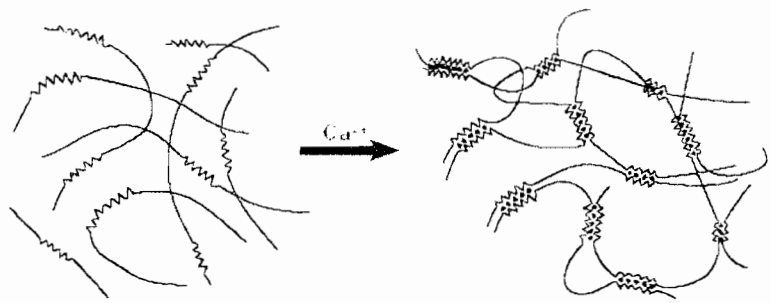


Figura 8. Polimerización del alginato en presencia de Ca 2+
(Extraído de Microbios y Moléculas, 2000)

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

El proceso de formación de la perla involucra la dispersión de dos líquidos inmiscibles resultando una emulsión. Una suspensión de células viables en una solución acuosa del polímero (fase dispersa) es emulsificada en una fase hidrofóbica (fase continua). La gelificación de gotas pequeñas de la fase dispersa es subsecuentemente iniciada por el decremento de la temperatura de la emulsión (Peyamn *et al.*, 2007).

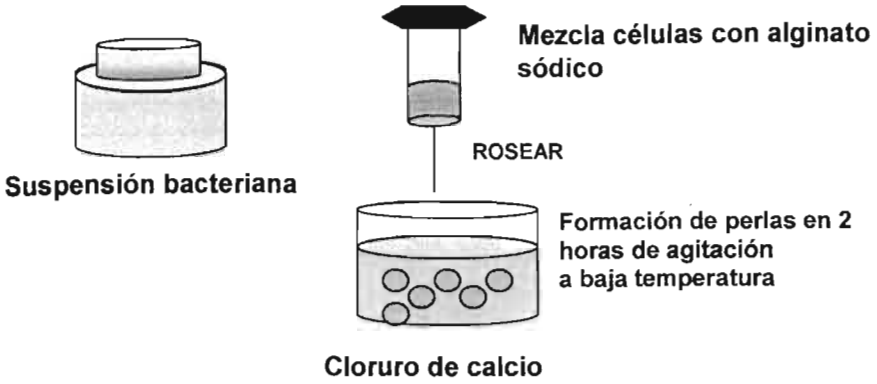


Figura 9. Esquema general de la Técnica de Encapsulación en alginato de calcio

El uso de la encapsulación de células puede ofrecer varias ventajas respecto a las células libres suspendidas en esquemas de bioremediación. La encapsulación puede reducir potencialmente el estrés biótico y abiótico proveyendo un número de ventajas, incluyendo la protección celular de los efectos tóxicos de componentes peligrosos e incrementa su supervivencia y su actividad metabólica.

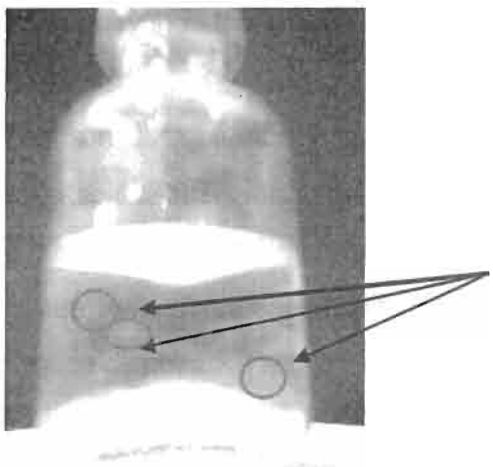


Figura 10. Formación de perlas de alginato, en constante agitación

La utilización de alginato como un gel de atrapamiento en un biorreactor ofrece gran estabilidad de la actividad bacteriana por más tiempo sin adición de elementos nutricionales (Youssef *et al.* 2001). Esta estabilidad se debe a las condiciones suaves de polimerización del gel y el rol directo que juega el calcio en la conservación de las células. La inmovilización de microorganismos es

usado para tratamiento biológico de aguas residuales. Se cabe que ofrece ventajas como reusabilidad del biocatalizador, control de reacción, y no contaminación de productos.

8. CULTIVO CONTINUO

El proceso de fermentación es aquel que se lleva a cabo en un fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos del medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo va aumentando en su concentración durante el proceso al mismo tiempo el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas (Microbiología Industrial).

Para optimizar la productividad de un proceso de fermentación las cepas empleadas pueden someterse a tratamiento físico o químico de mutación que al alterar algún sector del genoma logran aumentar la producción de un metabolito aunque también pueden disminuirla o incluso suprimirla. Por ello es preferible tomar en cuenta aquellos factores que de alguna forma podrían estar inhibiendo o disminuyendo la producción

Uno de estos factores son las condiciones de operación que se utilizan en los reactores por ejemplo la temperatura, la agitación, aireación, etc. La modificación de algunos de estos factores físicos como por ejemplo la temperatura, tiene un efecto notable sobre un proceso ya que puede modificar los requerimientos nutritivos de algunos microorganismos, lo que significa que al modificarse el valor de un factor puede cambiar los requerimientos de otro.

Otro factor importante son los medios de cultivo estos deben cumplir con todos los requerimientos nutricionales y además con los requerimientos específicos que son indispensables para la formación de productos. Los reactores están también estrechamente vinculados al manejo o manipulación de los factores externos, ya que permiten fijar o regular la alimentación de componentes de los medios.

En un proceso de cultivo continuo, se alimenta a una determinada velocidad que debe ser el mismo tiempo que se deja salir el exceso, en este sentido es importante tomar en cuenta un factor importante la velocidad de crecimiento del microorganismo.

Así también se debe considerar el efecto del medio sobre la velocidad específica de crecimiento (μ). Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, ya sea autotrófico, que corresponde a los microorganismos que obtienen el carbono del $C0_2$ como las algas y algunas bacterias, y los heterotróficos que necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono. Las fuentes de carbono cumplen también el rol de ser fuente de energía.

Otro requerimiento nutricional está constituido por las fuentes de nitrógeno que pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. Para la síntesis de proteína se requieren en general L-aminoácidos, aunque también son necesarios algunos aminoácidos de la serie D como D-alanina y D-aspártico para su incorporación a la pared de las células. En algunos casos se requieren también péptidos de histidina.

8.1 Optimización

Durante el proceso de optimización de los medios de cultivo se deben tomar en cuenta las sustancias estimulantes, activadoras e inhibidoras del crecimiento y formación del producto.
La metodología más elemental consiste en realizar experimentos, en los cuales se varía la concentración del componente a ensayar manteniéndose constante las concentraciones de los demás componentes del medio de cultivo.

8.2 Cultivo continuo

Para poner a punto un cultivo continuo, se debe realizar previamente un cultivo batch y también se debe determinar el flujo de alimentación mediante la velocidad de crecimiento, que debe ser el mismo del rebalse para mantener el volumen constante.

8.2.1 Biorreactores

El biorreactor, es sin duda, uno de los equipos fundamentales de la microbiología industrial. Es el recipiente donde se realiza el cultivo, y su diseño debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos.

Las principales ventajas que ofrecen los biorreactores son:

- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación.
- Mantener constante y homogénea la temperatura.
- Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.

El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente sembrado con el microorganismo deseado.

CAPITULO III.

JUSTIFICACIÓN

Debido al gran interés que despiertan los procesos biotecnológicos enfocados principalmente en el desarrollo de técnicas que permitan la producción de enzimas, específicamente exoxilanolíticas. El propósito de este trabajo es el de establecer la producción de xilanasas libres de celulasas por una bacteria anaeróbica termófila proveniente de la Región Altiplánica de Bolivia.

La producción de esta enzima se hará partiendo de la bacteria denominada FT3 con actividad xilanolítica, aislada de aguas termales perteneciente a la región de Chaquí Potosí-Bolivia. Dicha producción se llevó a cabo en una primera fase optimizando las condiciones de cultivo que permitan incrementar la producción, posteriormente tomando en cuenta las mejores condiciones físicas, químicas y biológicas se diseñó un biorreactor con células encapsuladas en alginato de calcio, esperando que la inmovilización permita el incremento de la biomasa y a su vez la productividad enzimática.

Además se pretende contribuir a los procesos de biorremediación utilizando como fuente de carbono, hidrolizados de residuos agroindustriales como ser paja de quinua, cascarilla de arroz, paja de trigo y residuos de soya. Se sabe que Bolivia es el mayor productor de quinua con un 46% aproximadamente de la producción mundial, 22.000 tm/año (CAF, 2008), la producción anual de soya es de 142 tm/año, arroz 243 tm/ año, trigo 96 tm/ año (CAF, 2007), en nuestro país y en los últimos años se ha incrementado la demanda al exterior por lo que estos valores tienden a subir cada año.

El incremento de procesos biotecnológicos ha hecho que su aplicabilidad emerja en diferentes áreas principalmente la industria, la necesidad de estudiar nuevos microorganismos o sus productos es de hecho eminente para el desarrollo de la industria y la tecnología en el mundo entero.

CAPITULO IV.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

- Establecer el sistema de inmovilización celular en alginato de calcio de la bacteria termófila anaerobia FT3 para la optimización de la producción de enzimas endoxilanolíticas.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las características morfológicas, bioquímicas de la bacteria FT3.
- Optimizar las condiciones de cultivo de la bacteria FT3 en relación al tipo y concentración de fuentes de carbono y nitrógeno, para la producción de enzimas endoxilanolíticas.
- Establecer y seleccionar el sistema de cultivo ya sea de células libres o encapsuladas para la bacteria FT3 en cuanto al producción de enzimas endoxilanolíticas
- Establecer modos de operación de cultivo batch o continuo para la bacteria FT3, en la producción de enzimas endoxilanolíticas.

CAPITULO V.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras y condiciones de cultivo

Para este estudio se utilizó una bacteria denominada FT3, la cual fue aislada de una muestra de lodo de aguas termales de la región altiplánica de Chaquí-Bolivia, cuya condición climática es extrema. La región de Chaquí está en el departamento de Potosí, y su localización geográfica es S° 19 37.46,0" ; W° 65 34.302" a una altura de 3721 msnm. Esta bacteria FT3 ha sido estudiada anteriormente comprobándose su capacidad de degradar hemicelulosa (Rios *et al*, 2007).

1.1 Cultivo en batch

La bacteria fue cultivada en viales de 100 mL a una temperatura de 60° C y pH neutro en un medio basal mineral Medio 11 (Anexo 1); el medio fue suplementado con solución de Vitaminas 10mL/L (Biotina 1 mg, PABA 5 mg, B12 5 mg, Tiamina 10 mg, csp 1000 mL), como agente reductor se utilizó tioglicolato de sodio (10 % solución), 2 mL/L (Miller y Wolin,1974); y como fuente de carbono (10 %) se utilizaron residuos agroindustriales como ser paja de trigo, cascarilla de arroz, paja de quinua, residuos de soya . El volumen del inoculo fue del 10% del medio de cultivo, y como fuente de carbono estándar se utilizó xilano.

Para crear un ambiente de anaerobiosis, el aire existente en los viales fue remplazado por gas nitrógeno según la Técnica de Hungate (Miller, 1973). El crecimiento del cultivo fue detectado a través de la medición de la densidad óptica utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

1.2 Aislamiento Primario a través de las Técnicas Tradicionales y no Tradicionales

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

Para las técnicas de asilamiento: Roller-tubes y Cultivo bifásico, se utilizó el mismo medio mineral basal, usando como solidificante agar-agar al 3%, tomando en cuenta que la temperatura de cultivo fue 60°C. Para el método no tradicional se utilizó encapsulación en perlas de alginato

Para la caracterización de la bioquímica de la bacteria FT3, fueron preparados los siguientes medios:

Fermentación de azucares

El medio de cultivo utilizado se baso en el medio mineral 11 suplementado con peptona, extracto de levadura, L-cisteína, agar y azul de bromotimol como indicador; este medio fue esterilizado por autoclave a 121 C por 15 minutos, para esta prueba se tomó en cuenta los siguientes azucares: glucosa, xilosa, manitol, lactosa, sacarosa, sorbitol y glicerol.

Los diferentes azucares probados fueron añadidos de forma estéril a una concentración de 0,6%, dicho medio fue distribuido en tubos, los cuales después fueron inoculados con la bacteria. Para el crecimiento de la bacteria los tubos fueron saturados con nitrógeno y puestos en una jarra gas-pack a una temperatura de 60° C. el mismo tratamiento fue aplicado para las determinaciones de Lisina-(LIA), Citrato, y Sulfuro- indol-motilidad (SIM).

La morfología de la bacteria fue identificada a través de tinción Gram, esta fue realizada según la técnica estándar.

1.3 Cultivo Continuo

Una vez establecidas las condiciones del cultivo en batch, se inicio el cultivo continuo para dicho procedimiento se inmovilizo las células bacterianas en alginato de calcio.

2. Encapsulación en perlas de alginato

Esta técnica fue desarrollada como una forma alternativa para la recuperación de bacterias anaerobias viables no cultivables. La técnica consiste en mezclar alginato de sodio con la muestra. La suspensión-mezcla (1:10) fue dispersada mediante goteo con jeringa 27G, hacia una solución de cloruro de calcio. La formación de las perlas se favoreció gracias a una constante agitación con agitador magnético a 12 revoluciones por minuto (r.p.m.) por un tiempo aproximado de 2 horas. Todo este proceso fue llevado a cabo dentro de una cámara de anaerobiosis (Fig. 11).

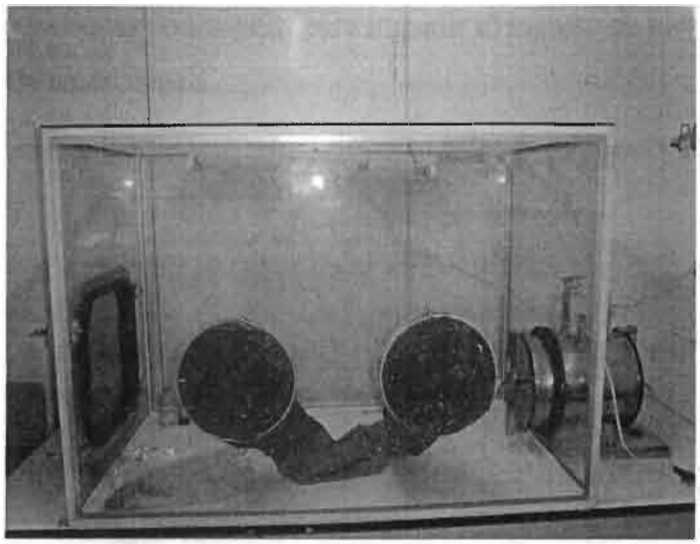


Figura 11. Cámara de anaerobiosis

Cabe recalcar que las condiciones del medio mineral 11 fueron modificadas en cuanto a las concentraciones de calcio, el tampón fosfato del medio fue cambiado por tampón tris-HCl esto para mantener la integridad de las perlas, ya que los iones fosfato atrapan al calcio que forma parte de la polimerización de la matriz del alginato.

2.1 Influencia de la concentración de alginato

El tamaño y la esfericidad de las perlas dependen principalmente de la viscosidad de la solución del alginato y de la distancia de entre la jeringa y la solución de cloruro de calcio. Se formuló un experimento para favorecer la actividad xilanolítica tomando como variables concentraciones de 1.5, 2, 2.5, 3 % de alginato de sodio y cloruro de calcio, y como respuesta la actividad xilanolítica.

3. Establecimiento del biorreactor

El biorreactor fue construido utilizando como columna una jeringa de 20 mL de capacidad, en la cual fue acoplado un conducto de alimentación-recirculación, y otro de salida (Fig. 12). El flujo de alimentación fue determinado según los valores de la cinética de crecimiento de la bacteria.

Una vez polimerizadas, las perlas de alginato con las células ya inmovilizadas se trasladaron 10 mL de la preparación de perlas a la columna del biorreactor. Una vez empacado fue llenado con gas-nitrógeno y se selló todas las conexiones para impedir el ingreso de aire, todo este proceso fue realizado en la cámara de anaerobiosis.

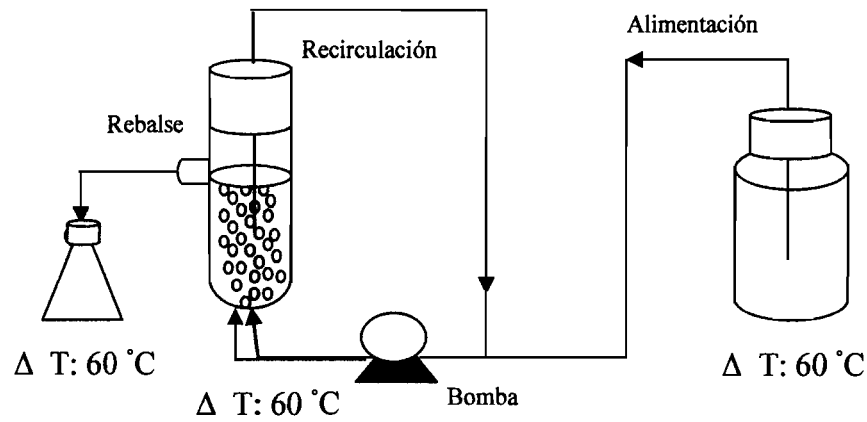


Figura 12. Biorreactor con células bacterianas inmovilizadas en alginato cálcico

Para mantener las condiciones de temperatura de la bacteria 60°C, el biorreactor mas el medio de alimentación fue puesto en una baño maría a dicha temperatura.

4. Optimización de las condiciones de cultivo: Fuentes de carbono y nitrógeno

La optimización de las condiciones de cultivo: fuente de carbono y nitrógeno, fue realizada en cultivo en batch y el diseño presentado a continuación fue utilizada tanto para cultivos con células

libres y encapsuladas. Así también cabe recalcar que cada experimento fue realizado por triplicado.

4.1 Fuente de Carbono

Se estableció un diseño experimental en base al tipo de fuente de carbono, -2 representa cascarilla de arroz, -1 quinua, 0 xilano comercial, 1 paja de trigo y finalmente 2 desechos de soya (Tabla 4). La concentración de todas las fuentes de carbono probadas fueron determinadas tomando como referencia la concentración de carbono del medio 11.

Tabla 4. Diseño experimental para optimizar Fuente de carbono

Nº Exp.	*Fuente de Carbono*
1	-2
2	-1
3	0
4	1
5	2

4.2 Fuente de nitrógeno

El siguiente diseño experimental fue establecido en base al tipo de fuente de nitrógeno, donde -2 representa nitrato de sodio, -1 extracto de levadura, 0 cloruro de amonio, 1 urea (Tabla 5). El mismo diseño se utilizó tanto para cultivos con células libres y encapsuladas. La concentración de todas las fuentes de nitrógeno probadas fueron determinadas tomando como referencia la concentración de nitrógeno del medio 11.

Tabla 5. Diseño experimental para optimizar -Fuente de nitrógeno

Nº Exp.	*Fuente de Nitrogeno*
1	-2
2	-1
3	0
4	1

4.3 Diseño factorial: Optimización de las concentraciones de fuentes de carbono y nitrógeno

Para seleccionar las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno se realizo el siguiente diseño factorial, donde el valor -2 representa una concentración de 0,2 g/L; -1 0,4 g/L; 0 1 g/L; 1 2,5 g/L y finalmente 2 representa 5 g/L (Tabla 6). El mismo diseño se utilizó tanto para cultivos con células libres y encapsuladas.

Tabla 6. Diseño experimental para optimizar Las concentraciones de fuente de nitrógeno y fuente de carbono

Nº Exp.	*Fuente de Nitrógeno*	*Fuente de Carbono*
1	-2	-2
2	-1	-2
3	0	-2
4	1	-2
5	2	-2
6	-2	-1
7	-1	-1
8	0	-1
9	1	-1
10	2	-1
11	-2	0
12	-1	0
13	0	0
14	1	0
15	2	0
16	-2	1
17	-1	1
18	0	1
19	1	1
20	2	1
21	-2	2
22	-1	2
23	0	2
24	1	2
25	2	2

Diseño factorial para optimizar la formación de perlas de alginato cálcico, la viscosidad del alginato es mediana (≥2000 cp) representada por 1 y baja (≤200 cp) representada por 2, para la concentración el valor -2 representa una concentración de 1.5 % , -1 representa 2 %, 0 representa

una concentración de 2.5 %, 1 representa 3%.(Tabla 7). El mismo diseño se utilizó tanto para cultivos con células libres y encapsuladas.

5. Optimización del sistema de encapsulación en alginato de calcio

Se estableció el siguiente diseño experimental (Tabla 7) para seleccionar la concentración y viscosidad adecuadas del alginato de sodio utilizado para la encapsulación de la bacteria FT3.

Tabla 7. Diseño factorial para la optimización de la concentración y viscosidad de alginato para la encapsulación

Nº Exp.	*Viscosidad*	*Concentración %*
1	1	-2
2	1	-1
3	1	0
4	1	1
5	2	-2
6	2	-1
7	2	0
8	2	1

En este diseño los valores de viscosidad 1 representa alginato de alta viscosidad y 2 alginato de baja viscosidad, en cuanto a la concentración el valor -2 representa 0,2 g/L; -1 0,4g/L; 0 1g/L; +1 2,5 g/L; +2 5 g/L.

6. Pretratamiento de los residuos agrícolas

Los residuos agrícolas fueron tratados con un pretratamiento térmico que consistió en someter 2 gramos de los diferentes residuos a 120 C por 30 minutos, los residuos fueron puestos con 80 mL de agua destilada, la concentración fue determinada tomando en cuenta los valores de DQO.

7. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Determinación de la Velocidad de Crecimiento

La velocidad de crecimiento se determino a través de la densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro Varian Cary 50.

Determinación de la actividad enzimática

Determinación de xilanasas por la técnica de DNS: Este es un método estándar, que esta basado principalmente en la determinación de enzimas de forma indirecta y esta basado fundamentalmente en la determinación de presencia de grupos carbonilos libres (C=O), de los azúcares reductores. Se basa en la utilización de ácido 3,5-dinitrosalicílico para producir la oxidación de los azúcares (Fig. 13).

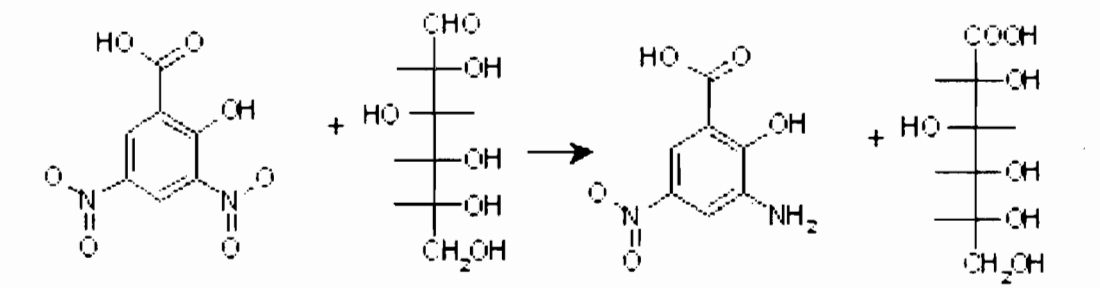


Figura 13. Reacción ácido dinitrosalícilico-azúcares reductores

El procedimiento consiste en lo siguiente:

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

Enfriar a temperatura ambiente

Jna vez frío la solución se leyó al espectrofotómetro 540 nm. Para determinar la concentración se ıterpolaron los datos obtenidos, en la curva de calibración (Anexos). Los datos obtenidos se evaron a UI/mL, según el tiempo de incubación y el sustrato utilizado que en este caso fue ;ilano (95% residuos de xilosa).

leterminación de β – D-glucosidasa y β – D-xilosidasa: Este método está basado en la utilización el p-nitrofenol. Definido principalmente como: una unidad enzimática β – D-glucosidasa y β – D-ilosidasa es expresada como la capacidad de liberar un µmol de p-nitrofenol por minuto bajo ɔndiciones estandarizadas (Miller y Wolin, 1974).

e realizó una curva de calibración con p-nitrofenol a pH 5 y longitud de onda de 405 nm, para ıego interpolar los datos obtenidos en la curva y posteriormente expresarlos en UI/mL, tomando ı cuenta el tiempo de incubación.

Determinación de azúcares liberados

Esta determinación fue llevada a cabo por la hidrólisis de los sustratos utilizados en los medios específicos, se realizó mediante la determinación de azucares reductores a través de la técnica de DNS.

Determinación de proteínas totales

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

El procedimiento para esta determinación es:

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

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

Determinación de Demanda química de oxigeno

La demanda química de oxígeno, es el parámetro utilizado para caracterizar la contaminación orgánica que se mide a partir de la cantidad de oxígeno disuelto necesario para la degradación química de los contaminantes orgánicos que contiene. Se entiende como "degradación química" la reacción de un oxidante químico, bien dicromato potásico, bien permanganato potásico, que consume materia orgánica.

La Demanda Química de Oxígeno, (DQO o COD) mide, la porción de materia orgánica (MO) biodegradable de una muestra que es susceptible a ser oxidada; por un fuerte oxidante químico

(dicromato potásico $Cr_2O_7K_2$). La mayor parte de la materia orgánica resulta oxidada por una mezcla a ebullición de los ácidos crómico y sulfúrico. La muestra se somete a una solución ácida fuerte, con un exceso de dicromato potásico. Después de la digestión, el dicromato no reducido sobrante, se determina con sulfato ferroso amónico, sal de Mohr: $(SO_4)_2Fe\ (NH4)_2$, para determinar así la cantidad de dicromato consumido y por lo tanto calcular la materia orgánica oxidable en términos de equivalente de oxígeno.

$$Cr_2O_7^{=} + H_2O\ (M.O\ reducida) + H^{+} \text{--------} > Cr_3^{+} + Cr_2O_7^{=}\ exceso + H_2O\ (M.O\ oxidada)$$

(amarillo) (verde)

Para la valoración utilizamos un indicador, ferroína, que a su vez reacciona con el exceso de Fe2+ que no ha reaccionado con el dicromato, dando lugar a un complejo de color marrón/rojizo que nos indica el punto final de la valoración.

Una vez realizada la titulación, con los valores de obtenidos se procede al calculo de oxigeno disuelto (Ver anexos) que nos da una referencia del la proporción de materia capaz de ser hidrolizada.

Análisis estadístico

Para realizar los análisis estadísticos se empleo el programa STATISTIC V8, fueron empleados los estadísticos de t-student, one way ANOVA y factorial ANOVA, de acuerdo al caso. Se tomo como valor de aceptación $p \leq 0.05$

CAPITULO VI.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Aislamiento y selección de la bacteria bacteriana

En el laboratorio de biotecnología microbiana perteneciente al Instituto de Investigaciones Fármaco bioquímicas, se han aislado y estudiado bacterias con diferentes capacidades enzimáticas. En ese sentido, el uso de enzimas con capacidad para degradar hemicelulosa, ha sido un tópico atractivo en últimos años debido a las aplicaciones biotecnológicas potenciales que estas tienen tales como ser blanqueadores o ablandamiento de pulpas durante la producción del papel.

La bacteria FT3 fue aislada de una muestra de aguas termales, de la región de Chaquí-Potosí, a través de la técnica de Roller tubes (Miller y Wolin, 1974). Esta bacteria fue asilada y crecida en condiciones de anaerobiosis estricta a una temperatura de 60°C, mostrando capacidad de hidrólisis con diferentes residuos agrícolas utilizados como fuente de carbono (Tabla 8). La misma fue seleccionada por presentar actividad xilanolítica alta y una baja actividad CMCasa (Carboximetilcelulasa), en comparación a otras bacterias.

Tabla 8. Bacterias productoras de xilanasas aisladas de aguas termales Chaquí-Potosi, mediante el método de Roller tubes

	Actividad Enzimática UI/mL			
Bacteria	CMCasa	Xilanasa	β-xilosidasa	β-glucosidasa
2B	0,02	0,04	3,58	1,52
FT3	0	0,18	3,2	1,55
P5	0,07	0,08	4,7	1,4

2. Caracterización morfológica, bioquímica de la bacteria FT3

Para caracterizar a la bacteria FT3 se realizó una tinción que permitiera la identificación morfológica, según la tinción se trata de una bacteria cocos Gram (+) (Fig.14)

Figura 14. Morfología de la bacteria FT3, mediante tinción Gram

Así también, se ha realizado pruebas bioquímicas (Tabla 9) con los siguientes resultados:

Tabla 9. Caracterización bioquímica

Fermentación de azucares:	
Glucosa	+
Sacarosa	+
Lactosa	+
Xilosa	+
Manitol	-
Sorbitol	-
Glicerol	-
Descarboxilación	-
Desaminación	+
Citrato	-
Sulfuro	-
Movilidad	-
Indol	-

3. Cinética de crecimiento de la bacteria FT3

Para determinar los valores de velocidad de crecimiento (μ), se realizó una cinética de crecimiento (Fig. 15), a través del incremento de la biomasa determinada por densidad óptica, donde la bacteria empieza la fase exponencial aproximadamente a las 20 horas hasta las 40 horas, donde empieza su

fase estacionaria. De acuerdo a los resultados, la velocidad de crecimiento fue de 0.022 h^{-1} cuando la bacteria FT3 creció en xilano (0.2%) como fuente de carbono en el medio 11 a pH neutro (6,8-7,2) a una temperatura de incubación de 60 C.

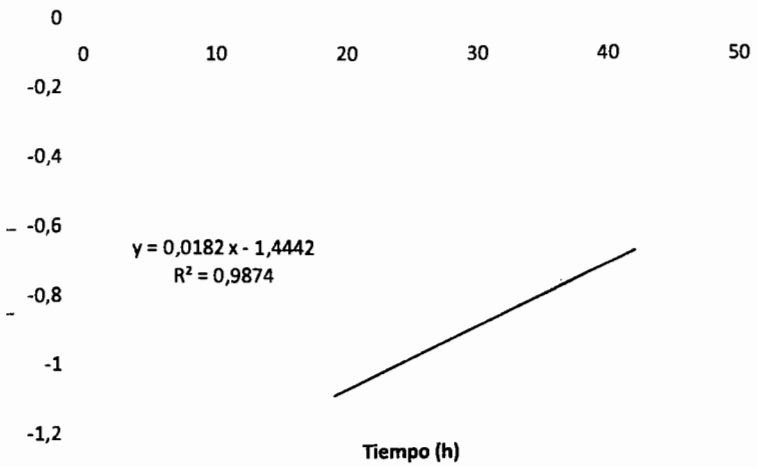


Figura 15. Curva de crecimiento bacteria FT3 corregida con logaritmo, crecida en xilano como fuente carbono estándar

4. Cinética de producción de las actividades hidrolíticas

Esta bacteria expresa extracelularmente aproximadamente 0,2 UI/mL de actividad xilanolítica a las 36 horas de cultivo, siendo este el tiempo del pico máximo de actividad, cuando la bacteria creció con xilano como fuente de carbono (Fig. 15). Por otro lado la actividad CMCasa no se detecto en el sobrenadante de cultivo. Dentro de las aplicaciones más relevantes de las enzimas xilanasas, es el uso en la industria del papel ya que permite la disminución del uso de compuestos clorados, que después se tornan tóxicos. Uno de los principales requisitos que estas enzimas deben cumplir para su aplicación es una baja o nula actividad celulolítica ya que alteraría la calidad de la materia y disminuiría los rendimientos de papel (Asha Poorna y Prem, 2006; Marichamy y Mattiasson, 2005).

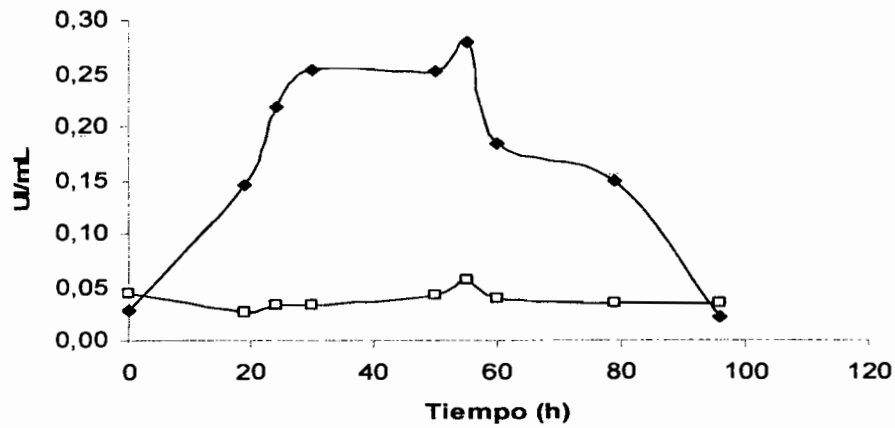


Figura 16. Actividad xilanolítica, y celulolítica, bacteria FT3 crecida con xilano como fuente de carbono. (♦) Actividad xilanolítica, (°) actividad CMCasa

La bacteria FT3, además presenta actividades importantes como ser β-xilosidasa de aproximadamente 1 UI/mL, y β-glucosidasa de 0,5 UI/mL, cabe recalcar que estas actividades se presentan una vez que han interactuado las enzimas endoglucanasas y siguen el mismo patrón que las primeras (Fig. 17), en cuanto al tiempo.

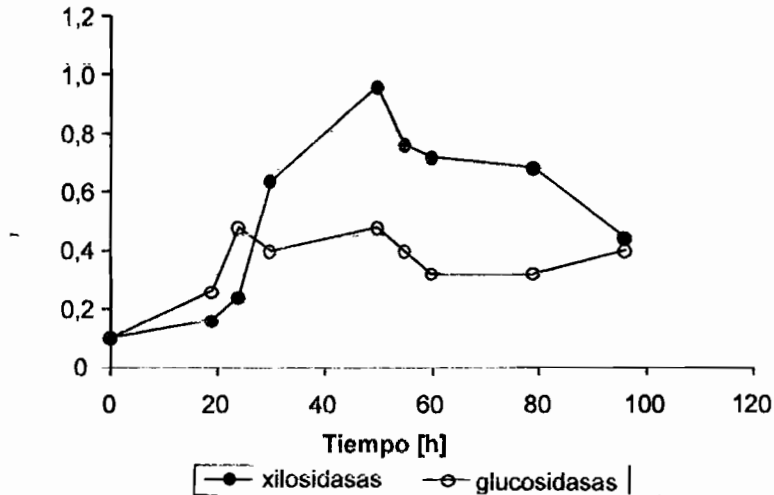


Figura 17. Actividad β-xilosidasa, y β-glucosidasa, bacteria FT3 crecida con xilano como fuente de carbono (♦) Actividad β-xilosidasa, (°) actividad β-glucosidasa

5. Rendimiento cultivo en batch

La bacteria Ft3, fue cultivada en condiciones batch a una temperatura de 60° C usando como fuente de carbono xilano, en este sistema se evalúo los valores de rendimiento de producción en cuanto a la actividad enzimática y se obtuvo que a una velocidad de crecimiento de 0.02 h^{-1} el consumo de sustrato es de 179.89 mg (Tabla10), por cada gramo de biomasa por hora, lo que significa que la producción es de 0.04 mUI por cada gramo de sustrato consumido.

Tabla 10. Rendimiento de producción en cultivo en batch

μ [h -1]	qs [mg/g h]	Y p/s [UI/g]
0,022	179.9	4E-05

6. Optimización de la encapsulación

Para la inmovilización de las células, se desarrollo un experimento de optimización en cuanto a la matriz de inmovilización debido a que se determino previamente que existe diferencia en cuanto al crecimiento de la bacteria a diferentes concentraciones de alginato cálcico (Fig. 18).

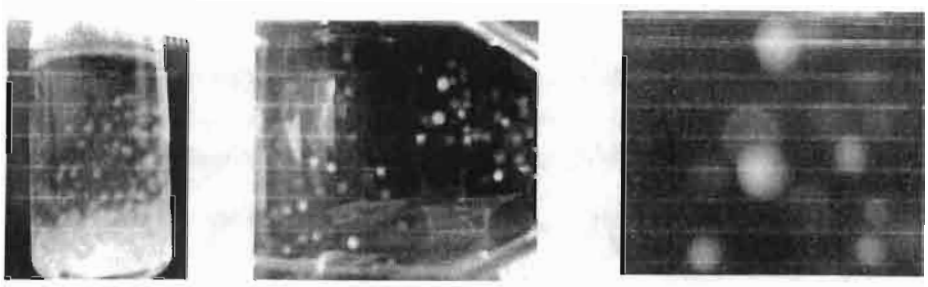


Figura 18. Diferencia de crecimiento de células inmovilizadas en alginato cálcico

Cuando la inmovilización de células se realizó con una concentración del 2% de alginato de sodio y cloruro de calcio (Fig. 19), se obtuvo una actividad xilanolítica de aproximadamente 2,1 UI/mL. Así también, se pudo observar que las perlas de alginato tienen una formación más

esférica cuando se utiliza alginato de alta viscosidad, siendo este un factor importante debido a que posteriormente las perlas de forma alargada no permitirían un buen empaquetamiento en el establecimiento del biorreactor (Smidsrod, O. y Skjak B., 1990).

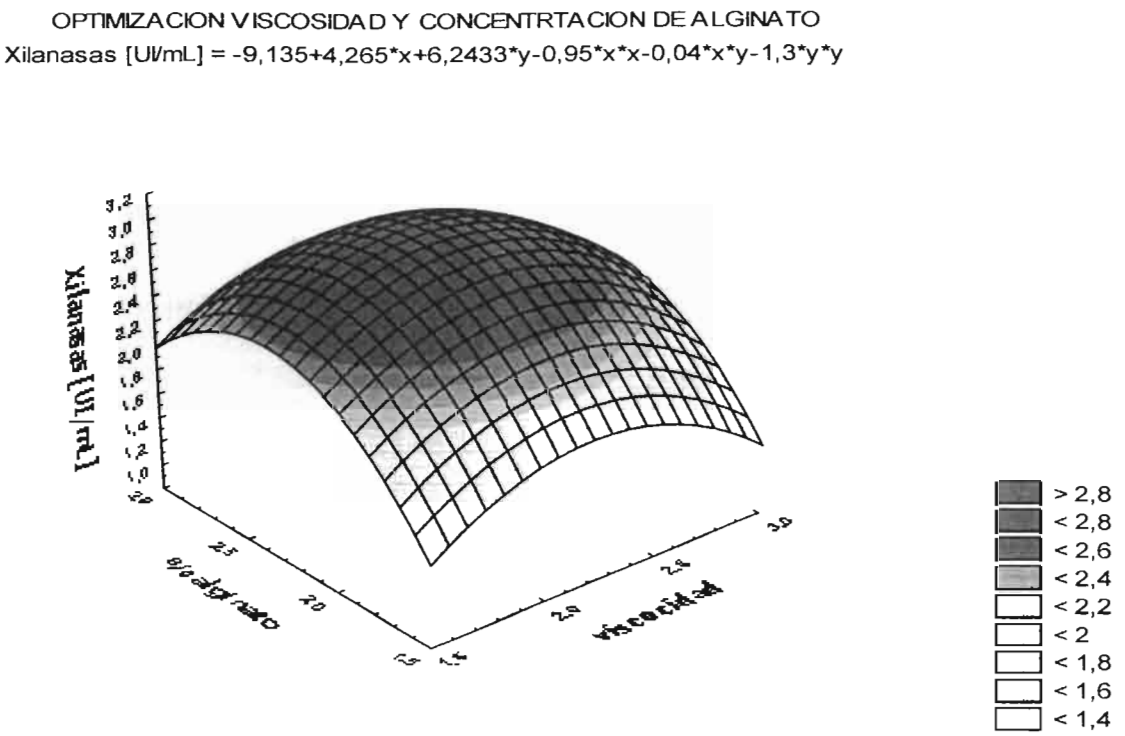


Figura 19. Influencia de la concentración y viscosidad de alginato cálcico en la producción de xilanasas

La inmovilización de las células enteras para la producción de enzimas extracelulares ofrece algunas ventajas como ser la capacidad para separar la masa celular de la mayor parte del líquido para que sea posible la reutilización, facilitando operación continua sobre un prolongado tiempo e incrementando la productividad del reactor.

7. Optimización de las condiciones de cultivo de la bacteria FT3 en relación a las fuentes de carbono y nitrógeno

Para llevar a cabo la optimización de fuente de carbono se probaron distintos residuos agrícolas, estos poseen hemicelulosa capaz de ser degradable, pero también una parte de lignina que de cierta

forma impide la hidrólisis enzimática. Es así que para poder subsanar esta dificultad se ha sometido la materia cruda a un pretratamiento.

7.1 Pretratamiento de los residuos agrícolas

Para este trabajo se ha elegido pretratar la materia cruda según el método térmico ya que otros métodos como ser el alcalino causa la solubilización de la lignina pero también de la hemicelulosa, este método seria efectivo si lo que se busca es la hidrólisis de la celulosa, ya que remueve la hemicelulosa dejando disponible celulosa para su hidrólisis. Otro método bastante utilizado es el tratamiento acido pero al igual que le anterior este nos proporciona accesibilidad a la celulosa y no así a la hemicelulosa que está constituida principalmente por xilanos y glucomananos que son de nuestro interés.

Así también existen otros métodos que permiten la liberación de hemicelulosa uno de ellos es el tratamiento con amonio. Con esta técnica se puede llegar a solubilizar la lignina y la celulosa liberando la hemicelulosa, pero para esta técnica se requieren grandes cantidades de amonio y el proceso dura de 20 a 60 días por lo que resulta inconveniente (Tam-Anh D. Nguyen *et al*, 2010). El método térmico sin embargo, es de fácil realización y causa la remoción de grandes partes de hemicelulosa al medio haciéndolas accesibles a hidrólisis enzimática, además en comparación con los métodos alcalino y acido donde se produce una serie de productos tóxicos que son después inhibitorios, los productos de la lignina removida no son tóxicos. Es así que el método empleado fue el térmico, aunque no se hicieron pruebas que certifiquen que existen mayor liberación de hemicelulosa se tomo en cuenta la literatura citada.

7.2 Optimización de la fuente de carbono y Sistema de cultivo

Para la optimización de la fuente de carbono se utilizaron hidrolizados de cascarilla de arroz, paja de trigo, paja de quinua y residuos de soya, pretratados por el método térmico y para el sustrato de comparación se utilizó xilano comercial. La concentración utilizada fue de 20 g/L de materia

cruda, que después del proceso de hidrólisis por alta temperatura y presión (1 atm x tiempo autoclave), fue filtrada y añadida al medio 11.

En cultivos con células libres, la utilización de diferentes fuentes de carbono parece no influir en la expresión de la actividad xilanolítica la diferencia no es significativa entre las distintas fuentes probadas, sin embargo por los datos obtenidos se puede observar que cuando se utiliza residuos de soya la actividad xilanolítica es mayor en comparación a los otros sustratos. Además de ello este residuo agrícola es generado en grandes cantidades en nuestro país y no tiene ninguna utilidad hasta la fecha, por lo que fue seleccionado como fuente de carbono en los siguientes experimentos (Fig. 20). Para llevar a cabo la optimización de fuente de carbono en los experimentos con células encapsuladas se tomo como referencia el mejor sustrato resultante en la optimización de los experimentos con células libres.

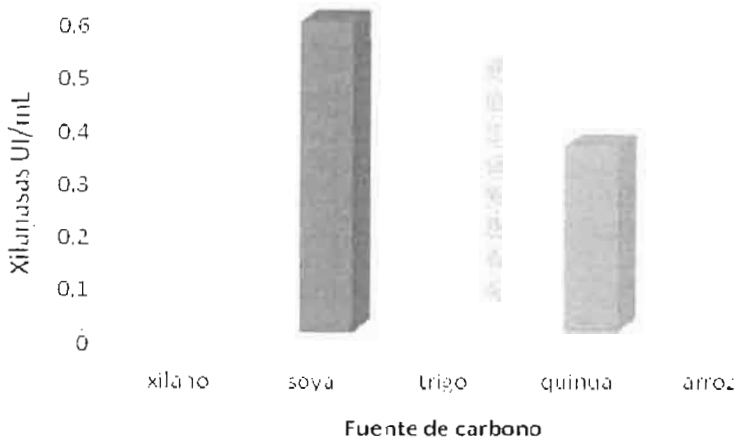


Figura 20. Optimización del tipo fuente de carbono en sistema de cultivo de células libres y encapsuladas

Tabla 11. Significancia estadística del tipo de Fuente de carbono en sistema de cultivo de células libres y encapsuladas

Univariate Tests of Significance for Xilanasas UI/mL (Spreadsheet1) Sigma-restricted		
	F	p
Intercept	7349,392	0,000000
Sistema de cultivo células libres/encapsuladas	792,202	0,000000
Tipo de fuente de carbono	56,900	0,000000
Sistema de cultivo células libres/encapsuladas*Tipo de fuente de carbono	7,702	0,000631
Error	0000	00

Se ha probado diferentes concentraciones de sustrato determinadas por los valores de DQO en el hidrolizado (pretratamiento térmico), de residuos de soya. Según los resultados se tiene la máxima actividad xilanolítica de 2.85 UI/mL cuando la fuente de carbono esta a una concentración de 1.05 g/L (Fig. 21) que es la mitad de la concentración que habitualmente se utiliza en el medio. Este hecho puede haberse dado ya que durante el pretratamiento se forman también otros compuestos tales como grupos furanos, que resultan inhibitorios para la actividad enzimática, por lo que a mayores concentraciones estos compuestos pueden tornarse inhibitorios.

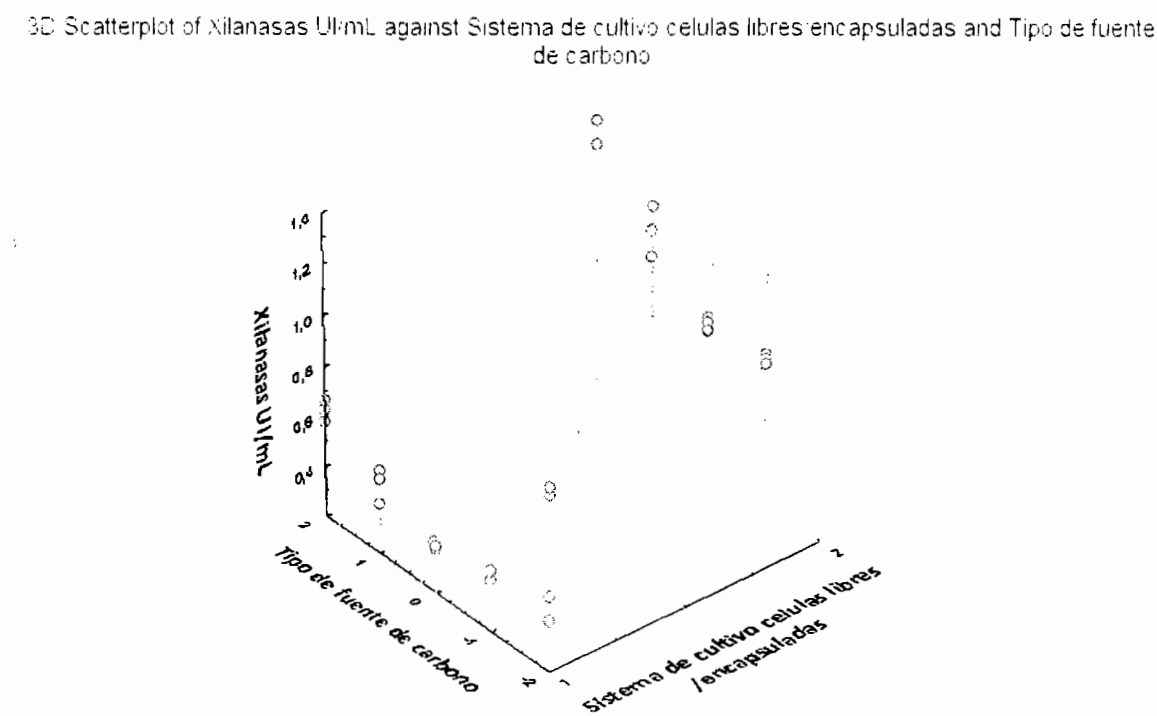


Figura 21. Optimización del tipo de fuente de carbono en sistema de cultivo de células libres y encapsuladas donde -2 representa a cascarilla de arroz, -1 paja de quinua, 0 xilano comercial, 1 paja de trigo, 2 residuos de soya; y en el sistema de cultivo 1 cultivo de células libres y 2 cultivo con células encapsuladas

En cuanto al rendimiento de producción los resultados demuestran que existe mayor rendimiento cuando se utiliza como fuente de carbono residuos de soya presentando un valor de 0.08 mUI (Tabla 12) por gramo de biomasa y una velocidad de consumo de sustrato de 1.3 g/h. En la figura 21 se debe notar que los valores del intercepto 2:-2 que corresponden al experimento probado empleando cascarilla de arroz en cultivo encapsulado, no se puede graficar ya que la desviación estándar de los experimentos triplicados es demasiado grande.

Tabla 12. Rendimiento de producción
Optimización Fuente de Carbono

Fuente de Carbono	μ [h -1]	qs [mg/g h]	Y p/s [UI/g]
Paja de quinua	0,022	892	1,8E-05
Paja de trigo	0,022	1186	2,3E-05
Residuos de soya	0,022	1312	8,0E-05
Xilano	0,022	2034	1,9E-05

De acuerdo con otras investigaciones (Park *et. al*, 2002; Asha and Prema 2006) la actividad enzimática incrementa cuando los residuos de soya son usados como fuente de carbono ya que este sustrato es considerado como una fuente balanceada de proteína en términos de composición y accesibilidad, los otros residuos probados presentan grandes cantidades de lignina por lo que dificulta la liberación de hemicelulosa,

Con este experimento se concluye que las condiciones optimas para la producción de xilanasas por el aislado FT3, es el sistema de cultivo con células encapsuladas y usando como fuente de carbono residuos de soya.

7.3 Optimización de la fuente de nitrógeno y Sistema de cultivo

Para la optimización de fuente de nitrógeno del medio de cultivo se tomo como referencia la concentración de nitrógeno del medio mineral 11, es así que las fuentes de nitrógeno probadas: urea, nitrato de sodio, y extracto de levadura fueron probados a una concentración de 100 g/L en la solución A de la cual se utiliza 10 ml/L de medio de cultivo, es decir a una concentración final de 1g/L.

Es importante considerar la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo ya que está relacionado en varias rutas metabólicas y depende de la disponibilidad de ésta para la síntesis de los productos de interés. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. En este experimento se determinó que las distintas fuentes de nitrógeno no tienen influencia en cuanto a la expresión de la actividad xilanolítica, en cultivos con células en suspensión. Cuando el cultivo de células encapsuladas existe alta actividad xilanolítica una vez que es suplementado con extracto de levadura llegándose a obtener hasta 1,2 UI/mL (Fig. 22) por lo tanto cuando se realizó la evaluación estadística se evidencio una diferencia significativa con las otras fuente de nitrógeno con una probabilidad $p \leq 0.01$ (Tabla 13). Concluyendo de esta manera que la mejor fuente es el extracto de levadura.

Tabla 13. Análisis de varianza de la relación entre la Fuente de nitrógeno y el sistema de cultivo: células libres y encapsuladas

Univariate Tests of Significance for Xilanasas [UI/mL] (Spreadsheet1			
	Degr. of - Freedom	**F**	**p**
Sistema de cultivo Libres/encapsuladas	1	19,6258	0,000420
Fuente de Nitrógeno	3	33,3960	0,000000
Cultivo*Fuente de Nitrógeno	3	30,3259	0,000001

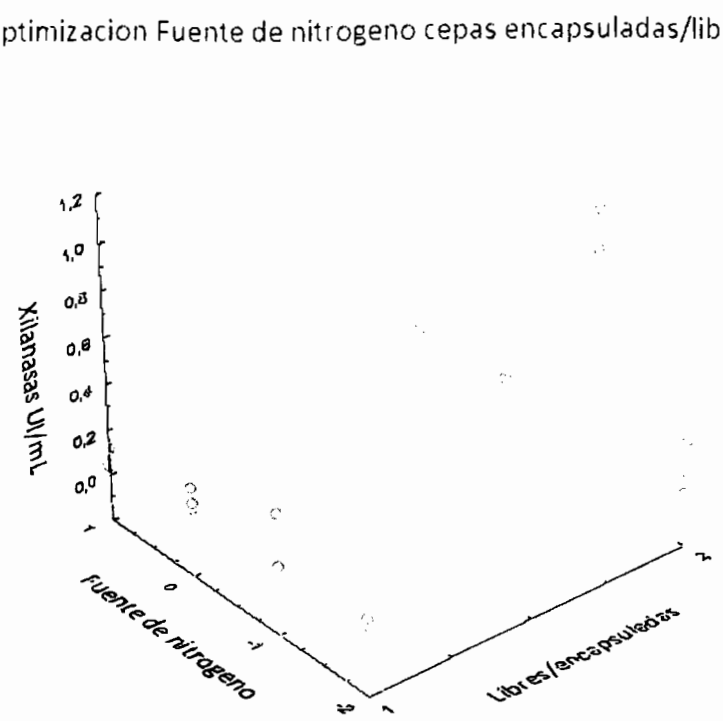


Figura 22. Producción de xilanasas dependiente de la relación entre la fuente de nitrógeno: 1 (nitrato de sodio); 0 (cloruro de amonio); -1 (extracto de levadura); -2 (urea) y el sistema de cultivo en células libres (1) o encapsuladas (2)

A partir de este análisis se concluye que el mejor sistema de cultivo para la bacteria FT3 es la encapsulación en alginato de calcio y la presencia de extracto levadura como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.

Producción de la enzima endoxilanasa en batch durante la optimización de las fuentes de nitrógeno en cultivos de células libres y encapsuladas

La bacteria Ft3, fue cultivada en condiciones batch a una temperatura de 60° C usando como fuente carbono xilano y como fuente de nitrógeno fueron probados urea, nitrato de amonio, cloruro de amonio, extracto de lavadura, en este sistema fueron evaluados los valores de rendimiento de producción en cuanto a la actividad enzimática y se obtuvo que a una velocidad de crecimiento de 0.02 se tiene mayor consumo de sustrato siendo este de 543.2 mg de sustrato por hora cuando la fuente nitrógeno es urea, pero en cuanto al rendimiento de producción el mayor fue de 0.057 mUI (Tabla 14) por gramos de biomasa que se obtiene cuando se trabaja con extracto de levadura, sin embargo la diferencia con el cloruro de amonio, la fuente de nitrógeno estándar, no es significativa.

Tabla 14. Rendimiento de producción
Optimización fuente de nitrógeno –Células libres

Fuente de Nitrogeno	qs mg/g*h	Y p/s mUI/g
Urea	543,2	0,027
Ext. de levadura	422,87	0,057
Nitrato de sodio	451,57	0,037
Cloruro de amonio	457,9	0,052

Por otro lado cuando las células están encapsuladas se ve que incrementa el rendimiento de producción cuando se utiliza como fuente de nitrógeno el extracto de levadura siendo este de 0.13 mUI (Tabla 15) por gramo de biomasa con una velocidad de consumo de sustrato de 412.9 mg de sustrato por hora y una velocidad de crecimiento de 0.22 h-1.

Tabla 15. Rendimiento de producción
Optimización fuente de nitrógeno –Células encapsuladas

Fuente de Nitrogeno	qs mg/g*h	Y p/s mUI/g
Urea	406,5	0,093
Ext. de levadura	412,9	0,13
Nitrato de sodio	891,3	0,031
Cloruro de amonio	373,7	0,043

El extracto de levadura es una fuente compleja por lo que libera iones NH4+, lo cual estimula el crecimiento (Forage *et. al*,1995) y al mismo tiempo incrementa la producción enzimática porque inhibe las proteasas naturales a bajas concentraciones (Mukesh *et. al*, 2008). En otras investigaciones se ha encontrado que usando fuentes complejas, como en este caso la actividad enzimática incrementa de manera significativa. Es así, que en el trabajo desarrollado por Ariffin et al, 2007 la actividad celulolítica producida por *Bacillus pumilus* incremento hasta tres veces, en otros casos como es el estudio realizado por Seyis y Aksoz, 2005 la producción xilanolítica por *Trichoderma harzianum* se incremento hasta en un 50 %.

7.4 Optimización de las concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno

En cuanto a la optimización de las concentraciones de fuente de nitrógeno y fuente de carbono seleccionadas anteriormente, en cultivo con células libres se ha determinado que la diferencia de l

as concentraciones de ambas fuentes es influyente en la actividad xilanolítica mostrando mayor actividad cuando se trabaja con 5 g/L de residuos de soya como fuente de carbono y 0.2 g/L de extracto de levadura como fuente de nitrógeno la diferencia fue significativa con un p menor a 0,05 (Tabla 16).

Tabla 16. Optimización conjunta de las concentraciones de Fuente Nitrógeno y Fuente de Carbono

Analysis of Variance (Spreadsheet7) Marked effects are significant at p < ,05000		
Difference concentration	**F**	**p**
Fuente de nitrógeno Vs Fuente de carbono	75,60594	0,000003

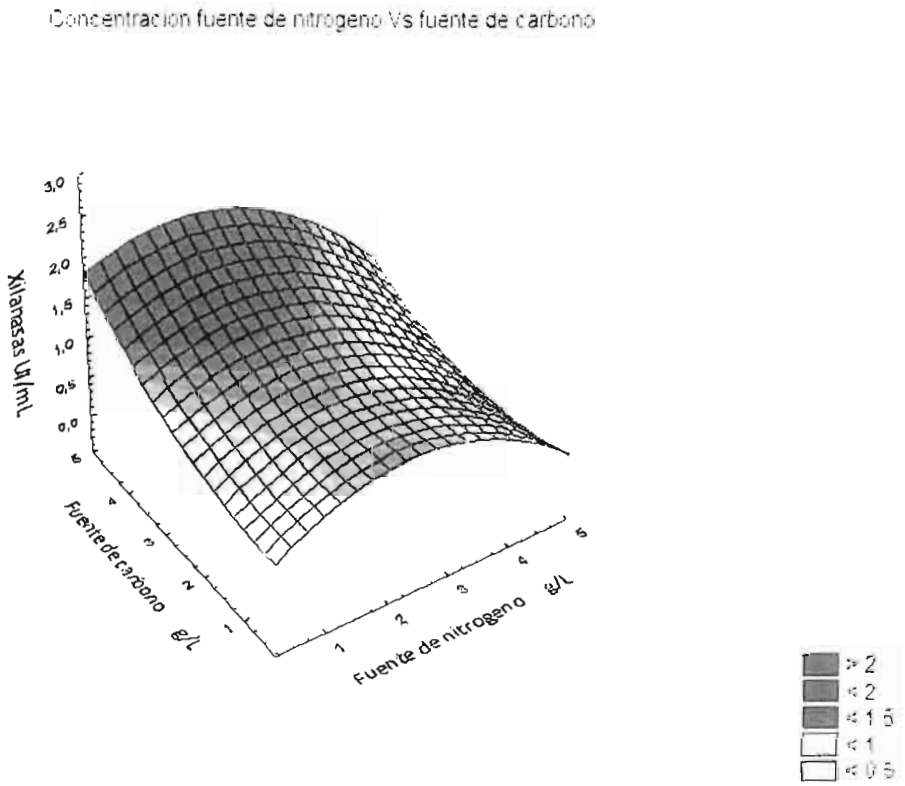


Figura 23. Optimización de concentraciones de Fuente de Nitrógeno y Fuente de Carbono, 1corresponde a 0,2g/L; 2 a 0,4 g/L; 3 a 1 g/L; 4 a 2,5g/L y 5 a 5 g/L

De acuerdo a los resultados obtenidos, fue determinado que las condiciones optimas para la producción de enzimas xilanolíticas por la bacteria FT3, es el sistema de cultivo encapsulado usando 5 g/L de residuos de soya como fuente de carbono y 0,2 g/L de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

8. Cultivo continuo

De acuerdo a los datos obtenidos, la bacteria FT3 presenta una velocidad de crecimiento de 0.018 horas^{-1} en condiciones de cultivo en batch (Tabla 17). Para mantener las condiciones de biomasa, sustrato y actividad xilanolítica constantes en el cultivo continuo, el flujo de alimentación para este sistema fue de 0.18 mL/h para permitir que el medio de alimentación sea lo suficientemente consumido; ya que a un flujo mayor el sustrato pasaría tan rápido que las bacterias no podrían utilizarlo y por lo tanto la concentración de células disminuiría, entonces todos estos factores se tomaron en cuenta para mantener una concentración constante de células y por ende la producción de enzimas xilanolíticas. Tomando en cuenta el valor de Tao (τ) el tiempo de residencia fue de 140 horas, todos estos parámetros permitieron mantener estable el biorreactor.

Tabla 17. Condiciones determinadas para el funcionamiento del biorreactor

Cinética de crecimiento			
Condiciones Bioreactor			
μ [h^{-1}]	Flujo [mL/h]	τ [h]	Tiempo de Residencia [h]
0,018	0,18	47	140

8.1 Diseño de biorreactor

En los procesos de cultivo en batch los microorganismos presentan fases definidas durante su crecimiento y por ende de producción enzimática, una de las mejores formas de incrementar dicha producción es el establecimiento de cultivos continuos que nos permitan mantener una producción constante. La bacteria FT3 mostró un incremento notable de actividad xilanolítica en cultivo continuo en comparación al cultivo en batch dando un incremento de 3 veces. La optimización de

la producción enzimática se realizo mediante dos cambios fundamentales en el medio de cultivo, en una primera fase se llevo a cabo el cultivo en condiciones batch en el biorreactor ya armado, como se especifica en materiales y métodos (Fig.24 A), luego se procedió a dar alimentación continua con un flujo de alimentación de 0.22 mL/h teniendo como tiempo de retención 140 horas para mantener estable el biorreactor en proceso continuo. Durante este tiempo se realizaron determinaciones de actividad xilanolítica y producción de xilosa, (la determinación de este azúcar fue realizado con el método de DNS para azucares reductores). En una segunda fase (Fig.24 B), como parte de la optimización de la actividad enzimática se cambio la fuente de nitrógeno de NH_4Cl por extracto de levadura a una concentración de 1 g/L tomando en cuenta la proporción de nitrógeno en ambas fuentes. El extracto de levadura fue seleccionado dado que mostró ser la mejor fuente de nitrógeno en cultivos en batch, en experimentos llevados a cabo con la misma bacteria bajo las mismas condiciones de pH y temperatura, como fue demostrando previamente en este estudio.

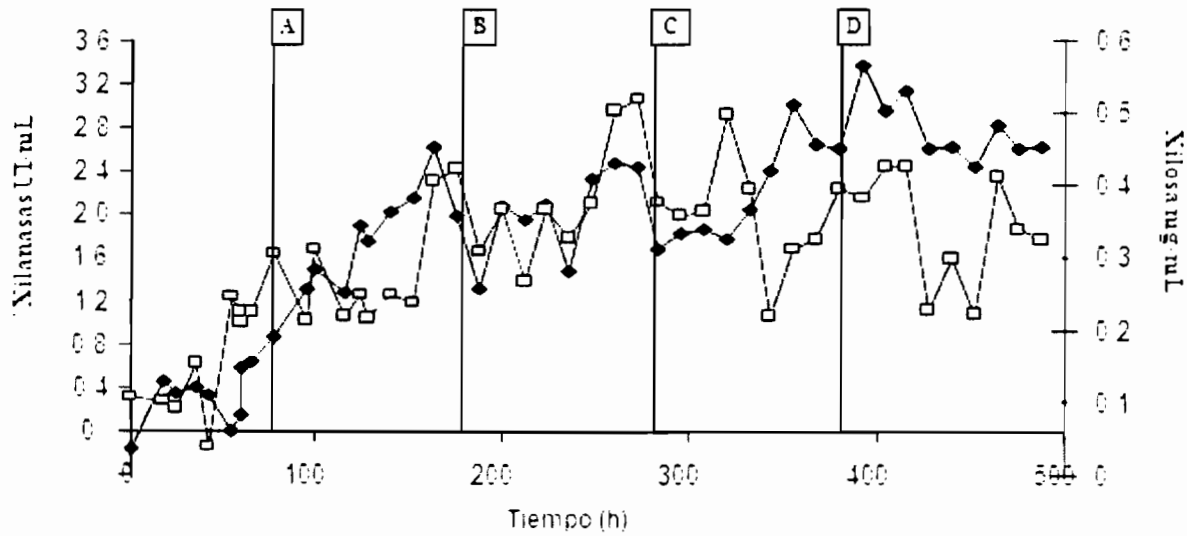


Figura 24. Producción de xilanasas (♦) y producción de azucares totales (○) en cultivo. A) Cultivo continuo con células encapsuladas Fuente de Carbono xilano (2g/L) y Fuente de Nitrógeno cloruro de amonio (1g/L), B) Medio con Fuente de Carbono xilano (2g/L) y Fuente de Nitrógeno extracto de levadura (1g/L), C) cambio en la fuente de carbono residuos de soya D) Concentraciones optimizadas de residuos de soya 5 g/L y extracto de levadura 0,2 g/L

Así también, se puede observar en la figura (24 C) cuando el cultivo fue suplementado con hidrolizado de residuos de soya la actividad xilanolítica llega hasta un máximo de 3 UI/mL, siendo esta menor que en el anterior ciclo. En la última parte (Fig. 24-D) la actividad tiene un pequeño incremento 3.3 UI/mL sin embargo, en esta etapa la actividad muestra mayor estabilidad en el tiempo.

CAPITULO VII.

CONCLUSIÓN

En muchos trabajos se ha visto que el proceso de inmovilización facilita la producción de ciertos metabolitos de interés tal es el caso de *P. fluorescens* que estimula su producción de sideroforo cuando se encuentra encapsulada ya que consigue proteger las células de la toxicidad y sobretodo minimizar la inhibición de síntesis sideroforo en medio que contiene Fe (II) (Armelle *et al.*, 2006). Así también la estabilidad enzimática de ciertos microorganismos ha podido ser incrementada gracias a la inmovilización es así que la proteasa alcalina producida por *Aspergillus oryzae* puede ser estable a altas temperaturas o condiciones ácidas o básicas o lo que también incrementa la posibilidad de usar esto en varias aplicaciones como ser la síntesis de péptidos para la desproteinización del langostino y cangrejo y la limpieza de un sistema de membrana de ultrafiltración (Jitender *et al.* , 2006).

Por otro lado se ha demostrado la supervivencia de células inmovilizadas en perlas de alginato, demostrando de esta manera que esta técnica de cultivo parece ser un proceso apropiado para procesos de producción, conservación e inclusive bioremediación. (Armelle *et al.*, 2006).

En este estudio se ha comprobado que la bacteria FT3 tiene actividad hidrolítica ya que presenta actividades xilanolíticas significativas comparables con otros estudios (Han Xiao.fang *et al.*, 2004; Ernest *et al* 1990). Por otro lado, el hecho de que la actividad CMCasa no es detectable, hace interesante a esta bacteria por su potencial para aplicaciones posteriores.

Así también, se ha visto que si bien el proceso de inmovilización celular pareciera ser una solución para incrementar la producción enzimática, podría interferir en ésta si no se toma en cuenta las condiciones correctas de la matriz a ser utilizada.

En este trabajo la actividad xilanolítica de la bacteria FT3 fue incrementada cuando se estableció el cultivo continuo con células encapsuladas en alginato de calcio, pero esta actividad fue mejorada cuando se cambio la fuente de nitrógeno y carbono por aquellas optimizadas en batch. Es así que tomando en cuenta las condiciones de cultivo continúo con la bacteria FT3 encapsulada y utilizando extracto de levadura 0,2 g/L y residuos de soya 5g/L, se alcanzo una actividad

xilanolítica de 3,3 UI/mL. Se espera poder incrementar más aun esta actividad xilanolítica cambiando otros factores importantes como inhibidores o inductores de la misma.

REFERENCIAS

1. Antranikian, S. Extremophilic archaea and bacteria as source of hydrolases of industrial interest .Technical University Hamburg-Harburg, Hamburg, GERMANY
2. Armelle Braud, Karine Je´zequel, Marie-Anne Le´ger, Thierry Lebeau Siderophore (2006) Production by Using Free and Immobilized Cells of Two Pseudomonads Cultivated in a Medium Enriched With Fe and/or Toxic Metals (Cr, Hg, Pb) Biotechnology and Bioengineering, Vol. 94, No. 6, p. 80 -88
3. Arroyo Miguel. Inmobilized enzymes: Theory, methods of study and applications (1998) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Complutense de Madrid 28040 Madrid Ars Pharmaceutica, 39:2
4. Asha Poorna, P. Prema. (2006) Production and partial characterization of endoxylanase by Bacillus pumilus using agro industrial residues, Biochemical Engineering Journal 32 106–112
5. Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R. and Shoham, Y. (1998) Cellulose, cellulases and cellulosomes. Curr. Opin. Struct. Biol. 8, 548-557
6. Bhat y Hazlewood (2001) Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In Enzymes in faro animal nutrition .
7. Biochem. J. (2005) 385, 581-588 (Printed in Great Britain) 581
8. Birgitte K. y Ahring (2001). Effect of temperature increase from 55 to 65ºC on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure Wat. Res. Vol. 35, No. 10, pp. 2446-2452
9. Blanco Rosa M (2005). Biocatalizadores inmovilizados de interes en Biotransformaciones en el ámbito de tecnología de alimentos. Instituto de Catálisis CSIC biojournal.net número 1 / febrero
10. Blas C., Mateos G.G. y Rebollar P.G. Eds FEDNA Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos (2003). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España (2ª ed.)
11. Brock Thomas D. (1998) Microbiology in Yellowstone at first focused on the basic science and ecology but gradually has expanded in scope Volume 64, Number 3, p.568
12. BULL A. (1998) BIOTECHNOLOGY FOR CLEAN INDUSTRIAL PRODUCTS AND PROCESSES Towards, Chair University of Kent United Kingdom
13. CAF., Corporación Andina de Fomento/ Centro de Promoción Bolivia CEPROBOL, 2008
14. Calvo Miguel, Bioquimica de los alimentos. Alginato.
15. Campos, A. Bonmatí, M.R. Teira, X. (2001) Flotats aprovechamiento energético de lodos residuales y purines. Producción de biogás Jornades tècniques sobre energia. Barcelona

16. CANMET Energy Technology Centre (2004). Ethanol: The"Green Gasoline". Retrieved November 2, 2005 from , CANMET Energy

17. Carrillo L. (2003) Actividad microbiana3. Microbiología Agrícola. Capítulo 3

18. Casabona Bernal J.C. (2001) Proteínas en el Infierno: Extremozimas. Universidad Nacional de Quilmas Departamento de Ciencia y Tecnología Monografía

19. Chang, V.S., Holtzapple, M.T., 2000. Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. Appl. Biochem. Biotechnol., 5–37.

20. Coutinho, P. M. y Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering

21. Diorio L. A., Forchiassin F., Papinutti V. L. y Sueldo D. V. (2003) Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina). Rev Iberoam Micol; 20: 11-15

22. Escalante-Lozada A, Gosset-Lagarda G, Martínez-Jiménez A y Bolívar-Zapata F (2004). Diversity: microbial culture-independent methods of study and biotechnological implications. Publicado Como ENSAYO en Agrociencia, 38: 583-592.

23. Extremophiles (2004) 5th International Conference on Extremophiles SEPTEMBER 19 -23, 2004 CAMBRIDGE, MARYLAND

24. Ferrer M. (2005)Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables

25. Flotats, X., Bonmatí, A., Seró, M. (1997). Clasificación de tecnologías de digestión anaerobia. Aplicación en el aprovechamiento energético de residuos ganaderos. 3r curso de ingenieria ambiental. Aprovechamiento energético de residuos orgánicos. X.Flotats (ed.). Paperkite edn., Lleida. Pag. 247-267.

26. Fondevila M. (1998) Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. Rev. Fac. Agron. (LUZ)., 15: 87-106

27. Forage R.G., Harrison D.E.F., Pitt D.E., Moo-Young M., Bull A.T., Dalton H. . Effect of environment on microbial activity, in biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine: The Principles Application and Regulation of Biotechnology. pp. 251–280.

28. Gilbert, H. J.,Crennell, S. J., Hreggvidsson, G. O. and Nordberg, K. E. (2002) The structure of *Rhodothermus marinus* Cel12A, a highly thermostable family 12 endoglucanase, at 1.8 A° resolution. J. Mol. Biol. 320, 883-897

29. Han Xiao.fang, Zheng Lian-shuanff y Xie Yi-min. (2004) Study on Screening and Cultivation Conditions of Xylanase.Producing Alkalophilic Bacterial, WUJNS Wuhan University Journal of Natural Sciences, Vol. 9 No. 1 ,125-128

30. Handelsman, J., Liles M., Mann D., Riesenfeld C., y Goodman R. M. (2002) Cloning the metagenome: cultureindependent access to the diversity and functions of the uncultivable microbial world. In: Methods in Microbiology, vol. 33. Functional Genomics. Wren, B. y N. Dorrel, (eds). Academic Press. Amsterdam, The Netherlands. pp: 241-255

31. Hansson T. y Adlercreutz P. (2001) Optimization of Galactoligosaccharide production from lactose using B- glycosidases from Hyperthermophiles.Food Biotechnology 2:15

32. Haruyuki Atomi (2005) Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. Current Opinion in Chemical Biology, 9:166-173

33. Henrissat, B. y Davies, G. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Curr. Opin. Struct. Biol. 7, 637-644

34. http://ceniap.inia.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/Agronomia%20Tropical/at2803/arti/angulo_i.htm

35. http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/alginato.html

36. http://www.bolivia.com/noticias/AutoNoticias/DetalleNoticia28197.asp

37. http://www.ingenieroambiental.com/?pagina=902

38. http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm

39. Jitender S., Avtar S., Rejesh K., Ashwani M. (2006) Partial Purification of an Alkaline Protease From a New Strain of *Aspergillus Oryzae* AWT 20 And Its Enhanced Stabilization In Entrapped Ca-Alginate Beads The Internet Journal of Microbiology. Volume 2 Number 2.

40. Jornadas tècniques sobre energía. Barcelona Noviembre (2001) APROVECHAMIENTO ENERGÉTICO DE LODOS RESIDUALES Y PURINES. PRODUCCIÓN DE BIOGÁS.

41. Keller, M., y Zengler K. (2004) Tapping into microbial diversity.Nature Reviews 2: 141-150.

42. Kim J. S., Lee Y. Y. y Torget, R. W. (2001) Cellulose hydrolysis under extremely low sulfuric acid and high-temperature conditions. Appl. Biochem. Biotechnol. 91-93

43. Koullas, D.P., Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B.J., Koukios, E.G., 1992. Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of straw. Biotechnol. Bioeng. 39, 113–116.

44. Kulasingam T. (2005) Cultivating the uncultured: amylolytic microrganisms from ecological niches.

45. Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. Appl. Biochem. Biotechnol., 1081–1099.

46. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.L., (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.

47. Marichamy S. y Mattiasson B. (2005) Rapid production of cellulase-free xylanases by solventogenic Clostridia from rumen Enzyme and Microbial Technology 37, 497-504

48. McDougald, D., S. Rice, D. Weichart, and S. Kjelleberg. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation. FEMS Microbiol. Ecol. 25: 1-9.

49. Michele Michelin, Maria de Lourdes T. M. Polizeli, Denise S. Ruzene, Daniel P. Silva, António A. Vicente, João A. Jorge, Héctor F. Terenzi, José A. Teixeira. (2008). A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate. Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR

50. Microbiología Industrial. Prof. José Merchuk Ben Gurion University Beer Sheva, Israel argentinz

51. Miller T. y Wolin M. J. A Serum Bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivating Obligate Anaerobes. Applied Microbiology, May 1974, p. 985-987, Vol. 27, No. 5

52. Morton Satin Agro-Industries and Post-harvest Management Service Agricultural Support Systems Division FAO 2002

53. Moslemy P., Guiot R., Neufeld R. J. (2002) Production of size-controlled gellan gum microbeads encapsulating gasoline-degrading bacteria Enzyme and Microbial Technology 30, 10-18

54. Mukesh Kapoor, Lavanya M. Nair, Ramesh Chander Kuhad (2008) Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora* Biochemical Engineering Journal 38; 88–97

55. Ogawa J, Shimizu S (1999) Trends Biotechnol 17:13-21.

56. Park Y.S., Kang S.W., Lee J.S. y Hong S.I., (2002) Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using experimental designs, Appl. Microbiol. Biotechnol. 58,761–767)

57. Posada Y., Pachon L., Agudelo A., Alvarez E., Diaz C., Fardeau ML., Joulian C., Livier B., Baena S. (2004) Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas de un manantial termomineral de Paipa (Boyacá) Revista Colombiana de Biotecnología Vol. VI No. 2 Diciembre 90-100

58. Puri, V.P., 1984. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. Biotechnol. Bioeng. 26, 1219–1222.

59. Rajoka Muhammad Ibrahim (2005) Hyper-production of a thermotolerant β-xylosidase by a deoxy-D-glucose and cycloheximide resistant mutant derivative of Kluyveromyces marxianus PPY 125 Process Biotechnology Vol. 8 No. 2, Issue of August 15,

60. Ramírez y Coha J.M. (2003) Degradación enzimático de celulosa por actinomicetos termófilos aislamiento caracterización y determinación de la actividad celulolítica pablo Rev. peru.biol.10 (1); 67-77

61. Rios N, Crespo C, Terrazas L, Álvarez M. Aislamiento de cepas anaeróbicas termófilas productoras de celulasas y hemicelulasas implicadas en la producción de etanol, mediante técnicas de cultivo tradicionales y no tradicionales. Rev Biofarbo. 2007; 15: 43-48

62. Rogers P. L., Jeon Y. J. y Svenson C. J. (2005). Application of biotechnology to industrial sustainability Trans IChemE, Part B, Process Safety and Environmental Protection, 83(B6): 499-503

63. Rondon M., Augist P., Bettermann A., Brady S., Grossman T., Loiacono K., Lynch B., MacNeil I. , Minor C., Lai Tiong C., Gilman M., Osburne M., Clardy J., Handelsman J., y Goodman R.(2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Appl. Environ, Microbiol. 66: 2541-2547.

64. Rumino C., Schöbitz R, Ciampi L, y Vignolo G. Encapsulación de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas antagonistas en contra de Listeria monocytogenes

65. Scientia et Technica Año XIII (2007) ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LA CASCARILLA DE ARROZ.No 37, Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701

66. Senior, E. y Balba, M. T. M. (1990) Refuse decomposition. In: Senior, E. (ed.) Microbiology of landfill sities. CRC Press, Boca Raton, FL, 18-57.

67. Sittenfeld A, Hernández-Chavarría F, Uribe-Lorio L y Mora Marielos (2003) La microbiología y la vida en los extremos. Revista Colombiana.

68. Sriamornsak P y Sungthongjeen S. (2007) Modification of Theophylline Release With Alginate Gel Formed in Hard Capsules structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy. AAPS PharmSciTech.; 8(3)

69. Sulzenbacher, G., Mackenzie, L. F., Wilson, K. S., Withers, S. G., Dupont, C. y Davies,G. J. (1999) The crystal structure of a 2-fluorocellotriosyl complex of the Streptomyces lividans endoglucanase CelB2 at 1.2 A° resolution. Biochemistry 38, 4826-4833

70. Tam-Anh D. Nguyen, Kyoung-Rok Kim, Se Jong Han, Hwa Young Cho, Jin Woo Kim, Sung Min Park, Jae Chan Park, Sang Jun Sim (2010) Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocelluloses conversion to fermentable sugars. Bioresource Technology 101; 7432–7438

71. Tiedje, J. M., y Stein J. L. (1999) Microbial diversity: strategies for its recovery. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Demain A. L. and J. E. Davies (eds). ASM Press. Washington, D.C. USA. pp: 682-692.

72. Torsvik, V., Øvreås L., y Thingstad T. F. (2002) Prokaryotic diversity- Magnitude, dynamics, and controlling factors. Science 296: 1064-1066.

73. Torsvik, V., y Øvreås L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Current Opinion Microbiol 5:240-245.

74. Turner P., Mamo G. y Nordberg E. (2007) Potential and utilization of Thermophiles and thermostable enzymes in biorefining Microbial Cell Factories, 6:9

75. Usama Beshay (2003) Production of alkaline protease by *Teredinobacter turnirae* cells immobilized in Ca-alginate beads. Biotechnology Vol. 2 (3), pp. 60-65

76. Watts, J. E. M., Huddleston-Anderson A. S., y Wellington E. M. H. (1999) Bioprospecting. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Demain, A. L., and J. E. Davies (eds). ASM Press. Washington, D.C. USA. pp: 631- 641.

77. Yabur R., Bashan Y. y Hernandez G. (2007) Alginate from the macroalgae Sargassum sinicola as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion J Appl Phycol 19:43-53

78. Yadvika, Santosh , T.R. Sreekrishnan, Sangeeta Kohli, Vineet Rana (2004) Bioresource Technology 95 1-10

79. Yiwei HUANG et al.. A highly acid-stable and thermostable endo-B-glucanase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*

80. Youssef Zeroual, Adnane Moutaouakkil, Mohamed Blaghen (2001) Volatilization of Mercury by Immobilized Bacteria (*Klebsiella pneumoniae*) in Different Support by Using Fluidized Bed Bioreactor CURRENT MICROBIOLOGY. Vol. 43 pp. 322-327

81. Zengler K., Toledo G., Rappe M., Elkins J., Mathur E. J., Short J. M., y Keller M. (2002). Cultivating the uncultured. Proc. Natl. Acad. Sci. USA99:15681–15686.

ANEXOS

Anexo.1 Medios de cultivo

Médio mineral basal 11

Solución	Composición	Cantidad
Solución A	NH_4Cl	200g/L
	NaCl	10 g/L
	$MgCl_2*6H_2O$	10 g/L
	$CaCl_2*2H_2O$	5 g/L
Solución B	$K_2HPO_4*3\ H_2O$	200 g/L
Solución 2	$FeCl_2*4H_2O$	1.5 g
	H_3BO_3	60 mg
	HCl (25 %)	6.5 mL
	$CoCl_2*6H_2O$	120 mg
	$MnCl_2*4H_2O$	100 mg
	$Na_2MoO_4*2H_2O$	25 mg
	$NiCl_2*6H_2O$	25 mg
	$ZnCl_2$	70 mg
	$CuCl_2*2H_2O$	15 mg
	Agua destilada csp	1000 mL
Solución 3	Na_2SeO_3	3 mg
	NaOH	0.5 g
	Agua destilada csp	1000 mL
Solución 4	$NaHCO_3$	8.5 g/100 mL
Solución 7	Biotina	1 mg
	PABA	5 mg
	Vit. B_{12}	5 mg
	Tiamina	10 mg
	Agua destilada csp	1000 mL
Solución reductora	Tioglicolato de sodio	2 %

El medio 11 es preparado en las siguientes proporciones:

Solución A	*10 mL*
Solución B	2 mL
Solución 2	1 mL
Solución 3	1 mL
Solución 4	30 mL
Solución 7	0,1 mL
Solución reductora	2 mL
Agua destilada	c.s.p. 1000 mL

Tanto la solución 7 como la solución reductora fueron añadidas de forma estéril después que el medio fuera esterilizado por autoclave.

Medio 11 modificado para encapsulación

Solución	Composición	Cantidad
Solución A	NH_4Cl	200 g/L
	NaCl	10 g/L
	$MgCl_2*6H_2O$	10 g/L
	$CaCl_2*2H_2O$	**10 g/L**
Solución B	**Tris- HCl**	**1 M**
Solución 2	$FeCl_2*4H_2O$	1.5 g
	H_3BO_3	60 mg
	HCl (25 %)	6.5 mL
	$CoCl_2*6H_2O$	120 mg
	$MnCl_2*4H_2O$	100 mg
	$Na_2MoO_4*2H_2O$	25 mg
	$NiCl_2*6H_2O$	25 mg
	$ZnCl_2$	70 mg
	$CuCl_2*2H_2O$	15 mg
	Agua destilada csp 1000 mL	
Solución 3	Na_2SeO_3	3 mg
	NaOH	0.5 g
	Agua destilada csp 1000 mL	
Solución 4	$NaHCO_3$	8.5 g/100 mL
Solución 7	Biotina	1 mg
	PABA	5 mg
	Vit. B_{12}	5 mg
	Tiamina	10 mg
	Agua destilada csp 1000 mL	
Solución reductora	Tioglicolato de sodio	2 %

Las proporciones del medio 11 modificado para el cultivo con células encapsuladas fueron las mismas que e medio 11 original.

Anexo.2 Técnicas analíticas

Determinación de celulasas y xilanasas por la técnica de DNS

Preparación del buffer citrato:
Solución A: 0.05 M citrato sódico monohidratado (1.05g/100mL)
Solución B: 0.05 M citrato trisódico (1.47 g/ 100 mL)
Para el buffer mezclar 220 mL de la solución A, con 330 mL de la solución B. Ajustar el pH a 4.8

Preparación del buffer fosfato:
Solución A: 0.2 M hidróxido de sodio (2g/250 mL)
Solución B: 0.2 M fosfato ácido de sodio (6g/250mL)
Para el buffer fosfato mezclar 5.8 mL de la solución A, con 50 mL de la solución B, enrasar a un volumen de 100 mL con agua destilada. Ajustar el pH a 6

Preparación d la solución de DNS:
Disolver 10 g de hidróxido de sodio y 0.5 g de sulfato de sodio
Añadir 0.2 g de fenol, diluir y añadir 200g de tartrato de sodio y potasio, finalmente añadir 10 g de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicilico), para un volumen final de 1L
Preparación de sustratos:
El sustrato CMC se utiliza para la determinación de celulasas, se disuelve 0.2 g de CMC en 100ml de buffer citrato, luego ajustar a pH 4.8
El sustrato xilano se utiliza para la determinación de xilanasas, disolver 0.2 g de xilano en 100mL de buffer fosfato, ajustar a pH 6

Interpretación de resultados.-
Test- Control = Abs real
Para determinar la concentración interpolar el dato obtenido en la recta de la curva de calibración.
Se debe realizar curva de calibración para celulasas y xilanasas

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

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

Incubar a 100 °C por 5 minutos
Dejar enfriar a temperatura ambiente
Leer al espectrofotómetro 540 nm
La concentración se debe expresar en UI/mL

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

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

Preparación del buffer:
Preparar 50mM de citrato de sodio y ajustar el pH a 5

Interpretación de resultados.-
Se debe realizar una curva de calibración con p-nitrofenol a un pH y una longitud de onda determinada luego se debe interpolar los datos en la curva y posteriormente expresa en UI/mL
$E_{405\ nm}$ pH 5 =0.0002 μM cm-1

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

Determinación de proteínas totales

Reactivo A o Lowry
1. Carbonato sódico 2% en 0.1 N de NaOH
2. Sulfato cúprico 1% en agua destilada
3. Tartrato de sodio y potasio 1% en agua destilada
Mezclar estas soluciones en la siguiente proporción:
10 (1) : 0,1 (2) : 0,1(3)

Reactivo B o Folin
Ciacalteu diluido en agua destilada en una proporción 1:1

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

Determinación de COD

Materiales.-
Matraz aforado (ambar)
Tubos con tapa rosca (15x100 mm)
Equipos.-
Termobloque
Reactivos.-
Dicromato de potasio
Ácido sulfúrico
Sulfato de mercurio
Sulfato de plata
Sal de Moh
Ferroína

Procedimiento.-
Solución de digestión:
Pesar 4.913 g de dicromato de potasio (previamente secado a 103°C por 2 horas)
Disolver en 500 mL de agua destilada
Añadir 167 mL de ácido sulfúrico concentrado
Añadir 33.3 g de sulfato de mercurio
Enrasar a 1000 mL con agua destilada
Guardar en frasco ámbar

Solución B:
Pesar 5.5 g de sulfato de plata, y diluir con 1000 mL de ácido sulfúrico concentrado

Solución FAS o solución titulante:
Pesar 39.2 g de sal de Mohr, diluir en 200 mL de agua destilada
Añadir 20 mL de ácido sulfúrico concentrado
Enrasar a 1000 mL
Guardar en un frasco ámbar

	Muestra (mL)	Sol. Digestión (mL)	Sol. B (mL)	Volumen final
Muestra	2.5	1.5	3.5	7.5
Blanco digerido	2.5 (agua dest)	1.5	3.5	7.5
Blanco no digerido	2.5	1.5	3.5	7.5

Vortexear
Digerir por 2 horas a 150°C en el termobloque, o bloque d digestión

Remover los tubos y enfriar a temperatura ambiente

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

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

Interpretación de resultados.-

COD mg O_2/L = ((A-B)*M* 8000) / mL muestra

A = mL FAS gastados para el blanco digerido

B = mL FAS gastados para la muestra

M = molaridad FAS (0.10 M)

8000 = meq peso de O_2 * 1000mL/L

$$M = \frac{0.1 * \text{mL } Cr_2O_7}{\text{mL FAS B no digerido}}$$

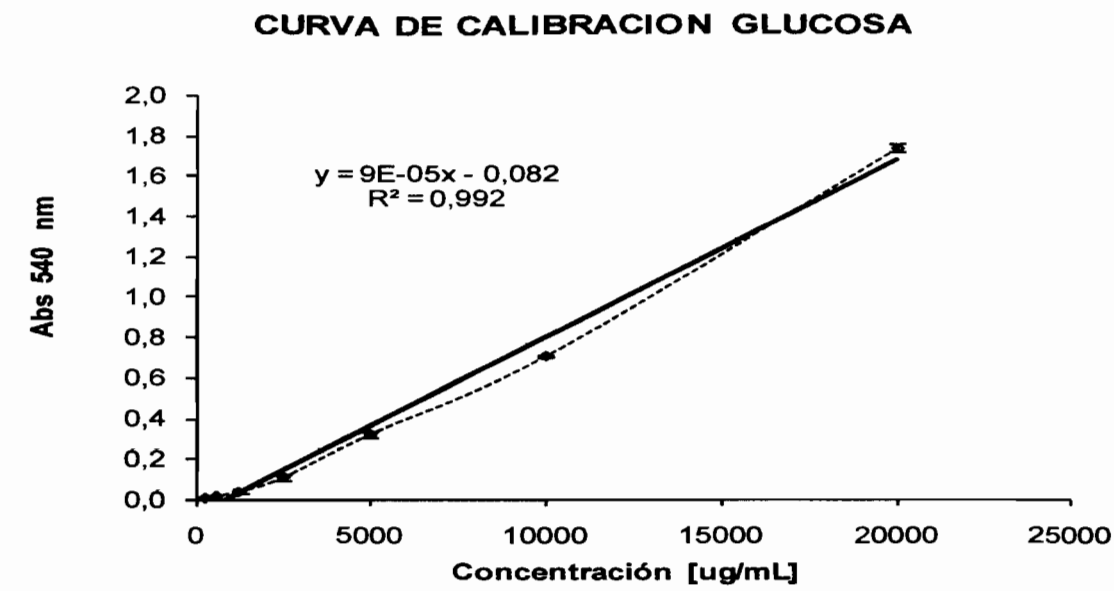
0.1 = molaridad teórica del dicromato

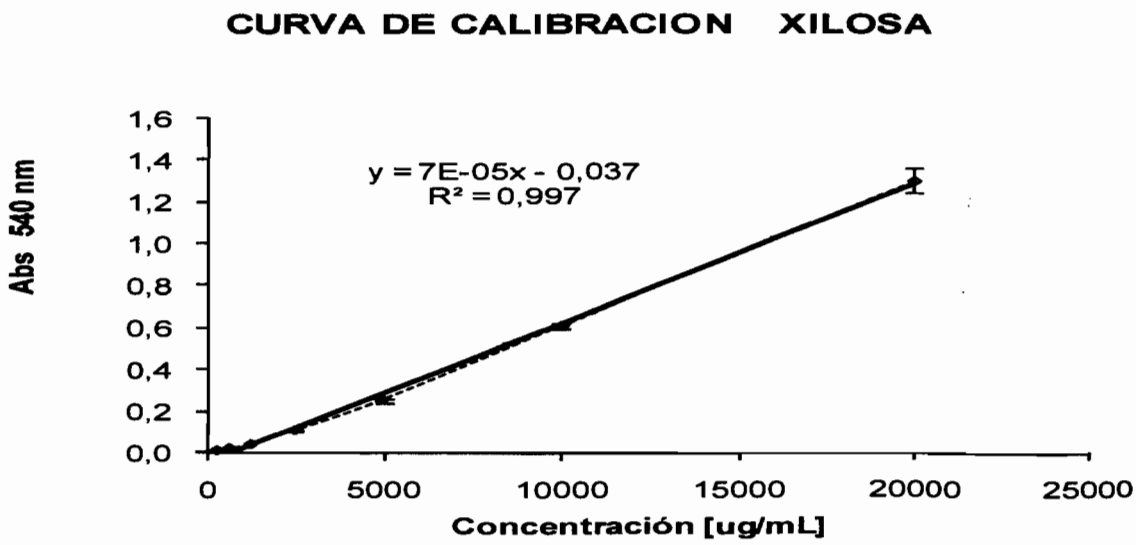
mL Cr_2O_7 = 1.5 mL

mL FAS Bnd = mL FAS gastado para el blanco no digerido

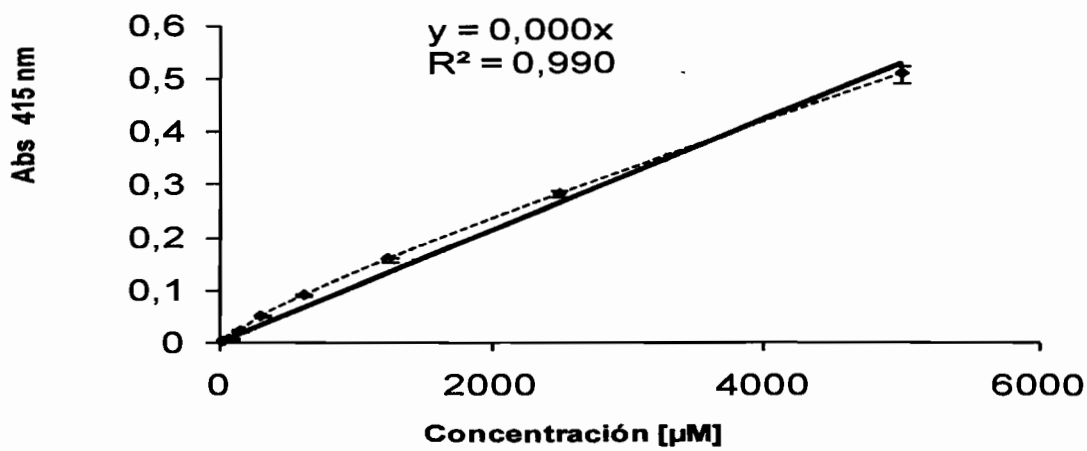
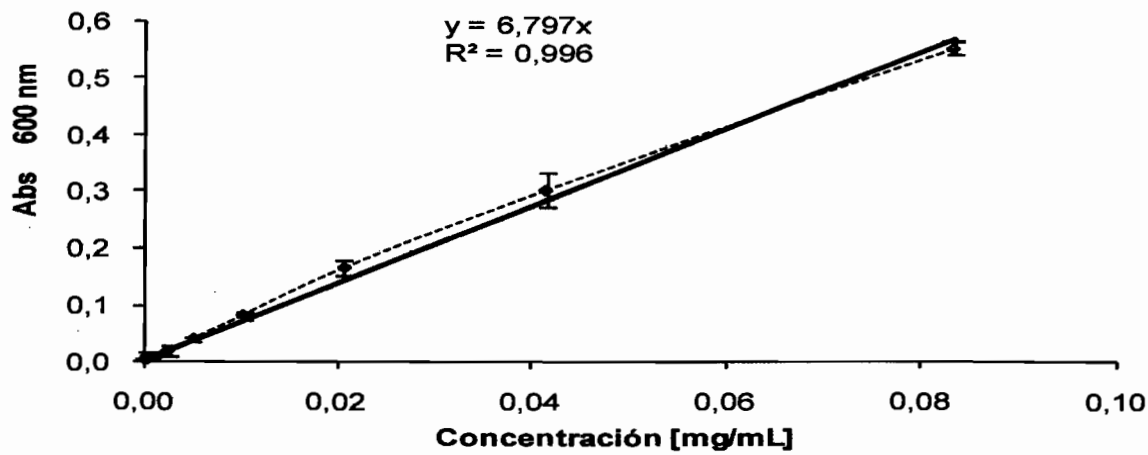
Standard Methods for the Examination of water waste water. 1992

Anexo.3 Curvas de calibración





CURVA DE CALIBRACION P-NITROFENOL



CURVA DE CALIBRACION PROTEINAS TOTALES