



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES CELULOLÍTICAS Y
PECTINOLÍTICAS DE BACTERIAS DESLIZANTES
SOBRE CÁSCARA DE DIFERENTES FRUTAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

NARENTHZY ESPERANZA DÍAZ RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO

VOCAL: MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

SECRETARIO: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

1er. SUPLENTE: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

2° SUPLENTE: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR, DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA**

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Raquel Ortega Muñoz

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Fernando Montiel Aguirre

SUSTENTANTE :

Díaz Rodríguez Narenthzy Esperanza

DEDICATORIA

A mi madre y padre que han sido el mayor motor que impulsa mi vida.

A mi hermana y hermano, mis compañeros de vida, que la llenan de alegrías día con día.

A la memoria de la maestra Margarita Díaz Torres (q.e.p.d.), el mejor ejemplo de amor, bondad, trabajo y unidad familiar. Por que sin saberlo, fue una de las personas que construyó los pilares de mi vida ... tía siempre vivirás en mi corazón y mis pensamientos.

A G R A D E C I M I E N T O S

A mis padres Esperanza Rodríguez García y Nícastio Luís Díaz Torres por el apoyo que me dan en cada momento que lo necesito y el gran amor que me brindan a diario. Siempre valoraré el enorme sacrificio que han hecho para que no nos falte nada a mis hermanos y a mí. Por enseñarnos a realizar nuestro trabajo con el mayor de los entusiasmos y demostrarnos que podemos cumplir todas nuestras metas. Los regañones, que gracias a ellos me han forjado y enseñado a madurar, haciéndome una persona de bien. Por darme la mayor herencia que los padres pueden dar, una carrera. Son los mejores padres que pude haber tenido. Este triunfo es tan mío como suyo. Los amo y admiro.

A mis hermanos Nadia Itzel Díaz Rodríguez y Luís Manuel Díaz Rodríguez, mis confidentes, mejores amigos y cómplices. Cada día aprendo tanto de ustedes y alegran mi vida con tanta ocurrencia. Son un gran ejemplo y motor para mí. Por esas desveladas trabajando en que me han acompañado, todas las ayudas que me han dado, las interminables pláticas, sus consejos. Y sobre todo permitirme compartir con ustedes cada momento de alegrías y tristezas en sus vidas. Son los hermanos más geniales que alguien puede tener. Los amo.

A mis abuelitos Victoria Torres, Rosa García, Manuel Díaz (†) y Daniel Othon, por su gran ejemplo de trabajo, unidad familiar, su gran amor y enseñanzas. A mis tíos, tías, primas, primos por su preocupación, unidad y cariño.

A mis asesores Raquel Ortega y Fernando Montiel, por apoyarme y darme las armas para la realización de este trabajo. Por que antes que verme como una alumna, me vieron como una persona. Por apoyarme e impulsarme además de la vida académica, en mi vida personal. Por que me han brindado su amistad. Gracias por toda su confianza y apoyo.

A Fabiola y Gabriela García por tantos años de amistad, su apoyo incondicional y por ser unas grandes amigas.

A los compañeros de la carrera, Julieta López, Rafael Figueroa, Verónica Rojo, Ileana Avila, Patricia Lozano, Jovani Valdovinos, Sarahí Lara, Berthia Zarate, Benjamín Soriano, Viridiana Alatorre, Andrea Majluf. Con los cuales compartí una de las mejores etapas de mi vida; las clases, los laboratorios, las interminables prácticas, momentos de estrés, momentos de diversión, el fútbol, las fiestas y por conservar esta amistad. A Adrián Vázquez, no solo fuiste un compañero de la carrera, me brindaste tu amistad, ayudas académicas, muchos momentos de diversión, el “nopalito”, todos los consejos y lo más valioso, me demostraste lo que significa ser un gran amigo, siempre te voy a querer.

A los compañeros del laboratorio, Sandra Chirino por iniciarme en el mundo de las mixobacterias, Juan Jimenez, Tanya Trejo, Azalia Santiago, Patricia Godínez, Isabel Hernández, por hacer el trabajo muy ameno, ayudarme cuando necesité en el trabajo de laboratorio y todo lo que vivimos.

A Angélica G. Pilonieta pues a pesar de tener muy poco tiempo de conocernos, me brindaste tu amistad y me abriste las puertas de tu casa. Gracias por haber hecho de mi estancia en Medellín una experiencia inolvidable. Por los consejos, las enseñanzas, las interminables pláticas, los días de trabajo que aunque eran largos, nunca fueron aburridos. A Alexander Ossa por su apoyo y calidez recibida, y abrirme también las puertas de su casa. Y de igual manera a todas las personas que me hicieron sentir como en casa durante mi estadía en Colombia.

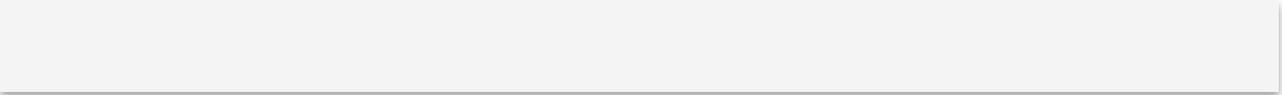
A las profesoras Olga del Carmen Velázquez Madrazo y María del Carmen Wachter Rodarte, gracias por el tiempo que se tomaron en la revisión de este trabajo, y por las valiosas correcciones para su finalización.

A la Universidad Nacional Autónoma de México pues en ella mis años de preparatoria y universidad, fueron las etapas mas bellas de mi vida. Es un orgullo pertenecer a ella ... ¡Como no te voy a querer!

Capítulo	Página
1- RESUMEN	5
2- INTRODUCCIÓN	7
2.1 GENERALIDADES	8
2.1.1 RESIDUOS ORGÁNICOS	8
2.1.2 PRODUCCIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS	9
2.1.3 RESIDUOS ORGÁNICOS DE FRUTAS Y VERDURAS	11
2.1.3.1 MANZANA	11
2.1.3.2 NARANJA	12
2.1.3.3 PERA	12
2.1.3.4 ZANAHORIA	13
2.1.4 PARED CELULAR VEGETAL	14
2.1.5 POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR	16
2.1.5.1 PECTINA	16
2.1.5.2 CELULOSA	19
2.1.6 BACTERIAS DESLIZANTES	22
2.1.6.1 MIXOBACTERIA	23
2.1.6.2 CITOFAGA	26
2.2 ANTECEDENTES	27
2.2.1 PECTINASAS	27
2.2.2 CELULASAS	32
2.2.3 APLICACIÓN DE LAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS Y PECTINOLÍTICAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	34
3- OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GENERAL	41
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	42
4- HIPÓTESIS DE TRABAJO	44

5- DISEÑO EXPERIMENTAL	45
5.1 DIAGRAMA DE FLUJO	46
5.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS AMBIENTALES	47
5.3 CRECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS DESLIZANTES	48
5.4 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS	48
5.4.1 MORFOLOGÍA COLONIAL	48
5.4.2 MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	49
5.4.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	49
5.5 ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y PECTINOLÍTICA CUALITATIVA	50
5.5.1 ACTIVIDAD CELULOLÍTICA CUALITATIVA	50
5.5.2 ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA CUALITATIVA	50
5.6 ACONDICIONAMIENTO DE DESECHOS	51
5.6.1 DESECHOS DE PERA, MANZANA Y ZANAHORIA	51
5.6.2 DESECHOS DE NARANJA	51
5.7 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y PECTINOLÍTICA PROVENIENTE DE SUSTRATOS COMPLEJOS	52
5.8 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS COMERCIALES POR DNS	53
5.9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA	54
<i>6- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	55
6.1 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	56
6.2 CRECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS DESLIZANTES	61
6.3 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS	63
6.3.1 MORFOLOGÍA COLONIAL	63
6.3.2 MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	64
6.3.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	65

6.4 ACTIVIDAD CELULOLÍTICA CUALITATIVA	67
6.5 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD EXO-CELULOLÍTICA Y EXO-PECTINOLÍTICA PROVENIENTE DE SUSTRATOS COMPLEJOS	68
6.6 EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES EXO-CELULOLÍTICAS	69
6.6.1 ACTIVIDAD EXO-CELULOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE PERA	69
6.6.2 ACTIVIDAD EXO-CELULOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE MANZANA	70
6.6.3 ACTIVIDAD EXO-CELULOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE NARANAJA	71
6.6.4 ACTIVIDAD EXO-CELULOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE ZANAHORIA	72
6.7 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DEL SOBRENADANTE EN CEPAS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA	73
6.8 EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES EXO-PECTINOLÍTICAS	75
6.8.1 ACTIVIDAD EXO-PECTINOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE PERA	75
6.8.2 ACTIVIDAD EXO-PECTINOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE MANZANA	76
6.8.3 ACTIVIDAD EXO-PECTINOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE NARANAJA	77
6.8.4 ACTIVIDAD EXO-PECTINOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE ZANAHORIA	78
6.9 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DEL SOBRENADANTE EN CEPAS CON ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA	79
6.10 COMPARACIÓN CON ENZIMAS COMERCIALES	81
<i>7- CONCLUSIONES</i>	<i>84</i>
<i>8- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>86</i>
<i>9- APÉNDICE</i>	<i>91</i>



Resumen



1

La industrialización de frutas y verduras genera una gran cantidad de desechos. Por ejemplo, en Estados Unidos, 9 millones de toneladas de residuos sólidos se generan anualmente. Tan solo los residuos sólidos de la industria de alimentos provienen generalmente de las etapas de limpieza, lavado, corte, deshuesado, pelado y descorazonado de frutas y verduras. Entre éstos se encuentran el bagazo y la cáscara; los cuales están constituidos entre otros por polisacáridos, que incluyen almidones, pectinas, celulosa, hemicelulosa, lignina, azúcares y otros.

Entre estos constituyentes están la pectina y la celulosa, polímeros compuestos por: ácidos poligalacturónicos y residuos D-glucopiranosil, respectivamente. Ambos pueden ser escindidos por complejos de enzimas denominados colectivamente pectinasas y celulasas, según corresponda. Esto conlleva a la obtención de sus monómeros. Actualmente se han aislado diferentes pectinasas y celulasas de distintas clases de organismos, encontrando aplicación en diferentes industrias como son: alimentos, farmacia, pulpa y papel, textil, entre otros.

A nivel industrial la degradación de este tipo de polisacáridos se da en un 90% por medio de microorganismos aerobios como los hongos; ejemplo de ello y el más utilizado es *Aspergillus*. Existe otro grupo de microorganismos, las bacterias, que también poseen estos complejos enzimáticos. Una gran ventaja de éstas sobre los hongos es el tiempo de crecimiento, puesto que varía entre 24 y 48 horas, a diferencia de los hongos que es de 5 a 7 días. Se ha encontrado un gran número de especies bacterianas cuyas enzimas poseen características similares y en muchos casos han demostrado superar las propiedades de las de origen fúngico.

Las cepas bacterianas más estudiadas con capacidad celulolítica son las que se obtienen a partir de muestras de tierra. Dentro de éstas se encuentran las bacterias deslizantes (Mixobacterias y Citofagas). Éstas se diferencian de las demás por su complicado

comportamiento social y multicelular, además se caracterizan por su degradación eficiente de biomacromoléculas. Se han reportado complejos celulolíticos existentes en género *Sorangium* perteneciente a *Myxobacteria* (How, P. 2004).

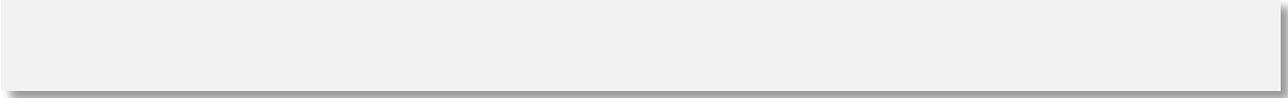
Por todo ello, en este trabajo se evaluó la capacidad de degradación de diferentes enzimas secretadas por bacterias de los grupos Mixobacteria y Citofaga.

Se logró el asilamiento de diferentes cepas de bacterias deslizantes, provenientes de muestras ambientales de diferentes suelos rurales, urbanos y semiurbanos. Se encontró una mayor incidencia en suelos urbanos (50%), siendo el género *Mixococcus* (71%) el más ubicuo.

A las cepas que se logró cultivar, se realizó primero una evaluación cualitativa de la capacidad celulolítica, se seleccionaron las cepas aisladas que presentaban una mayor actividad. Se encontraron tres cepas celulolíticas, con las que se prosiguió a evaluar su actividad por medio de la prueba cuantitativa. Lo mismo se realizó con cepas pectinolíticas aisladas en trabajos anteriores (Chirino, 2008).

La prueba cuantitativa de las cepas se realizó con el sobrenadante de los cultivos en cuatro sustratos complejos (cáscaras de: pera, manzana, zanahoria y naranja) a 28 y 30°C. La temperatura jugó un papel muy importante pues la mayoría de las cepas presentaron una mayor actividad a 28°C, con un promedio de 48 y 72 horas para llegar a su máxima actividad. Se monitoreó la cantidad de proteína secretada en el medio y ésta mostró el mismo comportamiento que la actividad celulolítica y pectinolítica.

Se comparó la actividad de estas bacterias con enzimas comerciales, y en todos los casos, fue mayor que la de enzimas comerciales.



Introducción



2

2.1 GENERALIDADES

2.1.1 RESIDUOS ORGÁNICOS

La tierra es el lugar donde se reciben los residuos que resultan de las actividades antropogénicas de la sociedad moderna. Estos residuos se pueden clasificar según el estado físico en que se encuentren. En este sentido podemos catalogarlos en tres tipos: sólidos (basura), líquidos (aguas residuales) y gaseosos. No es la única forma de clasificación, pues también pueden ser clasificados por sus características de composición y generación (Ekundayo, 2003).

En cuanto a la descomposición, la basura y las aguas residuales pueden liberar contaminación tanto orgánica como inorgánica a la tierra, provocando un deterioro al ecosistema (Onweremadu, 2007).

En su mayoría estos residuos se obtienen como un subproducto de las actividades comerciales, industriales o agrícolas. Tan sólo cerca del 40% de los residuos sólidos generados en las ciudades son materiales celulósicos o lignocelulósicos que, en su mayoría, no reciben tratamiento alguno (Delfin, 2003).

Debido a la constitución química de los desechos sólidos biodegradables, la cual está conformada fundamentalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre y además, por los contenidos de humedad que normalmente tienen, este tipo de desechos presentan entre otros, problemas como:

- Fuente de olores
- Se libera metano que es uno de los gases con efecto de invernadero que están relacionados con el cambio climático global (Cortinas, 2003).
- Ofrecen condiciones para crecimiento de patógenos e insectos que son transmisores de enfermedades. Originando la proliferación de vectores de enfermedades como moscas, mosquitos, ratas y cucarachas que encuentran en los residuos sólidos su

fuente de alimento y propician las condiciones adecuadas para su reproducción (SEMARNAT, 2001).

- Atraen roedores y aves de rapiña, los cuales son portadores de microorganismos transmisibles a los seres humanos (Cortinas, 2003)

Por lo anterior, la disposición final de los residuos orgánicos sólidos es un problema que afecta al medio ambiente en todas las regiones del mundo. Por ello actualmente se buscan alternativas de usos de estos residuos, aplicando métodos biotecnológicos para reducir su volumen (Canche-2005).

Entre las técnicas de reducción biológica de la masa de los residuos lignocelulósicos se usan el compostaje (por vía aeróbica), alimentación para ganado, producción controlada de biogás (por vía anaeróbica), fermentaciones en estado líquido y la aplicación de enzimas purificadas (Dorio, 2003).

2.1.2 PRODUCCIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS

Los materiales lignocelulósicos constituyen por encima del 90% del peso seco de las células vegetales. Este tipo de residuos se pueden considerar como complejos macromoleculares de polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y lignina). Los polisacáridos constituyen entre el 50 y 70% de la biomasa de las plantas vasculares, y la lignina constituye entre un 15 y 30%. La proporción de los distintos polímeros varía dependiendo de la especie, así como de la edad y de la parte de la planta. Como media podemos decir que los materiales lignocelulósicos contienen alrededor de un 45% de celulosa, un 30% de hemicelulosas, y un 25% de lignina (Lucas, 2001). Tan sólo el 1.5% de la biomasa del mundo es reutilizada (Lukas, 2006).

La industria agrícola es una de las principales fuentes de generación de residuos sólidos, los que están constituidos principalmente por tallos, raíces, hojas u otras partes de las plantas que no son utilizadas en estos procesos (Canche, 2005).

La celulosa es un componente abundante en los residuos agrícolas y de la manufactura de productos madereros. Además, representa entre un 40 y 60% del total de residuos sólidos municipales, residuos que corrientemente se queman, entierran o abandonan y raramente se incorporan al ciclo industrial (Lucas, 2001).

Los residuos de las frutas y verduras, son provenientes principalmente de la industria alimentaria o del consumo humano. En este último término al material que no tiene fin comestible (cáscaras ó material en descomposición), ya no son aptos para el consumo humano (Romão, 2002).

En Estados Unidos se les da uso a algunos de los residuos sólidos provenientes de la industria de conservas de frutas y verduras; de las 280 kg/ton producto de los cítricos, se utiliza como subproducto un 68%; de los 290 kg/ton producidos de desperdicios de pera solo el 31% se utiliza como subproducto (Chambers, 2000).

2.1.3 RESIDUOS ORGÁNICOS DE FRUTAS Y VERDURAS

2.1.3.1 MANZANA

La manzana es una fruta pomácea comestible obtenida del manzano doméstico (*Malus domestica*), otros manzanos (especies del género *malus*) o híbridos de aquél, pertenece a la familia de las Rosáceas. Es una de las frutas más cultivadas del mundo, así en 2005 se produjeron 55 millones de toneladas, dos quintas partes de toda la producción en China; otros grandes productores son E. U., Turquía, Francia, Italia e Irán. La manzana puede comerse fresca, escarapelada o con piel, aunque también se puede hacer con ella compota de manzana, jugo de manzana, tarta de manzana o sidra. La composición química de la manzana es aproximadamente: 85% de agua, 10.5% de carbohidratos, 2.3% de fibra, 0.3% de proteínas, 0.4% grasa y 0.2% cenizas.

	Pectina	Hemicelulosa	Celulosa	Glicoproteína
Manzana	0.54%	0.34%	0.70%	0.15%

Tabla 1. Porcentaje en masa fresca de la pared celular (Root, 2005)

Entre algunos componentes de los residuos de manzana se encuentran compuestos solubles en alcohol (monosacáridos, oligosacáridos y ácido málico) en un 32-45% en masa seca. La glucosa y la fructosa son los componentes mayoritarios en esta fracción. En la fracción insoluble en alcohol se encuentra 55-62% en masa seca y está principalmente compuesta por fibra (62-69%) y pectina (16.2-19.7%).

2.1.3.2 NARANJA

Fruto del naranjo, de forma globosa, de seis a ocho centímetros de diámetro, corteza rugosa, de color entre rojo y amarillo, como el de la pulpa, que está dividida en gajos, y es comestible, jugosa y de sabor agri dulce.

Su nombre científico es *Citrus sinensis* (L.) Osbeck; *Citrus aurantium* var, *sinensis*; *Citrus bigardia* Riss. Pertenece a la familia de las rutáceas. El fruto, es un hesperidio con sabor dulce o agrio, no amargo.

Los componentes activos son: hesperidina, pectina, ácido acético (toda la planta), ácido ascórbico, cítrico, ferúlico, glutámico, linoleico, oxálico, serina, arginina, alanina, asparagina, hisitidina, serina, prolina, fructosa, galactosa, glucosa, sacarosa, riboflavina, tiamina, ácido ascórbico, aluminio, calcio, bario, cadmio, cobre, cromo, hierro, magnesio, fósforo, potasio, sodio y zinc (Arroyo, 2002).

Componentes principales (%)	Materia seca	90.00
	Proteínas	6.00
	Carbohidratos	62.70
	Grasas	3.40
	Fibra	13.00
	Cenizas	6.90

Tabla 2. Composición físico-química de la cáscara de naranja (Arroyo, 2002)

2.1.3.3 PERA

La pera es el fruto del peral, un árbol caducifolio del género *Pyrus* y su especie *cummunis*. Es comestible y una de las frutas más importantes de las regiones templadas. De su contenido total aproximadamente el 3% es fibra. Se compone de ácidos: oleico, palmítico,

glutamínico, linoléico, aspártico y ascórbico. Aminoácidos: glicina, arginina, alanina, isoleucina, leucina y treonina. Minerales: potasio, fósforo, magnesio, calcio, cobre.

Contiene beta caroteno

	Pectina	Hemicelulosa	Celulosa	Glicoproteína
Pera	0.42%	0.22%	0.40%	0.12%

Tabla 3. Composición físico-química de la cáscara de pera

2.1.3.4 ZANAHORIA

Planta herbácea umbelífera, con flores blancas y purpúrea la central de la umbela; fruto seco y comprimido y raíz fusiforme, de unos dos decímetros de largo, amarilla o rojiza, jugosa y comestible. Es muy rica en caroteno, eficaz antioxidante con propiedades anticancerígenas. Su nombre científico es *Daucus carota* pertenece a la familia de las *Umbelíferas (Umbelliferae)*.

El contenido de pectina es aproximadamente de 1%.

2.1.4 PARED CELULAR VEGETAL

La pared celular vegetal es altamente organizada, su composición es compleja y está constituida por diferentes polisacáridos (almidón, celulosa, hemicelulosa, pectina y xilano entre otros) en su mayoría, proteínas, sustancias aromáticas, grasas, algunas vitaminas, minerales y agua (McCann, 2001).

Su estructura se puede dividir en tres zonas: lamela media, pared celular primaria y pared celular secundaria (Figura 1). La pared celular primaria está relacionada con el crecimiento celular, compuesta entre 9 y 25% de celulosa. La pared celular secundaria se forma cuando se ha detenido el crecimiento celular, contiene una alta proporción de celulosa, lignina, pectina y suberina. La lámina media se relaciona con la adhesión celular, pues es rica en pectina, sustancias adhesivas y la mayor cantidad de proteína (Taiz, 2006).

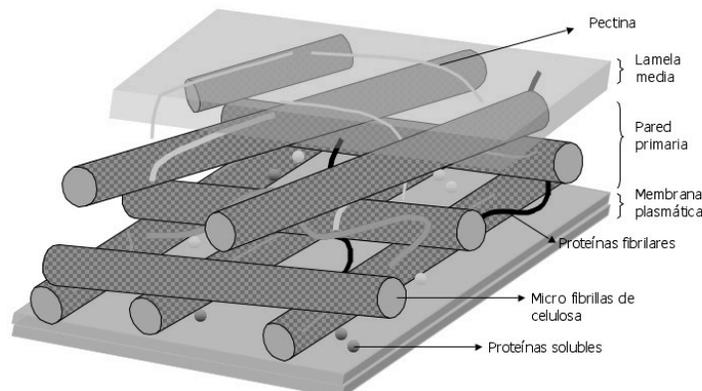


Figura 1. Estructura de la pared celular (Taiz 2006)

Los polisacáridos de la pared celular son los compuestos orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza. (De Vires, 2001). Se dispone en capas de microfibrillas de celulosa incluida en una matriz de pectina y hemicelulosa, y recubre por completo el exterior de la membrana plasmática vegetal. Diversas clases importantes de polisacáridos de las paredes celulares vegetales, como los glucolípidos y glucoproteínas, contienen residuos de galactosa en enlaces tipo β . Incluyen fucogalacto - xiloglucanos,

cadena de (1→3), (1→6) β -D-galactanos, proteínas arabinogalactanos del tipo II, (1→4) β -D-galactanos y arabinogalactanos tipo I relacionados, así como numerosas y complejas glucoproteínas con N-enlaces. La combinación de presión y resistencia contribuye a la rigidez de la planta. La fortaleza de una pared celular deriva de las capas de microfibrillas de celulosa unidas por abundantes enlaces cruzados de cadenas polisacáridas de hemicelulosa (Lodish, 2002).

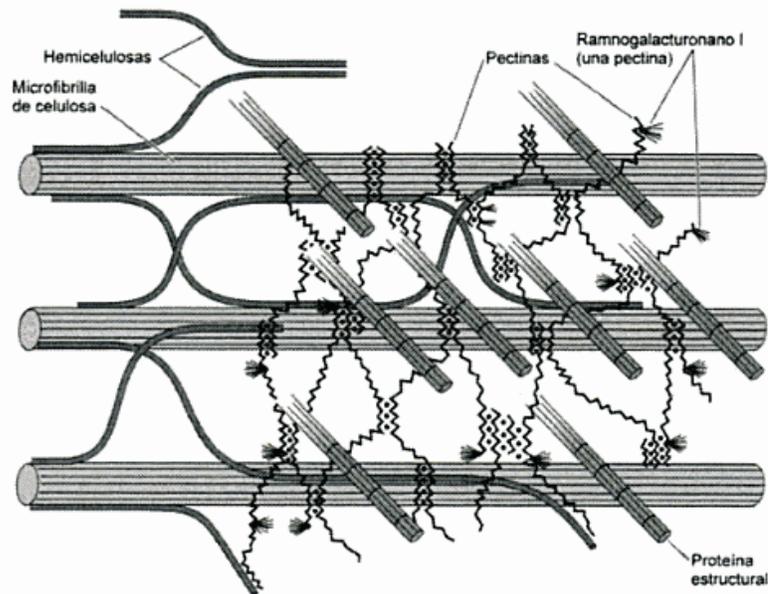


Figura 2. Principales componentes de la pared primaria y su posible acomodamiento (Taiz, 2006).

La matriz está formada en su mayor parte por hemicelulosas, que a su vez se asocian con pectinas y proteínas en la pared primaria de las células vegetales, y con lignina en las paredes secundarias. La composición exacta de la matriz varía dependiendo del organismo y de su etapa de desarrollo. En las paredes secundarias, las hemicelulosas están formadas principalmente por xilanos (con abundantes cadenas laterales), mananos y glucomananos. En la mayor parte de las paredes primarias, los xiloglucanos constituyen la interfase entre las microfibrillas de celulosa y la matriz (figura 2). Por esta razón, muchos microorganismos celulolíticos poseen una variedad de polisacárido-hidrolasas tales como xilanasas y manasas, y a veces también enzimas capaces de degradar la lignina (Lucas, 2001).

La función de la pared es una barrera mecánica y biológica. Es una fuente de señalización de moléculas, las cuales ayudan al comportamiento de las células, como ejemplo está la respuesta a la invasión por patógenos (McCann, 2001).

Además del soporte, la estructura, le da forma a la célula, protección contra deshidratación y otros agentes ambientales, mantiene y libera señales de moléculas, almacena carbohidratos, iones metálicos y otros materiales (Crossgrove, 1999).

Por ejemplo, en las frutas y verduras, la modificación de la pared celular es de suma importancia, pues se relaciona con los cambios en la firmeza y textura (Brummel, 2004).

Para la degradación es de suma importancia fraccionar estos compuestos, llevándose a cabo por medio de complejos enzimáticos como lo son: proteasas, lipasas, amilasas, celulasas, pectinasas, xylanasas entre otras (Brummel, 2004).

2.1.5 POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR

2.1.5.1 PECTINA

El término pectina incluye un grupo relativamente heterogéneo de moléculas incluyendo polisacáridos ácidos y neutros (Rodríguez-Palazuela, 1998) y son abundantes en las plantas. Forman el mayor componente de la lamela media, en una capa delgada del material adhesivo extracelular, encontrado entre la pared primaria y su adyacente en células de plantas jóvenes, esto es lo que da la propiedad de gel de la pared celular (Alkorta, 1998 y Lodish, 2002).

Constituyen parte de la pared celular primaria de la planta, por ello, componen una fracción importante de los alimentos vegetales en el desarrollo de los órganos de las plantas, desempeñando importantes funciones en la evolución de las estructuras celulares (García, 2002 y Alkorta, 1998).

Aparte de su función como agente lubricante o de pegamento en la pared celular de plantas superiores, las sustancias pécticas también están involucradas con las interacciones entre hospederos de plantas y sus patógenos, así como en la textura de frutas y vegetales durante el crecimiento, madurez y almacenamiento (Alkorta, 1998).

A las sustancias pécticas se les puede clasificar dentro de 4 tipos principales: protopectinas, ácidos pécticos, pectinas y ácido péctico. Las protopectinas son insolubles en agua y las restantes son totalmente o parcialmente solubles en agua (Alkorta, I. 1998). Entre estos se puede mencionar: ramnogalacturonano I, arabinano, galactano, arabinogalactano I, homogalacturonano y ramnogalacturonano II (Rodríguez-Palazuela, P. 1998). En los galacturonanos y ramnogalacturonanos el C-6 del galactato es oxidizado a grupo carboxilo (Ranvee, 2005).

Químicamente las sustancias pécticas son esencialmente polisacáridos ramificados que contienen de cientos hasta miles de bloques construidos por moléculas, con una columna vertebral consistente de residuos de ácido galacturónico parte de los cuales son metilesterificados. La molécula de pectina (Figura 3) es generalmente un agregado que consiste de una estructura en cadena de enlaces axiales ligados de unidades α -(1,4),D-galacturano, contiene regiones ricas de L-ramnosa, arabinosa, galactosa y xilosa como cadenas laterales (Alkorta, 1998).

Los grupos carboxilos del ácido galacturónico son parcialmente o totalmente neutralizados por los iones Na^+ , K^+ y NH_4^+ (Sathyanarayana, 2005 y Whitaker, 1991).

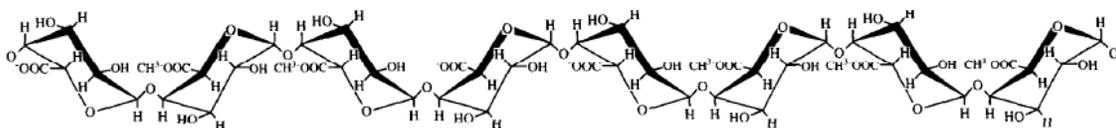


Figura 3. Estructura primaria de una molécula de pectina, se esquematiza una cadena del mayor componente de las pectinas (ácido galacturónico parcialmente metilesterificado) (Alkorta, 1998). Los grupos carboxilos del ácido galacturónico son parcialmente esterificados por grupos metilos, pueden presentarse parcialmente o completamente neutralizados por iones de

sodio, potasio o amino. Algunos grupos carboxilo pueden ser acetilados en C2 y C3 (Alkorta, 1998).

La cadena primaria consiste en unidades de α -D-galacturonato unidas por enlaces glicosídicos α - (1 \rightarrow 4), con 2-4% de unidades de L-ramnosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 2) y β -(1 \rightarrow 4) a las unidades de galacturonato (figura 3) (Ranvee, 2005).

La Sociedad Americana de Química clasifica las sustancias pécticas en 4 tipos principales, como sigue (Ranvee, 2005):

- (I) Protopectina: son las sustancias pécticas insolubles en agua, presentes en el tejido intacto.
- (II) Ácido péctico: es el polímero soluble de galacturonanos que contiene una pequeña cantidad de grupos metoxilo. A sus sales o su estructura normal se le denomina pectato.
- (III) Ácidos pectínicos: son las cadenas de poligalacturonato que contienen unidades de >0 y $<75\%$ de galacturonato metilado.
- (IV) Pectina (Polimetil galacturonato): es el material polimérico en el cual, al menos, 75% de los grupos carboxilo de las unidades de galacturonato son esterificados con metanol. Esto confiere rigidez en la pared celular cuando está enlazado a celulosa en la pared celular.

Las sustancias pécticas tienen un alto peso molecular, carga negativa y son ácidas. El peso molecular relativo de las sustancias pécticas está en el rango de 25 a 360 kDa (Ranvee, 2005).

Las sustancias pécticas ocurren de 0.5 – 4.0% del peso fresco de material de las plantas. Diferentes frutas y vegetales se enlistan en la tabla 4 (Ranvee, 2005).

Fruta / Vegetal	Tejido	% Sustancia péctica
Manzana	Fresco	0.5 – 1.6
Platano	Fresco	0.7 – 1.2
Meloconotnes	Fresco	0.1 – 0.9
Fresas	Fresco	0.6 – 0.7
Cerezas	Fresco	0.2 – 0.5
Chícharo	Fresco	0.9 – 1.4
Zanahoria	Material seco	6.9 – 18.6
Pulpa de naranja	Material seco	12.4 – 28.0
Papas	Material seco	1.8 – 3.3
Tomates	Material seco	2.4 – 4.6
Remolacha	Material seco	10.0 – 30.0

Tabla 4. Composición de pectina en diferentes frutas y vegetales (Ranvee, 2005).

2.1.5.2 CELULOSA

La celulosa es por mucho, el más abundante carbohidrato disponible para las plantas, con un rango aproximado de síntesis de 4×10^{10} toneladas/año (Béguin, 1990).

Es el material de desecho predominante en la agricultura (principalmente en forma de tallos, troncos o cáscaras) lo que justifica la abundancia de este material entre los residuos, tanto de la actividad humana como en los naturales (Lucas, 2001).

Es un homopolímero de cadena lineal formado por moléculas de glucosa unidas por enlaces 1,4- β -glicosídicos que pueden tener una pequeña proporción de residuos ramificados (que requerirían por tanto de enzimas específicas para su hidrólisis). Las moléculas contiguas de glucosa están giradas 180° una con respecto a la otra. Eso hace que cada dos moléculas de glucosa contigua (unidad de celobiosa) constituyan una unidad repetida. Las cadenas sencillas en una capa se unen por puentes de hidrógeno

intermoleculares y las capas se unen entre sí, por enlaces del tipo Van der Waals (Lucas, 2001).

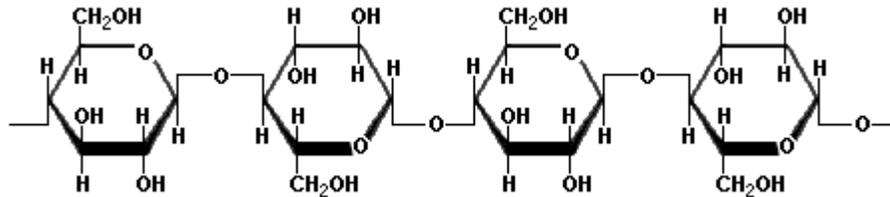


Figura 4: estructura química de la celulosa (Alkorta, 1998).

Dependiendo de su procedencia, el grado de polimerización o número de unidades de glucosa por molécula de celulosa varía aproximadamente desde 1000 hasta 10.000 (Lucas, 2001)

Los aspectos más importantes de la estructura física de la celulosa son (Lucas, 2001):

1. Las cadenas poliméricas de la celulosa natural muestran diferentes grados de ordenamiento unas con respecto a otras.
2. La fracción menos ordenada del polímero no muestra ninguna regularidad, y se conoce como “región amorfa” siendo fácilmente penetrable por solventes, enzimas, o reactivos, y por tanto, es fácilmente hidrolizable.
3. La fracción altamente ordenada del polímero se conoce como “región cristalina”. Constituidas por una cadena mayor a 250 moléculas de glucosa y que es embebida en una matriz de hemicelulosa y lignina. Estos compuestos reducen su accesibilidad a las enzimas celulolíticas (De Vires, R. 2001).

Las estructuras celulósicas se pueden también definir con base en tres niveles de organización. El primer nivel se refiere a los enlaces covalentes. El segundo nivel describe la conformación molecular, o sea, la relación espacial entre las unidades repetitivas. El tercer nivel define la asociación de las moléculas en agregados ordenados o matrices cristalinas (Lucas, 2001).

La mayor parte de la celulosa se encuentra formando parte de la pared de las células vegetales como lo muestra la figura 5. Éstas constan a menudo de microfibrillas inmersas en una matriz amorfa. Las microfibrillas juegan un papel estructural en la pared, impartiendo resistencia y confiriendo forma a la misma (Lucas, 2001).

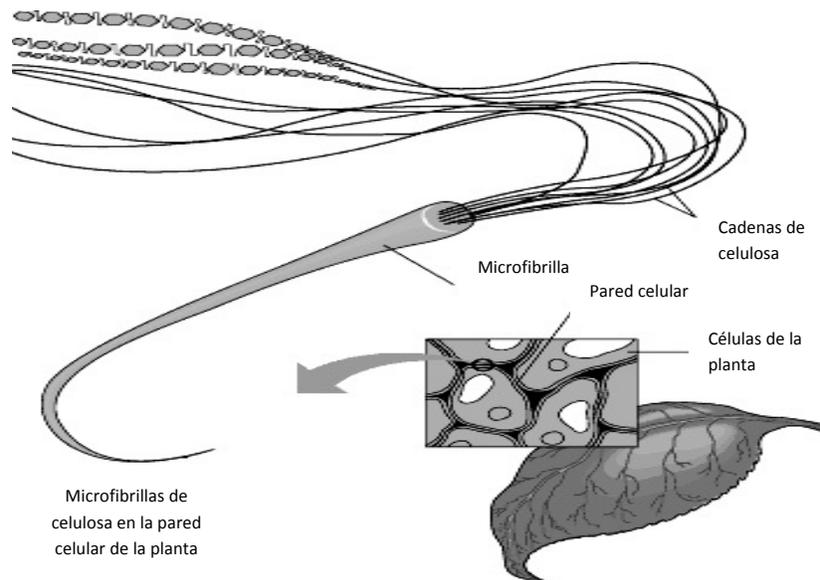


Figura 5. Microfibrilla compuesta de celulosa (tomado y modificado de Lucas, 2001).

También es importante tener en cuenta que la proporción de zonas de unión entre las microfibrillas y los restantes componentes puede ser elevada. Así, cabe suponer que las moléculas situadas en las zonas de contacto entre la celulosa y la hemicelulosa, por ejemplo, requieran enzimas distintas a las que atacan regiones cristalinas completamente libres. Ésta puede ser una razón por la que, con frecuencia, los microorganismos celulolíticos producen más de un tipo de celulasas para degradar aparentemente un único sustrato (Lucas, 2001).

2.1.6 BACTERIAS DESLIZANTES

Las bacterias deslizantes son un grupo heterogéneo. Su movilidad es definida como una translocación suave de células sobre la superficie mediante un proceso activo que requiere energía. El deslizamiento no requiere de flagelos, y el movimiento de las células generalmente sigue un camino de bacterias (McBride, 2001).

Algunas características de estas bacterias son (Reinchenbach y Dworkin, 1981):

- A. Todas son Gram negativas y poseen típicamente pared celular.
- B. Son bacilos, y la mayoría de ellos son largos. Sin embargo algunos como las Citofagas pueden ser bacilos cortos.
- C. Para poder tener movimiento deben estar sobre una superficie. Este tipo de bacterias por ejemplo no pueden tener movilidad en medio líquido.
- D. Producen algo parecido a un limo, un rastro que van dejando conforme se desplazan.
- E. La mayoría son más sensibles a la actinomicina D que el resto de las bacterias Gram negativas.
- F. Los ácidos grasos que poseen, son del tipo impares, que son raros en bacterias Gram negativas.
- G. Las quinonas de la cadena respiratoria son exclusivamente quinonas, las cuales son inusuales en organismos aeróbicos.
- H. La mayoría de este tipo de bacterias tienen colores brillantes como amarillo, verde, naranja, rojo y puede llegar a violeta. Estos colores son formados por pigmentos del tipo carotenoides.

Las características mencionadas no son excluyentes para ser parte de bacterias deslizantes. Sin embargo la característica que más puede ayudar a la exclusión de las cepas de estos tipos de microorganismos, es su composición de DNA, porque el

contenido de G+C en el DNA se encuentra en el rango de 30 – 70 % (Reinchenbach y Dworkin, 1981).

Varias bacterias que pertenecen a la rama de las eubacterias muestran movilidad deslizante. Existen particularmente tres grupos: mixobacteria (miembro de δ proteobacteria), la cianobacteria y los grupos de Citofaga-Flavobacteria. Las bacterias deslizantes viven en ambientes diversos como la boca humana, sedimentos oceánicos y tierra. Sin embargo son abundantes en varios ambientes naturales, aunque son menos comunes como objeto de experimento en los laboratorios. Por esta razón, normalmente se consideran como organismos raros o exóticos (McBride, 2001).

2.1.6.1 MIXOBACTERIAS

Son bacilos Gram-negativos relativamente largos (0.6 – 1.2 y 3 -15 μm). Las células vegetativas pueden ser (Dawid, 2000):

- a) Tipo I. Delgado, generalmente con extremos en forma de varilla flexible, de 1 μm de diámetro y 20 μm de largo (suborden: *Cystobacterineae*).
- b) Tipo II. Bacilo rígido en forma cilíndrica con puntas redondeadas, de 1 μm de diámetro y 10 μm de largo (suborden: *Sorangineae*).

Son famosas por tres capacidades: 1) su movimiento por deslizamiento y sus colonias son regularmente delgadas, formando una capa de su movimiento gradual al dejar un limo en las placas de crecimiento, 2) su sistema de comunicación intracelular sofisticado y un alto desarrollo de su vida social, y 3) muestran un potencial morfogenético remarcable, el cual puede expresarse en dos niveles. En una cooperativa morfogénesis que involucra 10^5 - 10^6 células, inducida por la variación de condiciones, pueden producir un cuerpo fructífero. Su contenido de G+C en el DNA puede variar de 66 – 72% (Reichenbach, H. 1999).

Se podría decir que entre los procariontes las Mixobacterias son las más complejas. Las células de mixobacteria viajan conjuntamente para digerir macromoléculas cooperativamente con el fin de encontrar fuentes de alimento, ejemplo de esto es tomar otras células como presa. Cuando los nutrientes escasean en el ambiente, cientos de células se agregan para formar un complejo cuerpo fructífero multicelular. Con la formación de este cuerpo, las células vegetativas se diferencian en forma de mixoesporas. Las mixobacterias también producen numerosos metabolitos secundarios como son antibióticos y componentes contra tumores. Por la complejidad de este grupo, se considera que el genoma de la mixobacteria es el más grande que la mayoría de los procariontes. El genoma de *Mixococcus xanthus*, consiste aproximadamente de 9.5 megapares de bases, siendo el más estudiado de las Mixobacterias (McBride, 2001).

La formación del cuerpo fructífero se da gracias a la comunicación entre estas bacterias. Como se muestra en la figura 6, cuando hay suficientes nutrientes, las células se organizan para desplazarse y alimentarse juntas (por ejemplo otra bacteria). Si los nutrientes comienza a escasear, las células se agregan y eventualmente forman un cuerpo fructífero lleno de esporas. Éstas germinan cuando la fuente de alimento es otra vez suficiente. El ciclo de vida es controlado por varias señales químicas.

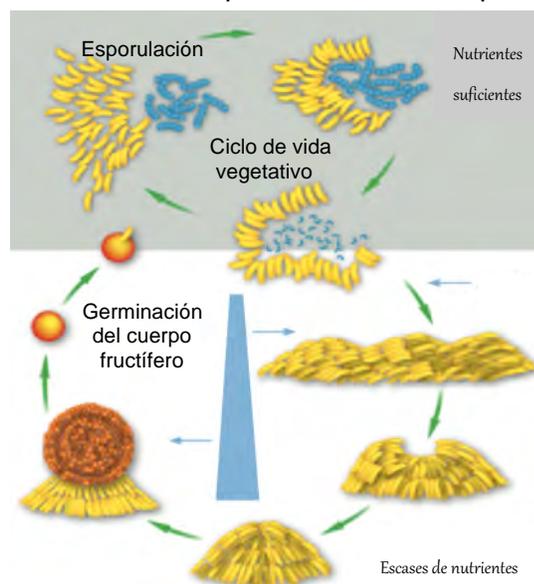


Figura 6. Formación del cuerpo fructífero (Beck, 2007)

Todas las Mixobacterias se especializan en la degradación de biomacromoléculas. Algunas especies son proteolíticas y bacteriolíticas, atacando materia orgánica y bacterias muertas o vivas, levaduras y otros microorganismos. Otro grupo de estos microorganismos descompone celulosa. Su movilidad puede ser utilizada para encontrar y aprovechar sustratos que no difunden, particularmente en un ambiente complejo y relativamente seco como lo es la tierra. (Reichenbach, H. 1999).

La mayoría de las Mixobacterias crecen bien alrededor de 30°C, aunque su rango de temperatura es muy amplio. En los cultivos, el rango de pH es normalmente entre 6.8 – 7. Las degradadoras de celulosa pueden crecer a un bajo pH, teniendo límites de 6.0 – 6.4 (Reichenbach, H. 1999).

El hábitat típico de las mixobacterias es la tierra, con un pH entre 5 – 8 (Dawid, 2000). Son aerobias y viven en las capas superiores de la tierra. Las Mixobacterias colonizan materia vegetal en decadencia como madera en descomposición y la corteza de los árboles muertos y vivos, la descomposición de líquenes e insectos, y el estiércol, especialmente de algunos mamíferos herbívoros, como los conejos silvestres, liebres, ovejas, ciervos y cabras. El estiércol de conejo es una fuente clásica para el aislamiento de mixobacterias (Reichenbach, H. 1999).

2.1.6.2 CITOFAGAS

Son bacterias deslizantes en forma de bacilos, unicelulares, Gram negativos, aerobios, caracterizados por su flexibilidad; a diferencia de las mixobacterias, no llevan a cabo la formación de cuerpos fructíferos (Reichenbach, H. 1998).

Su hábitat es en lugares ricos en materia orgánica como suelos, corteza de árboles, material vegetal en descomposición o estiércol de herbívoros. Son mesófilos, su temperatura de crecimiento se encuentra entre 20-30°C, aunque también se han encontrado cepas psicrófilas. El contenido de G+C 33-42% (Reichenbach, H. 1981).

Para su aislamiento conviene escoger tierras que estén cercanas a un pH neutro. También se puede encontrar en el agua, sobre todo en lugares fríos. Las citofagas constituyen del 5 - 10% del total de la población cultivable de bacterias (Reinchenbach y Dworkin, 1981).

Son degradadoras aeróbicas de polímeros, incluyendo agar, celulosa, pectina, quitina, queratina y proteínas (Reichenbach, 1981).

Las cepas que contienen actividad pectinolítica, producen licuefacción en pectina (Reinchenbach y Dworkin, 1981).

La mayoría de las citofagas son estrictamente aerobias, pero existen algunas que son anaerobias facultativas. El crecimiento de las citofagas en celulosa es considerablemente estimulado por Mn^{2+} y $Fe^{2+/3+}$ (Reinchenbach y Dworkin, 1981).

Se consideran como las bacterias deslizantes más rápidas, ya que pueden llegar a tener una velocidad de 2 $\mu m/s$ en una superficie de vidrio. Por ello, su deslizamiento se puede observar fácilmente bajo el microscopio (Spormann, 1999).

Las colonias de la mayoría de los miembros de las citofagas son de color amarillo brillante, naranja o rojo (Reinchenbach y Dworkin, 1981).

Para poder reconocer a este tipo de bacterias se debe tomar en cuenta: que son unicelulares, gram negativos, célula vegetativa en forma de bacilos y que no forman cuerpos fructíferos (Reinchenbach y Dworkin, 1981).

2.2 ANTECEDENTES

2.2.1 PECTINASAS

Las sustancias pécticas son naturalmente degradadas por acción combinada de varias enzimas, denominadas pectinasas.

La clasificación de enzimas pécticas se basa en su capacidad de atacar los enlaces del galacturonato de la molécula de pectina. En la figura 7 se muestran los tipos de enzima según el sustrato en el que actúan (Sathyanarayana, 2005).

Las enzimas pectinolíticas pueden ser divididas en 3 grandes grupos como sigue (Alkorta, 1998 y Ranvee, S. 2005):

- I. Protopectinasas: degradan la protopectina insoluble.
- II. Estearasas ó pectinestearasas: catalizan la desesterificación de pectina por medio de la remoción de metoxi ésteres.
- III. Depolimerasas (pectinasas: hidrolasas y liasas): catalizan el rompimiento hidrolítico del enlace glicosídico α -(1→4) en ácido D-galacturónico de las sustancias pécticas.

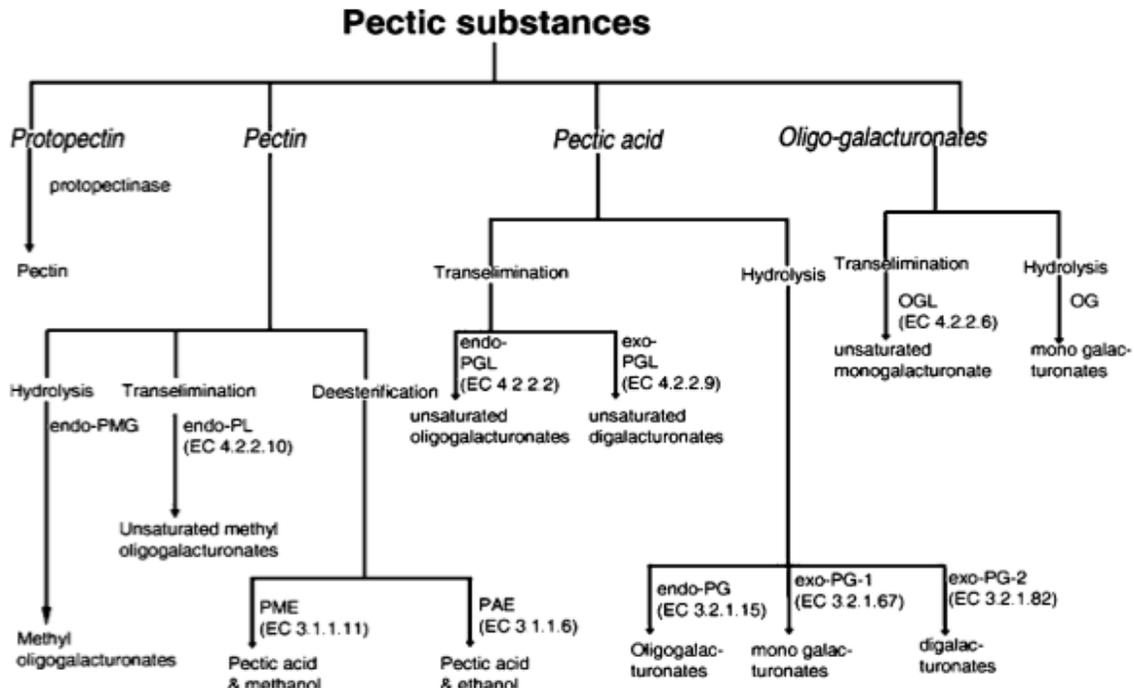


Figura 7. Diferentes tipos de sustancias pécticas y sus correspondientes pectinasas (Sathyanarayana, 2005)

DEPOLIMERASAS

El mecanismo de corte o división del enlace puede ser a) Hidrólisis: rompe el enlace introduciendo agua ó b) Trans-eliminación: rompe el enlace glicosídico por medio de una trans-eliminación sin participación de agua (Sathyanarayana, 2005).

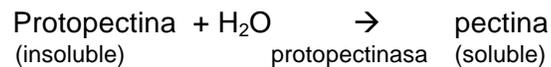
Se pueden dividir también según el sustrato donde actúan como:

a) Poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa rompen pectato y pectina, respectivamente, por medio de hidrólisis. **Endopoligalacturonasas** catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos internos en las cadenas poligalacturonatos de modo aleatorio. Las **exopoligalacturonasas** actúan sobre el extremo no reductor del sustrato, liberando ácido monogalacturónico (García, 2002 y Alkorta, 1998).

b) Poligalacturonato liasa y polimetilgalacturonato liasa que rompen pectato y pectina, respectivamente, por β -eliminación. **Poligalacturonato liasas** (PGL) rompen enlaces glicosídicos que estén después de un grupo carboxilo libre (Sathyanarayana, 2005).

PROTOPECTINASAS

Este tipo de enzimas (solubles) catalizan la proteopectina insoluble; en general, la reacción de catalización se puede dar como sigue (Ranvee, S. 2005):



Se pueden clasificar según su mecanismo de reacción en dos tipos: A) Que reacciona con el interior de la pectina. B) Que reacciona con el exterior de la pectina (Ranvee, S. 2005):

POLIGALACTURONASAS (PG)

Catalizan el rompimiento de la cadena de ácido galacturónico con la introducción de agua entre el enlace glicosídico.

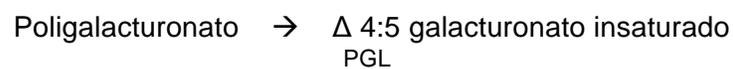
Se pueden dividir en: a) Endo-poligalacturonasas (E.C. 3.2.1.15) y b) Exo-poligalacturonasa (E.C. 3.2.1.16) (Ranvee, S. 2005).

LIASAS (TRANSELIMINASAS)

Realizan la ruptura no hidrolítica de pectatos, rompen la pectina por una trans-eliminación (Ranvee, S. 2005).

Se pueden dividir en: a) Endopoligalacturonato liasa (Endo PGL, E.C. 4.2.2.2), b) Exopoligalacturonato liasa (Exo PGL, E.C. 4.2.2.8), c) Endopolimetilgalacturonato liasa (Endo PMGL, E.C. 4.2.2.10) y d) Exopolimetilgalacturonato liasa (Exo PMGL) (Ranvee, S. 2005).

Estas catalizan la reacción (Ranvee, S. 2005):



Polimetilgalacturonato → metiloligogalacturonato insaturado
PMGL

Endo-PMGL es la única enzima que rompe el enlace α -1,4-glicosídico en pectinas esterificadas sin que otras enzimas actúen antes (Ranvee, S. 2005).

PECTINESTERASAS (PE)

Regularmente se nombran como pectinmetilesterasas, pectasas ó pectin metoxilasas (E.C. 3.1.1.11). Son carboxil ácido esterasas y pertenecen al grupo de las hidrolasas (Ranvee, S. 2005).

Catalizan la de-esterificación del enlace éster metílico de la cadena de galacturano de las sustancias pécticas, liberan pectinas ácidas y metanol, reduciendo así el grado de metilación y formando ácido péctico. Por tanto no son enzimas pectinolíticas en sentido estricto, pero su acción facilita el ataque posterior de otras enzimas (Alkorta, 1998).

Las **pectin transelimininasas** degradan sustratos pécticos por un mecanismo de β -eliminación que resulta en la formación de oligogalacturonatos 4,5-insaturados. Mientras la **pectin liasa** (PL) actúa en enlaces glicosídicos seguidos de un grupo carboxilo metil esterificado (Sathyanarayana, 2005 y Henrissat, 1995).

La tabla 5 y la figura 8 resumen la clasificación de enzimas pécticas y el modo de acción de las enzimas más frecuentes (Alkorta, I. 1998).

Nombre sugerido EC	Nombre Común	Número EC	Sustrato	Patrón de acción EC
Enzimas de esterificación				
Polimetilgalacturonato (PMGE)	esterasa Pectinesterasa	3.1.1.11	Pectina	Aleatorio
Enzimas depolimerizadoras				
Hidrolasas				
Endopoligalactoronasa (Endo-PG)	Poligalactoronasa	3.2.1.15	Pectato	Aleatorio
Exopoligalactoronasa 1 (Exo-PG1)	Poligalactoronasa	3.2.1.67	Pectato	Terminal
Exopoligalactoronasa 2 (Exo-PG2)	Poligalactoronasa	3.2.1.82	Pectato	Penúltimos enlaces

Endopolimetilgalacturonasa (Endo-PMG)	Pectin hidrolasa		Pectina	Aleatorio
Exopolimetilgalacturonasa (Exo-PMG)	Pectin hidrolasa		Pectina	Terminal
Liasas				
Endopoligalacturonato liasa (Endo-PLG)	Pectato liasa	4.2.2.2	Pectato	Aleatorio
Exopoligalacturonato liasa (Exo-PLG)	Pectato liasa	4.2.2.9	Pectato	Penúltimos enlaces
Endopolimetilgalacturonato liasa (Endo-PMGL)	Pectin liasa	4.2.2.10	Pectina	Aleatorio
Exopolimetilgalacturonato liasa (Exo-PMGL)	Pectin liasa		Pectina	Terminal

Tabla 5. Enzimas que actúan en la degradación de sustancias pécticas. Las enzimas han sido clasificadas y nombradas acorde con la comisión de enzimas (EC por sus siglas en ingles) (García, 2002).

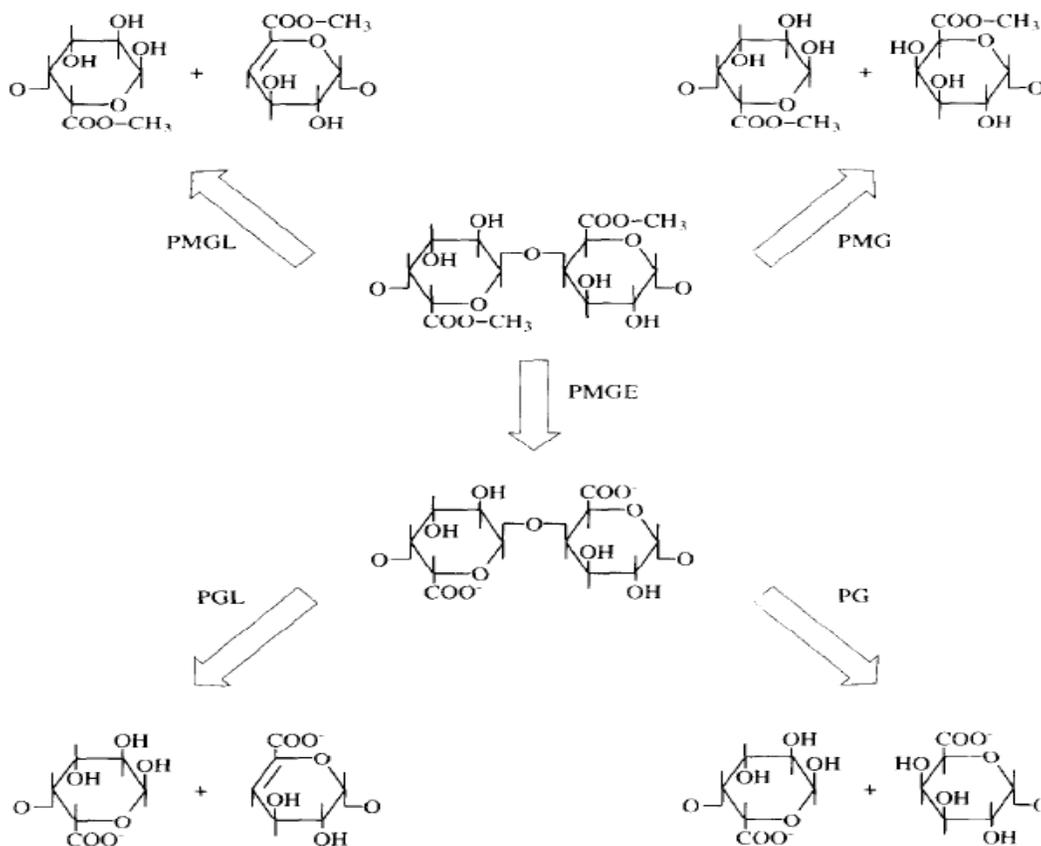


Figura 8. Modo de acción enzimático de las más frecuentes pectin depolimerasas en la molécula de pectina (Sathyanarayana, 2005).

2.2.2 CELULASAS

Los hongos y las bacterias han sido fuertemente explotados por su habilidad para producir una amplia variedad de celulasas y hemicelulasas. El aislamiento y caracterización de nuevas glicosidasas e hidrolasas de bacterias ha comenzado a explotarse ampliamente. Hay varias razones para esos cambios, por ejemplo, las bacterias regularmente tienen una alta tasa de crecimiento a diferencia de los hongos. En segundo lugar, las hidrolasas glicosídicas de bacteria son regularmente más complejas y regularmente son expresadas en complejos multienzimáticos. Pero principalmente, las bacterias habitan una gran variedad de nichos ambientales e industriales, que producen las cepas celulolíticas que son extremadamente resistentes al estrés ambiental (Miranda, 2009).

El comúnmente descrito modo de acción de las celulasas en polímeros es o exo- o endo-escisión, y el objetivo específico de todas las celulasas es romper el enlace β -1,4 glucosídico. Usando este sistema de clasificación, las **celobiohidrolasas** (exoglucanasas) fueron clasificadas como exoenzimas basado en que rompen todos los enlaces β -1,4 glucosídicos en el final de la cadena. Así este tipo de enzimas, que tienen actividad exoenzimática tienen a menudo un sitio activo en forma de túnel cerrado que conserva una cadena de glucano único y evita que se vuelva a adherir a la celulosa cristalina. Las **endoglucanasas** a menudo son clasificadas como celulasas con endo-actividad porque se cree que se unirá a enlaces β -1,4 glucosídicos sólo internamente. Las endoglucanasas son activas en regiones amorfas de la celulosa y por lo tanto su actividad puede ser ensayada usando sustratos de celulosa soluble. Nuevas evidencias apoyan que algunas celulosas muestran exo- y endo- actividad. Las exoglucanasas son activas en las regiones cristalinas de la celulosa (Miranda, 2009).

Los productos de las exoglucanasas y celobiohidrolasas, que son celobiosa y celodextrinas, respectivamente, inhiben su actividad. Así, una hidrólisis eficiente de

celulosa requiere la presencia de β -glucosidasas para romper los enlaces finales glicosídicos para producir glucosa. Típicamente la celobiosa y las dextrinas son tomadas por la bacteria y escindidas internamente por la vía de la celodextrina fosforilasa o celobiosa fosforilasa para crear glucosa monofosfatada, la cual es energéticamente favorecida (Miranda, 2009).

El tamaño de la celulasas es de aproximadamente 148KDa (Miranda, 2009).

Cuatro clases de enzimas están involucradas en la biodegradación de la celulosa (De Vries, R. 2001):

- Endoglucanasas (EC 3.2.1.4): hidrolizan celulosa a glucooligosacáridos.
- Celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) liberan celobiosa de celulosa cristalina.
- β -Glucosidasas (EC 3.2.1.21) degradan los oligosacáridos de glucosa.
- Exoglucanasas liberan glucosa de celulosa y glucooligosacáridos

La hidrólisis de la celulosa intacta se cumple mejor cuando estas tres enzimas operan al mismo tiempo. La digestión de la celulosa por diversas bacterias está acompañada de la secreción de una sustancia carotenoide amarilla que sirve como indicador de la hidrólisis (Carrillo, 2003).

En varios sistemas, la síntesis de celulasa es inducida por celobiosa o sefarosa, la cual es generada de la celulosa en presencia de baja celulasa y β -glucosidasa (Béguin, 1990).

Todos los organismos que pueden degradar a la celulosa cristalina secretan un sistema más o menos complejo de celulasa. Tal sistema está compuesto de una variedad de enzimas con diferentes modos de acción, las cuales actúan en sinergismo para hidrolizar celulosa (Béguin, 1990).

En suelos con pH 6.5 – 7.5 se encuentra *Cellulomonas*, a pH 5.7 – 6.2 aún desarrolla *Cytophaga* y si la acidez desciende, predominan los hongos. Las mixobacterias son las

más sensibles a la acidez por lo que se las encuentra en huertos, suelos abonados y suelos ricos en calcio (Carrillo, 2003).

Algunos microorganismos que digieren celulosa				
Organismos eucarióticos				
Quitridiomycetos	Hongos mitospóricos	Ascomycetos	Basidiomycetos	
<i>Neocallimastix</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Chaetomium</i>	<i>Coprinus</i>	
<i>Orpinomyces</i>	<i>Botrytis</i>		<i>Fomes</i>	
<i>Piromonas</i>	<i>Fusarium</i>		<i>Pleurotus</i>	
<i>Sphaeromonas</i>	<i>Humicola</i>		<i>Polyporus</i>	
	<i>Myrothecium</i>		<i>Trametes</i>	
	<i>Trichoderma</i>		<i>Rhizoctonia</i>	
Organismos procarióticos				
Mixobacterias	Bacterias deslizantes	Bacterias aerobias	Bacterias anaerobias	Actinomicetos
<i>Archangium</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Micromonospora</i>
<i>Polyangium</i>	<i>Sporocytophaga</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Sorangium</i>			<i>Clostridium</i>	<i>Streptosporangium</i>
			<i>Eubacterium</i>	
			<i>Ruminococcus</i>	

Tabla 6. Microorganismos provenientes de la tierra, capaces de degradar celulosa (Carrillo, 2003)

2.2.3 APLICACIONES DE LAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS Y PECTINOLÍTICAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Las celulasas, hemicelulasas y pectinasas tienen un amplio rango de potenciales aplicaciones en la biotecnología de alimentos. Como los mencionados enseguida:

- Extracción y clarificación de jugos de frutas y verduras

La producción de jugos de frutas y vegetales requieren métodos de extracción, clarificación y estabilización. En la actualidad, una combinación de pectinasas (pectiniliasas, pectinmetilesterasas, endo y exopoligalacturonasas, pectinesterasa, ramnogalacturonasas, endo y exoarabanasas), celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas) –llamadas colectivamente enzimas de maceración- son usadas en la extracción y clarificación de jugos de frutas y vegetales (Bhat, 2000).

La adición de enzimas pécticas, las cuales resultan en una rápida caída en la viscosidad así como en la floculación de micelas presentes, permite eliminar partículas presentes para que después sean separadas por sedimentación o filtración (Alkorta, 1998).

- Producción de néctares y purés

Estas tecnologías se realizan para poder preservar las frutas y verduras, pero no todas las frutas son fáciles de preservar ya sea por su elevada acidez o por su sabor fuerte. Esto provoca que no se puedan hacer bebidas agradables para el consumidor, ya sea diluida o en mezcla con otras. Por ello, el uso de enzimas de maceración no solo provee la estabilidad, textura y facilita la concentración de néctares y purés, también decrece la viscosidad rápidamente. Por lo tanto, una adecuada combinación de enzimas de maceración es apropiada para la producción de néctares y purés de frutas (Bhat, 2000).

- Infusión de pectinasas y β -glucosidasas para alterar las propiedades sensoriales de frutas y vegetales

La infusión de enzimas tiene el potencial para alterar la textura, el sabor y otras propiedades sensoriales de alimentos. La infusión al vacío de pectinasas, hace más fácil descascarar los cítricos (Bhat, 2000).

Otras aplicaciones de las pectinasas en este campo son: 1) reduce el exceso de amargura en las cáscaras de cítricos, 2) restaura el sabor perdido durante el secado 3) mejora la firmeza de los melones y sus mermeladas, incrementa el aroma y la volatilidad característica de frutas y verduras específicas (Bhat, 2000).

El tratamiento selectivo de concentrados de cítricos con endopoligalacturonasas, se ha utilizado recientemente, para tener hidrólisis limitada de las pectinas y así reducir su viscosidad (los jugos de cítricos tienden a ser gel cuando están concentrados) (Alkorta, 1998).

- Extracción de aceite de oliva

El uso de enzimas de maceración incrementa los antioxidantes en el aceite de oliva extra virgen y reduce la inducción de rancidez. Las principales ventajas del uso de enzimas de maceración durante la extracción de aceite de oliva son: 1) incremento de la extracción bajo condiciones de procesamiento en frío, 2) mejor fraccionamiento centrifugal en el aceite inicial, 3) aceite con altos niveles de antioxidantes y vitamina E, 4) baja inducción de la rancidez, 5) mejora global en la eficiencia de la planta, 6) contenidos bajos de aceite en las aguas de desecho (Bhat, 2000).

- Mejora de la calidad de productos de panadería

Las hemicelulasas, especialmente endoxilanasas han sido utilizadas para mejorar la calidad de la masa, el pan, galletas, pasteles y otros productos de panadería. Las endoxilanasas son conocidas por exhibir varios efectos beneficiosos durante el amasado y el cocido, se cree que el modo de acción es porque las endoxilanasas hidrolizan la arabinosa presente en la masa facilitando la redistribución de agua en la masa y el pan, y es responsable de los efectos de sabor en el amasado, volumen del pan, la textura y la estabilidad (Bhat, 2000).

- Elaboración de cerveza

El malteo de la cebada depende de la germinación de la semilla, la cual inicia la biosíntesis y activación de α y β -amilasas, carboxipeptidasas y β -glucanasas que hidrolizan la reserva de las semillas (Bhat, 2000).

- Producción de vino

La principal enzima exógena usada en la producción de vino son las pectinasas, β -glucanasas y hemicelulasas. Los principales beneficios al utilizar esas tres enzimas durante la producción de vino son: 1) mejor maceración y mejora el color de la extracción, 2) facilita la clarificación y la filtración, 3) provee al vino mayor calidad y estabilidad. Una

cuarta enzima, la β -glucosidasa tiene la habilidad de proveer de aroma a los vinos por la modificación naturalmente presente de precursores glicosilados. Mientras que el aplastamiento de uvas para los vinos mejora la extracción del jugo, la adición de pectinasas reduce el tiempo de clarificación e incrementa el contenido de terpenos en el vino. También la preparación de pectinasas con alta pectin liasa y baja actividad de pectin metil esterasa son preferidos para minimizar el metanol liberado del ácido metilado poligalacturónico durante la producción de vino (Bhat, 2000).

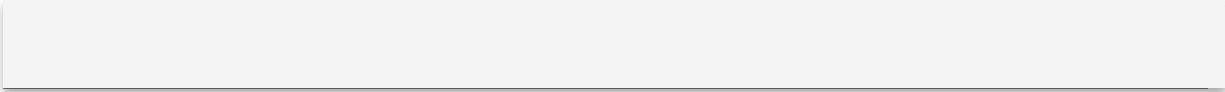
La tabla 7, nos muestra un resumen de las posibles aplicaciones de estas enzimas.

Tabla 7. Aplicaciones de celulasas, hemicelulasas y pectinasas en diversos ámbitos (modificado a partir de Bhat, 2000)

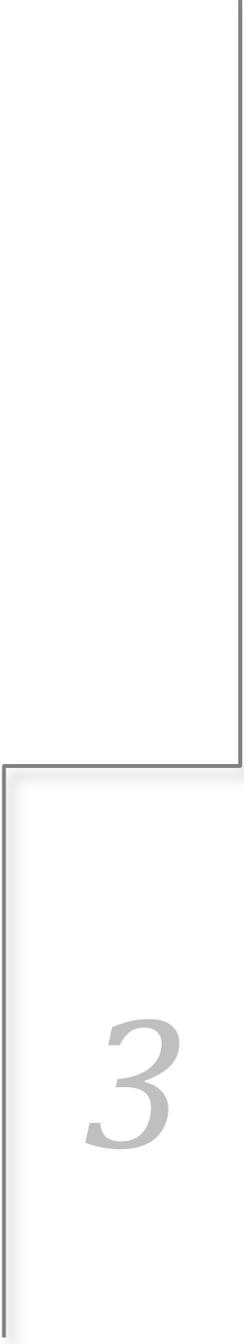
Enzimas	Función	Aplicación
Celulasas, hemicelulasas y pectinasas en biotecnología de alimentos		
Enzimas de maceración (pectinasas, celulasas y hemicelulasas)	Hidroliza la pectina soluble y los componentes de la pared celular, disminución de la viscosidad y mantiene la textura de jugos de frutas	Mejora la extracción de jugos de frutas y aceite de oliva; libera: sabor, enzimas, proteínas, polisacáridos, almidón y agar
Pectinasa ácida y termoestable con poligalacturonasa, pectinesterasa y pectintranseliminasa	Rápida caída de la viscosidad en frutas con los tejidos rotos	Mejora la maceración y eleva el color de la extracción
Poligalacturonasa con alta protopectinasa y baja celulasa	Hidrólisis parcial de protopectina	Producción de alta viscosidad en purés de frutas
Poligalacturonasa y pectintranseliminasa con baja pectinesterasa y hemicelulasa	Hidrólisis parcial de protopectina e hidrólisis de pectina soluble al medio en pequeños fragmentos; formación y precipitación de ácidos; remueve hidrocoloides de las fibras de celulosa	Producción de jugos turbios con baja viscosidad
Poligalacturonasa, pectintranseliminasa y hemicelulasa	Completa la hidrólisis de pectina, polisacáridos ramificados y sustancias mucosas.	Clarificación de jugos de frutas
Pectinasa y β -glucosidasa	Infusión de pectinasas y glucosidasas para descascarar fácilmente frutas y vegetales.	Alteración de las propiedades sensoriales de frutas y vegetales.
Enzimas de arabinoxilano modificadas (endoxilanasas, enzimas desramificantes del xilano).	Modifican el arabinoxilano del cereal y la producción de arabinoxilanoligosacáridos	Provee de textura, calidad y mejora la vida de productos de panadería
Celulasas y hemicelulasas	Hidrólisis parcial o completa de la pared celular de polisacáridos y celulosa sustituida.	Mejora: la eficiencia del remojo; absorción homogénea del agua por cereales; la calidad nutritiva de alimentos fermentados; rehidratación de vegetales y sopas secas; producción de oligosacáridos como ingredientes en alimentos funcionales y disminuye las calorías de alimentos sustitutos
B-glucanasas y manasas	Solubilizan la pared celular de hongos y bacterias	Seguridad alimenticia y preservación
Xilanasas y endoglucanasas	Hidrólisis de arabinoxilanos y almidón	Separación y aislamiento de almidón y gluten de la harina de trigo
Pectinesterasa sin actividad poligalacturonasa y pectinoliasa	Procesamiento de frutas	Producción de alta calidad en salsa de tomate y pulpas de fruta
Ramnogalacturonasas	Estabilidad de la turbidez	Producción de la estabilidad de jugo de manzana turbio
Celulasas y pectinasas	Liberación de antioxidantes de frutas y vegetales	Reduce el deterioro de alimentos
Endomanasa	Modificación de la goma guar	Producción de fibra soluble en agua para enriquecer los contenidos de fibras en los alimentos.
Celulasas, hemicelulasas y pectinasas en bebidas y biotecnología del vino		
B-glucanasas	Hidrólisis de B-1,3 y B-1,4 glucano; reduce la viscosidad y libera los azúcares reductores durante la fermentación primaria	Mejora de la fermentación primaria, filtración y calidad de la cerveza
Pectinesterasa	Deesterifica y gela pectinas	Mejora la clarificación de sidra
Enzimas de maceración (celulasas, hemicelulasas y pectinasas)	Hidrólisis de la pared celular de plantas	Mejora en la maceración de la piel y extracción de uvas; calidad, estabilidad, filtración y clarificación de vinos

Tabla 7. Continuación

Enzimas	Función	Aplicación
Celulasas, hemicelulasas y pectinasas en biotecnología de la alimentación animal		
Celulasas y hemicelulasas	Hidrólisis parcial de materiales lignocelulósicos; hidrólisis de b-glucanos; disminución de la viscosidad intestinal; mejor emulsificación y flexibilidad de materiales de alimentación	Mejora en la calidad nutricional de alimentación animales y su rendimiento en rumiantes y mono gástricos
B-glucanasas y Xilanasas	Hidrolisis de β -glucanos en el cereal y arabinoxilanos, disminución en la viscosidad intestinal y liberación de nutrientes de los granos	Mejora en la digestión y absorción, ganancia de peso por pollos pequeños y gallinas
Hemicelulasa con alta actividad xilanasas	Disminuye la calidad nutritiva de la alimentación de cerdos	Reduce costos de alimentación de cerdos y el uso de menos alimentos caros para cerdos
Celulasas, hemicelulasas y pectinasas	Hidrolisis parcial de la pared celular de plantas durante el ensilaje y la preservación de forraje; expresión de genes en rumiantes para alta conversión eficiente de alimentos	Producción y preservación de alta calidad de forraje de rumiantes, mejora la calidad de la grasa de silaje; producción de animales transgénicos
Celulasas en la biotecnología de productos textiles		
Celulasas, preferiblemente neutras y ricas en endoglucanasas	Remueve el exceso de colorante de fábricas de mezcilla; suaviza el algodón sin dañar la fibra de la mezcilla	Producción de alta calidad y detergentes amigables con el medio ambiente
Celulasa, preferiblemente ácida y rica en endoglucanasas	Remueve el exceso de micro fibrillas de la superficie del algodón	Biopulido del algodón
Celulasa preferiblemente rica en endoglucanasas	Restaura la suavidad y la brillantes del algodón	Producción de manufactura de alta calidad
Celulasas y hemicelulasas en la biotecnología de pulpa y papel		
Celulasas y hemicelulasas	Modificación del grueso mecánico de la pulpa y propiedades de las hojas; hidrólisis parcial de las moléculas de carbohidrato y libera la tinta de la superficie de la fibra; hidrólisis del material coloidal en papel	Pulpeo biomecánico; modificación de las propiedades de la fibra; destinado de las fibras recicladas; mejora la manufactura de las hojas de papel
Xilanasas, manasas, β -xilosidasas y α -L-arabinofuranosidasas	Hidrólisis del xilano re precipitado o remoción del xilano de complejos de carbohidratos-lignina; remoción de glucomanano	Bioblanqueo de la pasta de kraft; reducción de requerimientos de cloro en subsecuentes blanqueos y contaminación ambiental
Celulasas purificadas y componentes de hemicelulasa	Parcial o completa hidrólisis de las fibras de la pulpa	Biocaracterización de las fibras de la pulpa
Celulasas y enzimas relacionadas en la investigación y desarrollo como en la agricultura		
Mezcla de celulasas, hemicelulasas y pectinasas	Solubilización de la pared celular de hongos o plantas	Producción de protoplastos de hongos o plantas, cepas híbridas o mutantes
Celulasas y enzimas relacionadas, preferiblemente β -1,3 y 1,6 glucanasas	Inhibición de la germinación de esporas, elongación del tubo germinativo y el crecimiento de hongos Mejora de la germinación de las semillas, crecimiento y florecimiento de plantas; mejoramiento del sistema reticular, incremento del rendimiento del cultivo	Biocontrol de patógenos y desastres en plantas Agricultura
CBD de celulasas y celulosomas	Sistemas de afinidad, conjugación y fusión de genes	Afinidad, purificación, inmovilización y fusión de proteínas, enzimas y anticuerpos; producción de moléculas híbridas para varias aplicaciones
Celobiohidrolasa I	Expresión de proteínas heterólogas y enzimas	Producción de altos niveles de proteínas, enzimas y anticuerpos
Enzimas nativas	Aumenta la eficiencia de aplicaciones específicas	Producción de celulosomas diseñados



Objetivos



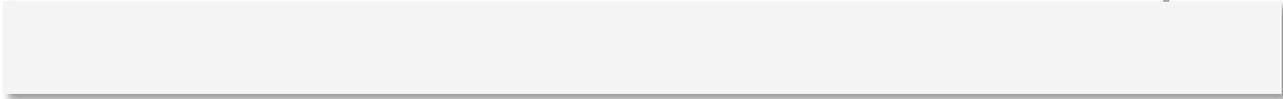
3

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la degradación por las bacterias deslizantes (mixobacterias y citofagas) aisladas a partir de muestras ambientales a través de las actividades enzimáticas (pectinolítica y celulolítica) sobre desechos de frutas y verduras.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar y caracterizar bacterias deslizantes provenientes de muestras ambientales de suelos rurales, urbanos y semiurbanos del valle de México.
- Determinar la actividad cualitativa celulolítica y pectinolítica de las cepas aisladas.
- Determinar la temperatura óptima, para la producción de enzimas sobre desechos de frutas y verduras.
- Evaluar la actividad celulolítica sobre desechos de naranja, manzana, pera y zanahoria; de las cepas aisladas.
- Evaluar la actividad pectinolítica sobre desechos de naranja, manzana, pera y zanahoria; de las cepas aisladas.
- Determinación de la actividad enzimática cuantitativa celulolítica y pectinolítica de las cepas aisladas.

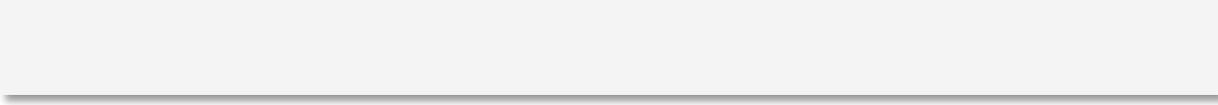


Hipótesis de trabajo



4

Las mixobacterias y citofagas pueden degradar desechos de frutas y verduras gracias a que presentan enzimas capaces de degradar a la celulosa y a la pectina.

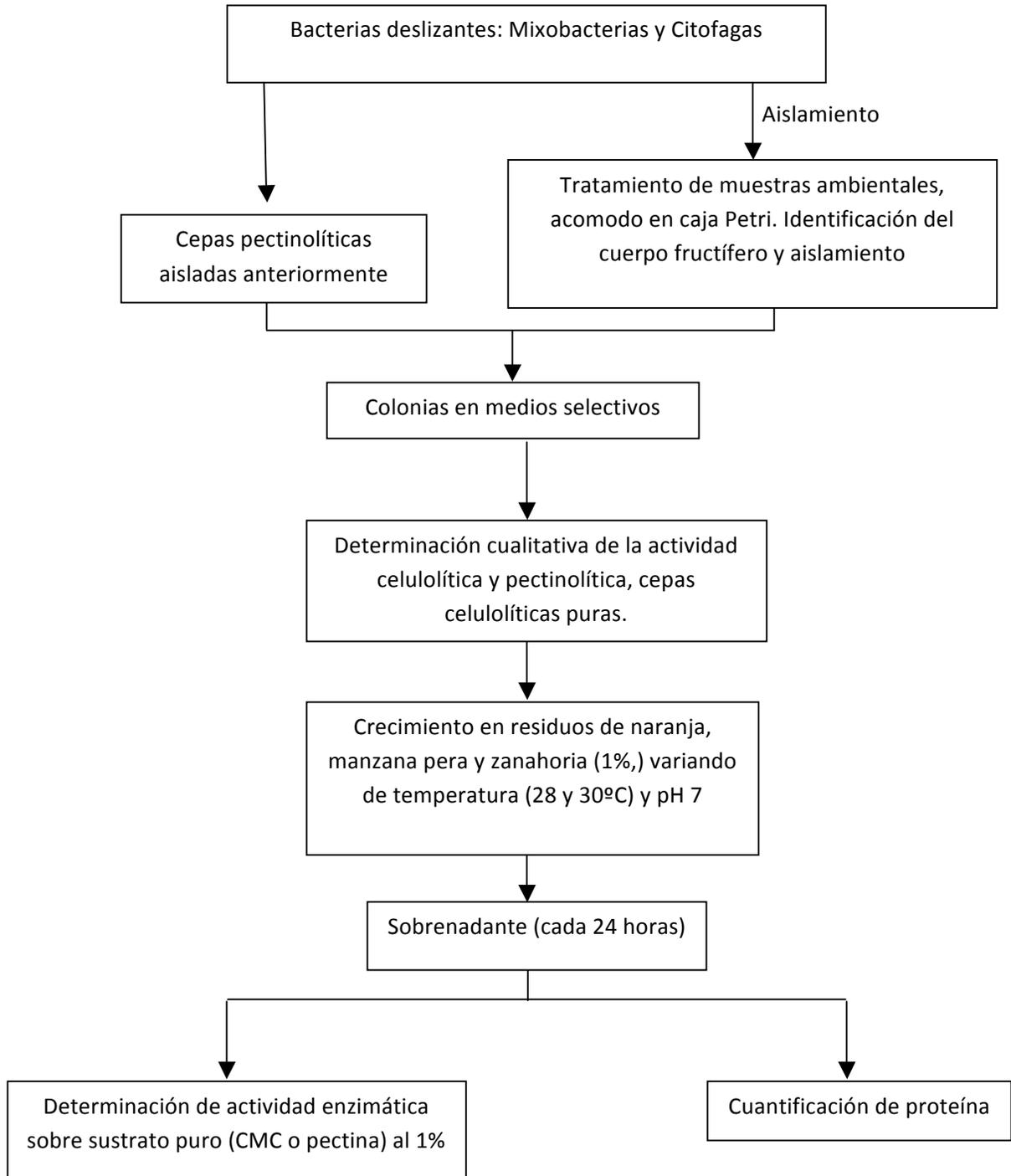


Diseño experimental



5

5.1 DIAGRAMA DE FLUJO



5.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS AMBIENTALES

Se trabajó con muestras obtenidas de suelos rurales, urbanos y semiurbanos provenientes de diferentes lugares de la zona metropolitana del Valle de México. Se recolectaron excavando 15 cm de la superficie de la tierra y fueron almacenadas en bolsas de plástico estériles. Posteriormente la muestra de tierra fue cernida y se sumergió en una solución de Benomilo [Metil 1-(butilcarbamoil) bencimidazol-2-ilcarbamato] en concentración 12.5 mg/mL por 1 semana, después se secaron a 27° C por 7 días; una vez secas se guardaron en bolsas estériles.

Las muestras ambientales (tierra y hojarasca) se colocaron en las cajas con sílica gel, dispuestas en pequeños montones (figura 9), hidratándose con una solución de medio mineral con cicloheximida en una concentración de 500 µg/mL (que es un inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas), evitando así la proliferación de hongos y favoreciendo la aparición de los cuerpos fructíferos. Se utilizó papel filtro como única fuente de carbono, ya que la sílica gel es un medio inerte que solo sirve para dar soporte a las placas.

Las cajas se mantuvieron en una cámara húmeda. A partir del tercer día se realizó el seguimiento de las cajas con un microscopio estereoscópico hasta lograr ver los cuerpos fructíferos ó halos de degradación. Una vez observados se procedió a fotografiarlos.



Figura 1. Muestras ambientales para el aislamiento de bacterias deslizantes (*Mixobacterias* y *Citofagas*)

5.3 CRECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS DESLIZANTES

El crecimiento de bacterias deslizantes del tipo Citofaga se detectó por la degradación de papel filtro con una pigmentación alrededor y sin crecimiento de hongos; en el caso de las Mixobacterias se siguieron los lineamientos de Reinchenbach (1981) mediante la observación de cuerpos fructíferos, tomando en cuenta: color, tamaño, forma, coloración y degradación del papel filtro sin la presencia de hongos.

Al identificar los cuerpos fructíferos o la degradación del papel filtro, se tomó una muestra y se sembró en un medio selectivo (agar Mc Conkey) que favorece el crecimiento de microorganismos Gram negativos. Las cepas aisladas presuntivamente Mixobacterias o Citofagas, se incubaron a 37° C por 24 horas, con diferentes resiembras hasta la obtención de una colonia pura. Dependiendo de la cantidad y tipo de colonias que crecieron en este medio, se realizó una tinción de Gram a cada tipo, y los que resultaron bacilos largos se resembraron hasta la obtención de cepas puras. Las colonias puras aisladas se mantuvieron en caldo Cy para la conservación de cada cepa.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS

Una vez obtenida la cepa pura se evaluaron diversas características como son: morfología macroscópica y microscópica.

5.4.1 MORFOLOGÍA COLONIAL

Después de la incubación a 37° C por 24 horas tanto en agar Mc Conkey como en agar Cy, se estudiaron las características morfológicas como son: forma, borde, elevación, textura y color.

5.4.2 MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA

Para asegurar que se trabaja con un solo tipo de microorganismo se realizó tinción de Gram a cada cepa y se determinó la morfología de las células vegetativas.

5.4.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Ésta se determinó con la ayuda de diferentes pruebas entre las que se encuentran: hemólisis, H₂S, OF, catalasa, LIA, indol, urea, fenilalanina, reducción de nitratos, movilidad, manitol, sacarosa, citrato, glucosa, lactosa, galactosa, sorbitol, gelatina, agar, almidón, pectina y carboximetil celulosa (CMC).

Un cultivo puro de cada cepa con 24 horas de crecimiento se lavó con una solución destilada y se inoculó cada prueba, se incubaron e interpretaron los resultados según lo indica cada prueba.

Como parte de esta caracterización se observó la sensibilidad que tenía cada cepa a una serie de antibióticos en multidiscos (lote MN040406 y MN111005) para bacterias Gram negativas, ya que se ha reportado que las Mixobacterias son resistentes a algunos antibióticos. Esto se realizó con un cultivo de 24 horas, extendiendo 500 µL con una varilla de vidrio sobre el agar Mueller-Hinton, se dejó absorber e incubó por 24 horas a 37° C. Pasado este tiempo, se midieron los halos (si es que se tenía) con una regla. Dependiendo de la medida del halo, se determinó con ayuda del instructivo de los sensidiscos (Catálogo 71080280) la sensibilidad o resistencia de la cepa al antibiótico.

5.5 ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y PECTINOLÍTICA CUALITATIVA

La actividad celulolítica se determinó en placas de carboximetil celulosa (CMC) y la actividad pectinolítica en placas de pectina.

5.5.1 ACTIVIDAD CELULOLÍTICA CUALITATIVA

Se sembraron por duplicado cada uno de los microorganismos en una concentración de 10^7 células/mL sobre placas de CMC (5 g/L) a 32° C, se les dió el seguimiento de las placas hasta la obtención de colonias. Después de la incubación, las placas fueron bañadas con una solución acuosa de rojo congo (1 g/L) y se dejó reposar por 15 minutos. Después, se retiró la solución de rojo congo y se cambió por NaCl 1 M, se dejó actuar 15 minutos para permitir el enlace del colorante con el polisacárido. Finalmente las placas se lavaron con abundante agua destilada para remover el colorante que no se unió. Las zonas de degradación fueron visibles por la formación de un halo alrededor de las colonias que fueron capaces de degradar CMC (Ruijssenaars y Hartmans, 2000).

5.5.2 ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA CUALITATIVA

Se inocularon las placas de pectina con las cepas puras a una densidad de 10^7 células/mL, por duplicado. Se incubaron a 37° C hasta la aparición de colonias. Después de la incubación fueron teñidas con una solución acuosa de rojo de rutenio 0.05% p/v. Se dejó actuar por 15 minutos y se enjuagó con suficiente agua destilada. La zona de degradación fue visible por la formación de un halo alrededor de las colonias que fueron capaces de degradar pectina (Chirino, 2008).

5.6. ACONDICIONAMIENTO DE DESECHOS

5.6.1 DESECHOS DE PERA, MANZANA Y ZANAHORIA

Se utilizaron cáscaras de pera, manzana y zanahoria provenientes de residuos de jugo. Se prepararon las cáscaras haciendo varios lavados con agua destilada, hasta la eliminación de azúcares libres. Los azúcares libres restantes, se midieron indirectamente en el agua de lavado, con la técnica de DNS. Una vez lavados se procedió a secarlos en una estufa a 50° C por 24 horas. Transcurrido este tiempo se trituró en un mortero, para disminuir el tamaño de partículas y después se molió en una licuadora hasta la obtención de un polvo.

5.6.2 DESECHOS DE NARANJA

Se recolectaron cáscaras de naranja, de un puesto de jugos, éstas se encontraban en buen estado y no presentaban rasgos de degradación. Una vez recolectadas se acondicionó, se realizaron lavados sucesivos con agua destilada, con el fin de eliminar los azúcares libres que dejó el jugo. Los azúcares libres restantes se midieron indirectamente en el agua de lavado, con la técnica de DNS. Al término de ello se secaron en una estufa a 80° C por 24 horas para posteriormente triturar en un mortero, con el fin de disminuir el tamaño de las cáscaras pues eran muy grandes. Una vez terminado esto, se molió en una licuadora hasta la obtención de un polvo.

5.7 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y PECTINOLÍTICA PROVENIENTE DE SUSTRATOS COMPLEJOS

Una vez obtenidos los sustratos complejos en polvo, se prepararon matraces con medio mineral adicionándoles el sustrato complejo en polvo a una concentración 1% p/V, posteriormente se dejó hidratar el polvo durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se esterilizaron en autoclave a 15 lb/in² por 15 min. Los matraces estériles fueron inoculados con los diferentes aislados en una densidad de 10⁷ células/mL. Esta incubación se realizó con diferentes temperaturas (28 y 30° C), con agitación constante de 150 rpm.

A cada matraz se le realizó un muestreo cada 24 horas (incluyendo el tiempo de inicio) por duplicado. Se tomaron alícuotas de 1.5 mL en microtubos estériles, se centrifugaron a 4° C por 10 minutos a 10000 rpm.

A los sobrenadantes se les determinó la actividad extracelular, tanto celulolítica como pectinolítica. Se tomó 0.1 mL del sobrenadante, éste se agregó a la mezcla de reacción que contenía: solución de CMC (Sigma) 1% ó pectina (Sigma) al 1% y 0.4 mL de buffer de fosfatos 100 mM pH = 7, completando 1 mL, en donde se llevó a cabo la reacción; se incubó en un baño de agua a 37° C por una hora. Transcurrido el tiempo se agregaron 2 mL del reactivo DNS, se calentó la mezcla a ebullición por 5 minutos en un baño de agua y al término se le añadieron 5 mL de agua destilada, se dejó reposar 10 minutos.

Se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 575 nm, los valores obtenidos en el espectro, se extrapolaron en una curva de glucosa (para la actividad celulolítica) y ácido galacturónico (para la actividad pectinolítica). Con ello se obtiene la cantidad de μ mol de glucosa ó ácido galacturónico finales en la reacción, con ello podemos definir:

Una unidad de actividad enzimática celulolítica (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol glucosa en 60 minutos en las condiciones de reacción.

Una unidad de actividad enzimática pectinolítica (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de ácido galacturónico en 60 minutos en las condiciones de reacción.

5.8 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS COMERCIALES POR DNS

Se midió la actividad enzimática de dos enzimas comerciales para poder comparar con las actividades obtenidas por las células aisladas, éstas fueron pectoliasa de *Aspergillus japonicus* (P3026-100MC 12K1587, SIGMA) y celulasa de *Aspergillus niger* (C1184-SKU 103K0983, SIGMA).

La mezcla de reacción para la cuantificación de la actividad consistió en: sustrato correspondiente (pectina ó CMC) en una concentración de 1% p/v, 0.4mL de buffer de fosfatos (100 mM pH 7) y la enzima (celulolasa ó pectinasa, según correspondiera) en concentraciones diferentes (0 a 20 μg). Esta mezcla se incubó en un baño de agua a 37° C por una hora. Una vez concluido este tiempo se agregaron 2 mL del reactivo DNS, se calentó la mezcla a ebullición por 5 minutos en un baño de agua y al término se le añadieron 5 mL de agua destilada. Posteriormente, se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 575 nm, y los valores obtenidos se extrapolaron en una curva de ácido galacturónico o glucosa, según correspondiera. Con ello se obtuvieron los mg de glucosa ó ácido galacturónico que quedaron después del tiempo transcurrido en el tubo de reacción

5.9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de proteína se basó en el método diseñado por Bradford (1976).

Se corrió una curva estándar de 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina sérica bovina.

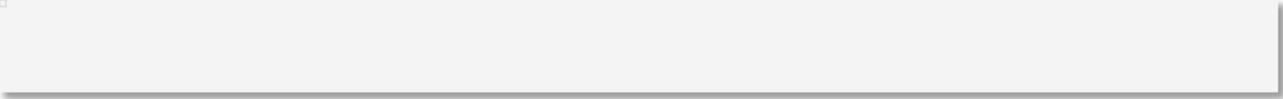
La mezcla de reacción consistió en Tris-HCl 50 mM pH 7.8; reactivo de Bradford (Bio-Rad No. Cat 500-0006) y solución estándar de albúmina 1 mg/mL.

								Blanco
Solución estándar albúmina (μL)	2	4	6	8	10	15	20	0
Tris-HCl 50mM (μL)	798	796	794	792	790	785	780	800
Reactivo Bradford (μL)	200	200	200	200	200	200	200	200
Total (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Tabla 1. Cantidades para realizar la curva patrón

Se realizó cada punto por triplicado, se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se leyó a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro, el blanco se empleó para calibrar el aparato.

Las muestras problema se ajustaron a 800 μL con Tris-HCl 50 mM pH 7.8 y se adicionaron 200 μL de reactivo para leerlo a una longitud de onda de 595 nm.



Resultados y discusión



6

6.1 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Resultados del muestreo obtenido de suelos urbanos, semiurbanos y rurales, ubicados en la zona metropolitana del Valle de México (figura 1).

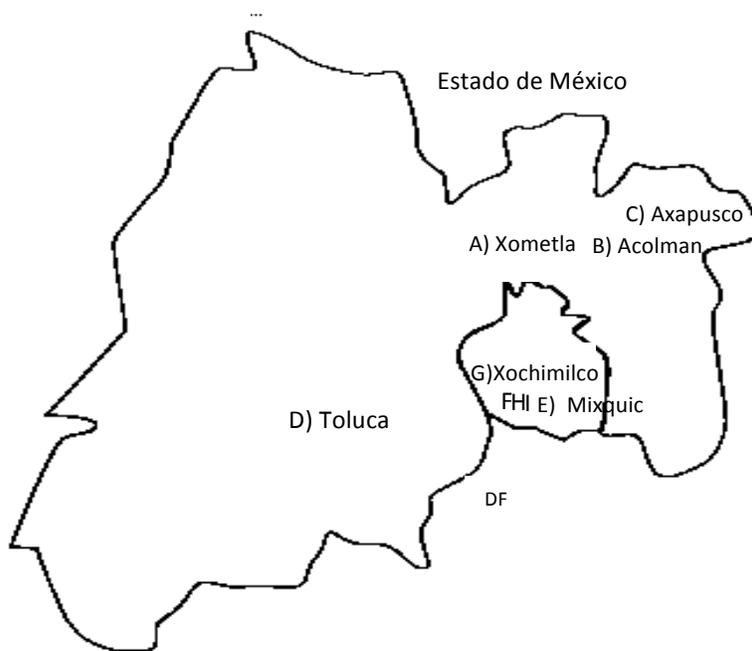


Figura 1. Origen de las muestras ambientales A)Xometla B)Acolman C)Axapusco D)Toluca E)Mixquic F)Bosque de Tlalpan G)Xochimilco H)Ajusco I)Topilejo

Las muestras se clasificaron como sigue:

Suelos urbanos: Bosque de Tlalpan y Xochimilco

Suelos semiurbanos: Mixquic, Toluca y Topilejo

Suelos rurales: Axapusco, Xometla, Ajusco y Acolman

Después del tratamiento con Benomilo y el secado de las muestras, se colocaron en placas con sílica gel y papel filtro como única fuente de carbono. La aparición de los cuerpos fructíferos o la degradación de celulosa se observó después de 3 semanas. Se observaron diferentes bacterias deslizantes como se muestra en la tabla 1, de las cuales algunos tipos se repetían en muestras diferentes.

Como la fuente de carbono que se encuentra en el medio es mínima, esto obliga a que las Mixobacterias formen el cuerpo fructífero bajo condiciones de estrés. Éste se forma gracias a que presentan un comportamiento autoorganizativo en respuesta al estímulo

ambiental (falta de nutrientes), y con esto la formación del cuerpo fructífero les permitirá sobrevivir. Esta característica es la que nos permite aislar a las Mixobacterias.

Crecimiento en	Familia	Origen
PAPEL FILTRO	<i>Mixococcus</i>	Toluca, Mixquic, Xometla y Xochimilco
	<i>Cistobacter</i>	Xochimilco y Bosque de Tlalpan
	<i>Cytophaga</i>	Mixquic
SÍLICA GEL	<i>Mixococcus</i>	Acolman
MADERA	<i>Stigmatela</i>	Acolman
	<i>Mixococcus</i>	Axapusco, Topilejo y Xometla
TIERRA	<i>Stigmatela</i>	Acolman
	<i>Mixococcus</i>	Ajusco, Xochimilco y Mixquic

Tabla 1. Variedad de bacterias deslizantes encontradas en las muestras ambientales estudiadas.

La identificación de los cuerpos fructíferos se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico, con base a las claves de identificación de Reinchench y Dworkin (1992).

La forma de los cuerpos fructíferos nos da una idea de la familia a la que pueden pertenecer los microorganismos.

Entre los diferentes cuerpos fructíferos que se observaron están los del género *Mixococcus*, que son pequeños sáculos de diferentes colores brillantes, éstos crecen ya sea en el papel filtro o en pedazos de madera, este género es uno de los más encontrados en el suelo.

Se encontraron también bacterias deslizantes del género *Cistobacter*, que parecen pequeños círculos color café con formación de algo parecido a un “limo” del mismo color, además degradación del papel filtro alrededor. Solo crecen sobre el papel filtro.

Stigmatela es un género difícil de encontrar, sus esporangiolos son de forma ovoide y con un tallo, en forma de flor, la formación de los cuerpos fructíferos es más elaborado.

Dentro de las bacterias deslizantes, también encontramos a las Citofagas, las cuales se diferencian de las anteriores en que no tienen la capacidad de formar cuerpos fructíferos, por lo que una forma preliminar de detectar el crecimiento de Citofagas es la presencia de pigmento sobre el papel, además de la degradación de la celulosa.

La celulosa (papel filtro) es la fuente de carbono que utilizan los microorganismos debido a la falta de otros nutrientes orgánicos disponibles. Al degradar el papel filtro las fibras de celulosa se debilitan hasta llegar al grado de desaparecer. En la figura 2, podemos observar la diferencia del papel degradado; en 2A el papel filtro se encuentra intacto, conforme fue pasando el tiempo las fibras del papel se fueron degradando, como alrededor no se observa el crecimiento de cuerpos fructíferos de *Mixobacterias* ni tampoco de hongos, lo más seguro es que se trate de *Cytophagas*. Podemos observar que el papel filtro se tornó de color café, esto es un indicio de la degradación de celulosa por *Cytophagas*.

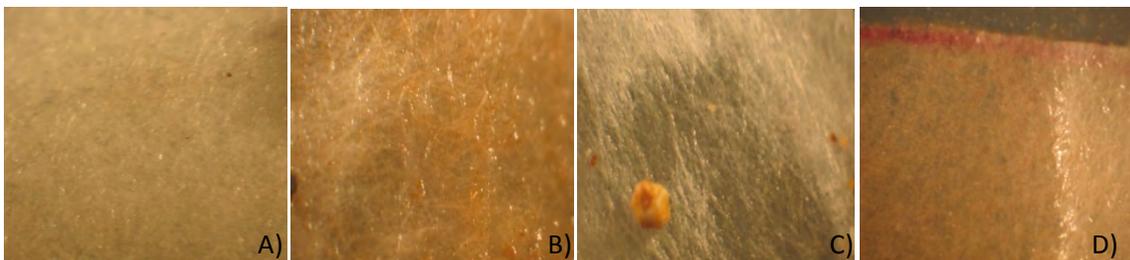


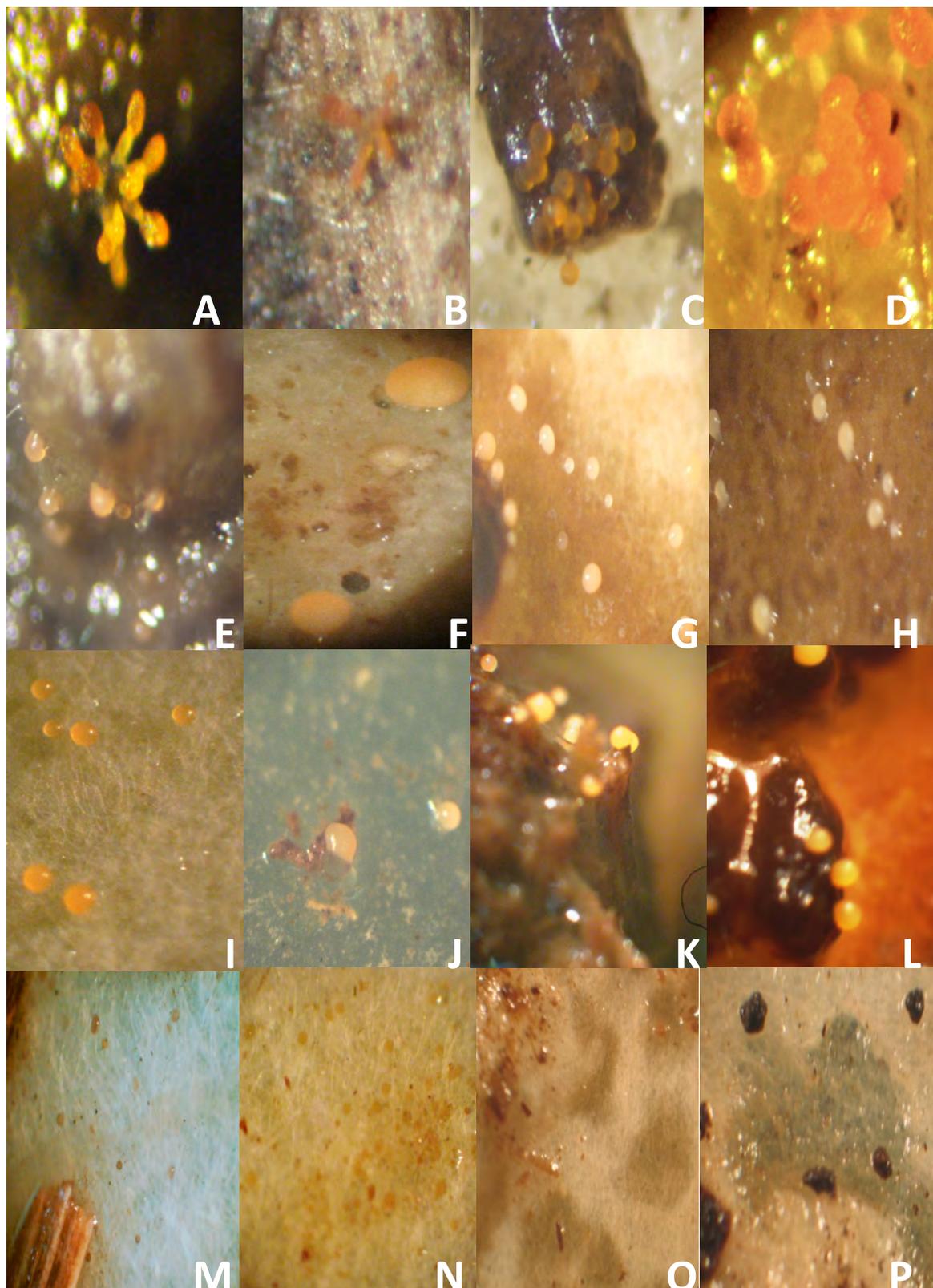
Figura 2. Etapas de degradación de papel filtro (Zoom 15X): A) celulosa intacta, fibras sin pliegues, B) fibras de celulosa con indicios de degradación, C) se logra ver delgadas fibrillas de celulosa de la cual está compuesto el papel filtro, D) celulosa completamente degradada.

■

■



Figura 3. Formación de diferentes cuerpos fructíferos de bacterias deslizantes provenientes de diferentes tierras (zoom 30X): A) *Stigmatela*, sobre tierra, Acolman. B) *Stigmatela*, sobre madera, Acolman, C) *Mixococcus*, sobre pedazo de madera, Axapusco. D) *Mixococcus*, sobre celulosa, Toluca. E) *Mixococcus*, sobre madera, Topilejo. F) *Mixococcus*, sobre celulosa, Mixquic. G) *Mixococcus*, sobre celulosa, con coloración café, Xometla. H) *Mixococcus*, sobre celulosa con coloración café, Ajusco. I) *Mixococcus*, sobre celulosa degradada, Xochimilco. J) *Mixococcus*, sobre sílica gel, Acolman. K) *Mixococcus*, sobre tierra, Xochimilco. L) *Mixococcus*, sobre excremento de conejo, Mixquic. M) *Cistobacter*, sobre celulosa, Xochimilco. N) *Cistobacter*, sobre celulosa, con coloración café, Bosque de Tlalpan. O) Citofaga, fibras de celulosa degradadas, Xochimilco. P) Citofaga, fibras de celulosa degradada con pigmentación café, Mixquic. La identificación de *Mixobacterias* se basó en las claves de identificación de Reinchench y Dworkin (1992.)



La formación de los cuerpos fructíferos o la degradación del papel, es la característica primordial para poder identificar en primera instancia, a las bacterias deslizantes con capacidad celulolítica. Por lo que la inspección diaria de las cajas, es el primer paso para el aislamiento de este tipo de bacterias; para el caso de las *Mixobacterias*, también nos podemos dar una idea según la forma de los cuerpos fructíferos a que familia pertenece. Como resumen, la figura 3 muestra la variedad de cuerpos observados, los cuales hemos descrito con anterioridad.

Podemos comparar lo encontrado con el trabajo publicado por Dawid (2000), que realizó una recopilación de diferentes muestras a nivel mundial. La figura 4 muestra géneros encontrados en este trabajo, con esto concordamos con Dawid en que los géneros más ubicuos son *Mixococcus*, *Cistobacter* y *Stigmatela*; y a pesar de que *Condromices*, también es un género muy encontrado, podemos atribuir el no encontrarlo, a que necesita un pH ácido (3-5) y para este estudio las cajas de sílica gel se llevaron a un pH final de 7, por lo que seguramente se inhibió el crecimiento de este género.

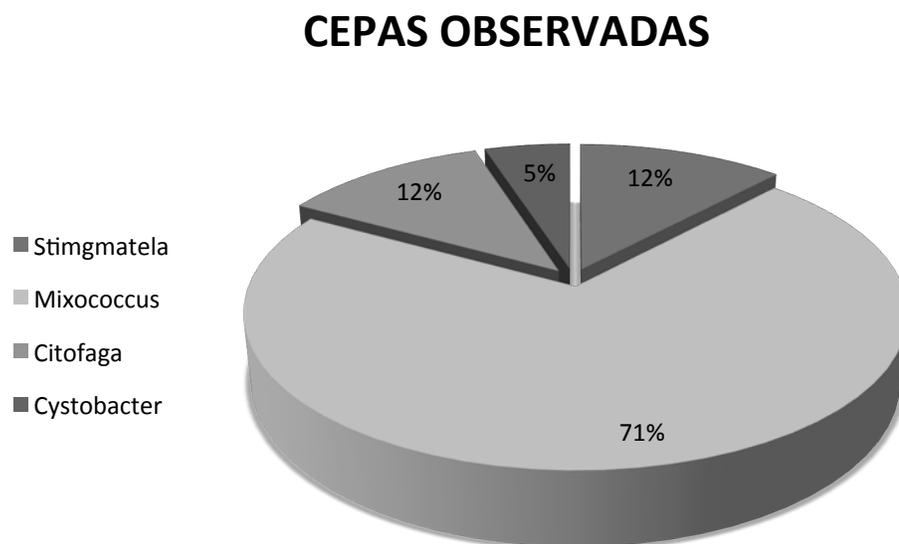


Figura 4. Porcentaje total de cepas observadas de las diferentes muestras ambientales.

6.2 CRECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS DESLIZANTES

De las bacterias observadas no se lograron cultivar todas, del lugar donde se aislaron más cepas, fue del Bosque de Talpan. En este suelo se encontró diferentes tipos de bacterias deslizantes. De los suelos de Mixquic se examinó papel filtro con aspecto degradado (hundimiento en el papel) tomando en cuenta que alrededor, no había crecimiento de hongos, por lo que probablemente el origen de ese hundimiento era producido por *Cytophagas*. Los cuerpos fructíferos observados en las tierras provenientes de Xochimilco, Axapusco y Ajusco se localizaron y aislaron con mayor facilidad, debido a sus colores llamativos y brillosos. En la tabla 2 se enlistan las cepas aisladas.

Origen de muestra ambiental	Observación al microscopio	Tipo de bacteria deslizante
Mixquic	Papel filtro degradado	Citofaga 1
Mixquic	Papel filtro degradado	Citofaga 2
Bosque de tlalpan	Cuerpo café circular pequeño	Mixobacteria 1
Bosque de tlalpan	Cuerpo café circular pequeño	Mixobacteria 2
Bosque de tlalpan	Cuerpo café circular pequeño	Mixobacteria 3
Xochimilco	Cuerpo rosa circular	Mixobacteria 4
Xochimilco	Cuerpo rosas circular	Mixobacteria 5
Axapusco	Cuerpo amarillo pequeño	Mixobacteria 6
Ajusco	Cuerpo pardo pequeño sobre papel filtro	Mixobacteria 7
Ajusco	Cuerpo esférico naranja, sobre hojas	Mixobacteria 8

Tabla 2. Cepas aisladas totales

Del total de cepas aisladas el mayor porcentaje provenían de suelos urbanos, seguido de los suelos rurales y con un menor porcentaje de suelos semiurbanos (figura 5). Estos resultados se pueden atribuir a que los suelos rurales son más pobres en nutrientes, por lo que las bacterias para sobrevivir se aprovechan del papel filtro que se les proporcionó como fuente de carbono. Con esto las Mixobacterias se vieron obligadas a formar cuerpos

fructíferos. En cambio, las bacterias del tipo *Cytophagas* lograron utilizar la celulosa y degradarla, produciendo degradación del papel filtro.

CEPAS AISLADAS

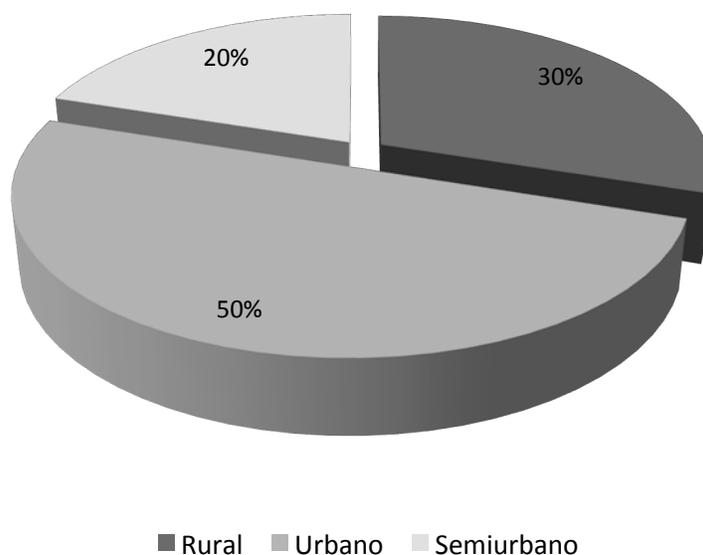


Figura 5. Porcentajes de cepas totales aisladas de bacterias deslizantes, según el tipo de suelo del que provenían.

Al identificar los cuerpos fructíferos o la degradación de papel filtro, estos se trasladaron a un medio selectivo (Mc Conkey) para comenzar con el aislamiento de las cepas. Este medio nos ayuda, pues las sales biliares inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivas y crecen solo las Gram negativas. Al inicio de la purificación se encontraba una mezcla de bacilos y cocos, pero con las subsecuentes purificaciones se logró la obtención de las cepas puras. Una vez obtenidas las cepas puras se mantuvieron en medio Cy.

6.3 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS

6.3.1 MORFOLOGÍA COLONIAL

Algunos cuerpos fructíferos aislados de las cajas de sílice eran parecidos, pero el crecimiento en medio Mc Conkey indicó que se trataba de cepas distintas debido a la diferencia entre colonias. Como se observa en la tabla 8, las cepas aisladas del Bosque de Tlalpan, aunque las 3 fueron obtenidas de dicho bosque y eran parecidas en forma, al sembrarlas en Mc Conkey, se evidenció las diferencias por la forma de las colonias obtenidas y la forma de sus bacilos. Lo mismo ocurre con las obtenidas de Xochimilco, que resultaron colonias y forma de bacilos diferentes. Lo obtenido de la degradación del papel filtro, también muestra que se trataba de dos cepas diferentes, pues un tipo era circular y la otra era puntiforme; la diferencia de cepas también se puede observar con la forma de los bacilos, pues ya que la cepa C1 muestra bacilos más largos y puntiagudos, en cambio, los bacilos de la cepa C2 tienen terminaciones achatadas. La tabla 3, nos muestra la morfología colonial de las cepas cultivadas.

	Colonias en agar Mc Conkey	Colonias en agar Cy
C1	Puntiforme, borde entero, elevada, cremosa, rosa	Puntiforme, borde entero, elevada, blanca
C2	Circular pequeña, borde entero, elevada, cremosa, rosa	Puntiforme, borde entero, elevada, blanca
M1	Puntiforme, borde entero, cremosa, rosa	Puntiforme, borde entero, elevada, crema
M2	Circular, borde entero, elevada, cremosa, rosa	Circular, borde entero, elevada, crema
M3	Circular, borde entero, elevada, viscosa, rosa	Circular, borde entero, elevada, blanca
M4	Circular, borde entero, elevada, viscosa, rosa	Circular, borde entero, elevada, blanca
M5	Puntiforme, borde entero, elevada, cremosa, rosa	Puntiforme, borde entero, elevada, blanca
M6	Circular, borde entero, elevada, cremosas, rosa	Puntiforme, borde entero, elevada, blanca
M7	Circular pequeña, borde entero, elevada, cremosas, rosa	Puntiforme, borde entero, elevada, blanca
M8	Puntiforme, borde entero, elevada, cremosa, rosa	Puntiforme, borde entero, elevada, crema

Tabla 3. Características morfológicas de las cepas en diversos medios

Las cepas restantes tenían diferente forma en el cuerpo fructífero y eso se vió reflejado en la forma de las colonias en el medio Mc Conkey.

6.3.2 MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA

Otra característica importante es la morfología microscópica. Para ello se reveló la morfología de los microorganismos por medio de una tinción de Gram. En la figura 6, se muestran las cepas purificadas.

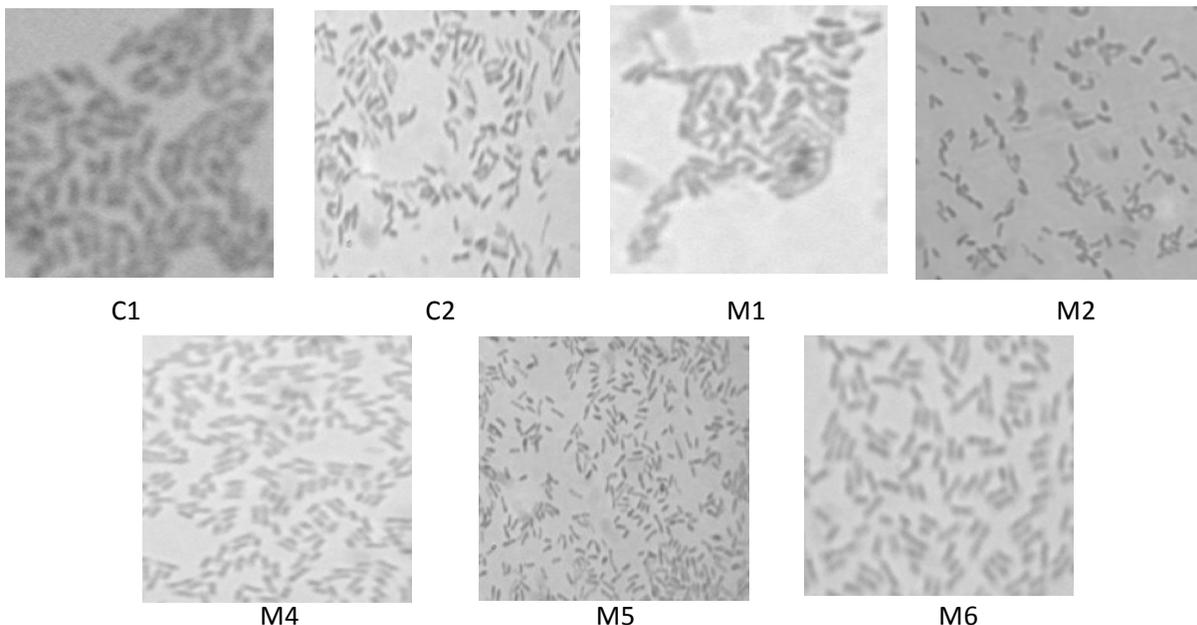


Figura 6. Morfología microscópica de las cepas cultivadas C1, C2, M1, M2, M4, M5 y M6

Se pueden observar las diferencias de los bacilos, C1 y C2, son bacilos largos. M1 tiene forma de bacilo delgado, con una punta en forma de varilla. M2 se trata de bacilos un poco más pequeños, también delgados y con final en forma de varilla. M4 muestra los bacilos delgados. M5, muestra los bacilos más pequeños y delgados. M6 son bacilos delgados, con final cilíndrico.

6.3.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Una vez obtenida la cepa pura se continuó con la caracterización de cada una, poniendo de manifiesto el metabolismo por medio de una batería de pruebas bioquímicas.

Complementando lo anterior, también se observó la sensibilidad de las cepas aisladas a diferentes antibióticos.

Prueba	C1	C2	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Hemólisis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OF	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Catalasa	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
LIA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+

FUENTE DE CARBONO

Manitol	+	+g	+g	+	+g	+g	-	+g	+g	+g
Sacarosa	+	+g	-	-	-	+	-	-	-	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+g	+g	-	+g	+g	+	+g	+g	+g
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactosa	+	+g	+g	+	+g	+g	+	+g	+g	+g
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DEGRADACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Almidón	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CMC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS**

AK: Amikacina 30µg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AM: Ampicilina 10µg	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
CB: Carbenicilina 100µg	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
CF: Cefalotina 30µg	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
CTX: Cefotaxima 30µg	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CRO: Ceftriaxona 30µg	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
CL: Cloranfenicol 30µg	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
GE: Gentamicina 10µg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NET: Netilmicina 30µg	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
NF: Nitrofurantoina 300µg	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
PEF: Pefloxacina 5µg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
STX: Trimetoprim-Sulfametoxazol 25µg	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+

* En la sensibilidad a antibióticos + significa que fue sensible al antibiótico, eso quiere decir inhibición del crecimiento.

Tabla 4. Caracterización bioquímica de las diferentes cepas

Teniendo en cuenta la caracterización de las cepas podemos sugerir la siguiente clasificación:

Las cepas C1 y C2 como se observa en la tabla 2, se aislaron de papel filtro degradado sin formación de cuerpo fructífero, por ello, pertenecen al orden de las *Cytophagales*, la observación microscópica mostró bacilos largos, Gram negativos. El papel filtro de donde se aisló presentó pigmento color café y las fibras de celulosa se lograban ver degradadas, y alrededor de estas no se observó la presencia de cuerpos fructíferos ni de hongos. Con esto se puede sugerir que presuntamente se trate de: **Orden, Cytophagales, Familia Cystophagacea, Género Cytophagas.**

Como se muestra en la tabla 2, el aislamiento de las cepas M1, M2 y M3 provenían de un cuerpo color café de forma circular y tamaño pequeño, en cambio, el cuerpo fructífero de la M4 era un cuerpo de color rosa de forma circular, y por último, M7 se trataba de un cuerpo pequeño, color pardo. Los bacilos de estas cepas fueron cilíndricos Gram negativos. Cuando se observó al microscopio sus esporas (mixoesporas) resultaron de

forma ovoide. En medio líquido formaban biopelícula. Por ello posiblemente se trate de *Myxococcus fulvus*.

La cepa M5 se aisló de cuerpo rosa circular, la cepa M6 se aisló de cuerpo amarillo pequeño y la M8 de cuerpo esférico color naranja. Los bacilos de estas cepas fueron cilíndricos Gram negativos. Cuando se observó al microscopio sus esporas (mixoesporas) resultaron de forma esférica. En medio líquido formaban biopelícula. Por ello posiblemente se trate de *Myxococcus xhantus*.

6.4 ACTIVIDAD CELULOLÍTICA CUALITATIVA

Al realizar el asilamiento de las cepas, un punto a tomar en cuenta fue el crecimiento sobre papel filtro, pues ya que esto nos daba la pauta que para poder degradarlo, posiblemente utilizan un conjunto de celulasas.

Para corroborar esto, las cepas se crecieron en placas de CMC (5 g/L) y se revisaron cada 24 horas. En las primeras 24 horas, al realizarles la tinción con rojo congo, no se logró observar halo de degradación en ninguna de las cepas. Fue hasta las 72 horas que se logró ver un halo en algunas bacterias de las cepas C2, M2, M4 y M5.

De estas cepas, se decidió trabajar con C2, M1 y M4 pues son las que en el medio Cy tenían un crecimiento en menor tiempo y produjeron halos más grandes.

En la figura 7, podemos observar uno de los halos de degradación de la cepa M2:

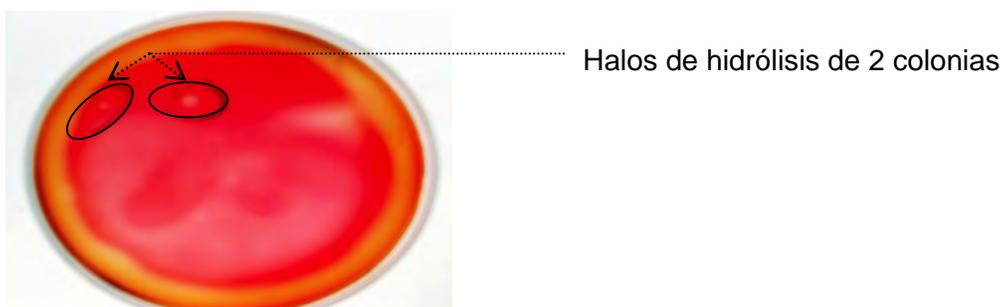


Figura 7. Halos de degradación de la cepa M2

Las cepas utilizadas para poner de manifiesto la actividad pectinolítica fueron aisladas en trabajos anteriores (Chirino, 2008).

6.5 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD EXO-CELULOLÍTICA Y EXO-PECTINOLÍTICA PROVENIENTE DE SUSTRATOS COMPLEJOS

Una vez seleccionadas las cepas que mostraron mejor actividad celulolítica cualitativa en las placas de rojo congo, se cultivaron junto con las cepas pectinolíticas (anteriormente aisladas), en sustratos complejos que fueron, pera, manzana, naranja y zanahoria.

La temperatura juega un papel muy importante en las reacciones donde intervienen las enzimas, por ello se decidió trabajar con dos temperaturas diferentes: 28° C y 30° C. De estos, cada 24 horas se tomó una alícuota, la cual se centrifugó, evaluando las enzimas del sobrenadante sobre CMC y pectina puras.

En el sobrenadante se encuentran suspendidas las exo-enzimas que permiten la degradación de los diferentes sustratos, por lo que al mezclarlo con la celulosa o pectina puras, las enzimas presentes en el sobrenadante podrán efectuar una acción catalítica, rompiendo las cadenas de los polisacáridos, liberando así azúcares reductores, los cuales se pudieron medir por medio del método del DNS, con el cual al obtener los mg de monómeros (glucosa o ácido galacturónico) podemos determinar la actividad tanto celulolítica como pectinolítica.

Las cepas celulolíticas elegidas por su mayor actividad cualitativa en placas de rojo congo, fueron C2 (*Cytophagas*), M1 (*Mixococcus fulvus*) y M4 (*Mixococcus fulvus*); en las gráficas a continuación se nombrarán como C2, M1 y M4.

Se respetó la nomenclatura de las cepas pectinolíticas que tenían de experimentos anteriores (H1, H2 y H3) (Chirino, 2008).

6.6 EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES EXO-CELULOLÍTICAS

6.6.1 ACTIVIDAD EXO-CELULOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE PERA

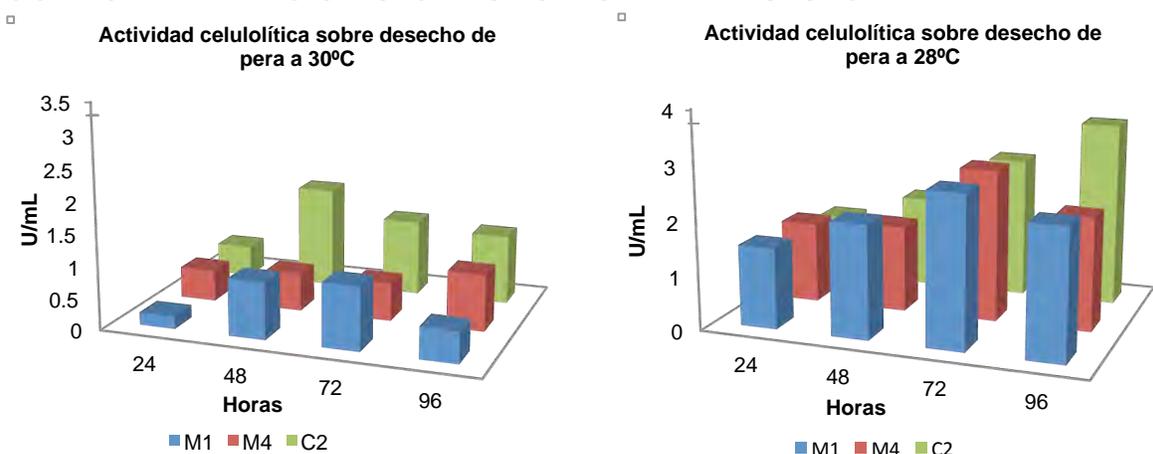


Figura 8. Cuantificación de la actividad exocelulolítica del sobrenadante obtenido de las cepas M1, M4 y C2, (28 y 30° C) crecidas sobre cáscara de pera

La cuantificación de la actividad exocelulolítica del sobrenadante proveniente de las cepas crecidas en pera, se puede observar en la figura 8. El comportamiento de las enzimas provenientes de las cepas fue similar para las dos temperaturas de ensayo, observando una mayor actividad con las enzimas de C2, seguida de M1 y finalmente M4.

Una variable importante por la que se ve influenciada la actividad enzimática es la temperatura, como se puede ver reflejado en la figura 8, ya que las enzimas de las cepas tuvieron una mayor actividad, cuando se crecieron a una menor temperatura (28° C). Las enzimas provenientes de la cepa M4, presentaron una actividad máxima de 0.8 U/mL cuando la cepa se creció a 30° C, mientras a 28° C fue de 2.8 U/mL; para el caso de las enzimas de M1 a 30° C fue de 1 U/mL y a 28° C de 2.8 U/mL; finalmente la cepa C2 a 30° C, el tope de actividad fue 1.6 U/mL y a 28° C 3.4 U/mL.

El tiempo jugó un papel importante, como se puede observar en la figura 8, las enzimas de la cepa M1, presentaron su mayor actividad en menor tiempo (72 h) pero la actividad también fue menor 2.8 U/mL; las enzimas de la cepa C2 les lleva más tiempo llegar a su

máximo de actividad (**96 h**) pero presentan mayor actividad que el resto de las cepas con **3.4 U/mL**.

6.6.2 ACTIVIDAD EXO-CELULOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE MANZANA

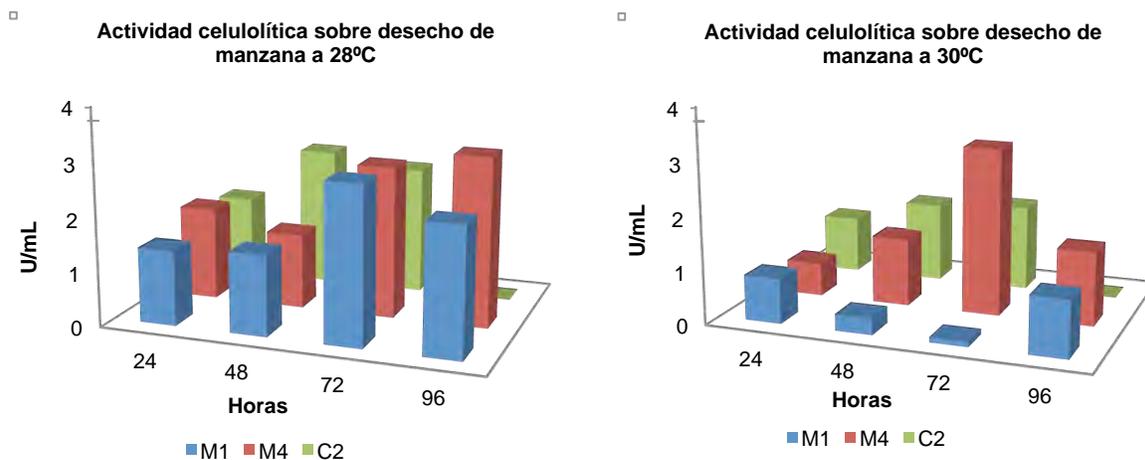


Figura 9. Cuantificación de la actividad exocelulolítica del sobrenadante obtenido de las cepas M1, M4 y C2, (28 y 30° C) crecidas sobre cáscara de manzana.

En la figura 9 se muestra la comparación de la cuantificación de actividad exocelulolítica del sobrenadante de las cepas sobre cáscara de manzana. A pesar de ser las mismas cepas, el comportamiento de sus enzimas secretadas, no es similar en las temperaturas ensayadas.

La actividad exocelulolítica se ve influenciada por la temperatura, pues podemos observar que a 28° C las enzimas de las cepas tienen mayor actividad que a 30° C, esto podría significar que a esa temperatura, la producción de enzimas celulolíticas es más eficiente.

Una diferencia notable se puede observar con las enzimas provenientes de la cepa M1, pues ya que la mayor actividad alcanzada a 28° C, fue de 2.9 U/mL a las 72 h, a diferencia su similar a 30° C, fue de 1 U/mL a las 96 h. En cambio, la mayor actividad observada de las enzimas presente en C2 a 28° C, fue de 2.6 U/mL (48 h), y a 30° C fue de tan solo 1.6 U/mL (72 h); a las 96 horas la actividad se perdió. Para **M4**, la actividad

máxima en ambas temperaturas fue de **3.1 U/mL**, sin embargo, a **28° C** se alcanza hasta las 96 horas, pero a **30° C** alcanza su máximo en menor tiempo **72 h**.

Para las enzimas de las cepas M4 y C2 la temperatura más conveniente para llegar a su máximo de actividad fue a 28° C. Sin embargo, las de M4 mostraron el mismo tope de actividad en las dos temperaturas, pero a 30° C esta se logró en menor tiempo.

6.6.3 ACTIVIDAD EXO-CELULOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE NARANJA

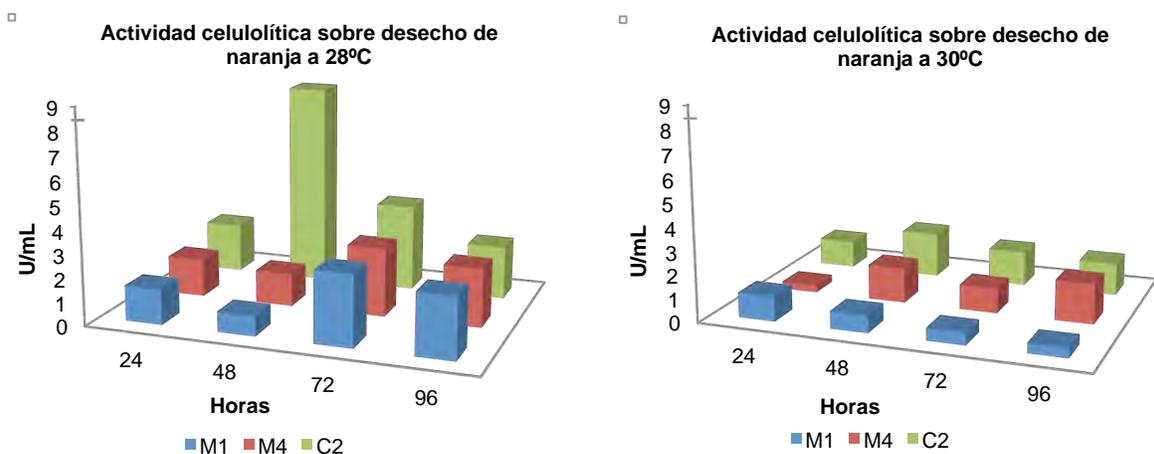


Figura 10. Cuantificación de la actividad exocelulolítica del sobrenadante obtenido de las cepas M1, M4 y C2, (28 y 30° C) crecidas sobre cáscara de naranja.

El comportamiento de las enzimas del sobrenadante de las cepas crecidas sobre cáscara de naranja, se observa en la figura 10. Existe una notoria diferencia en el efecto de la actividad enzimática debido a la temperatura, pues ya que a 28° C se presenta por mucho una mayor actividad.

Para el caso de ambas temperaturas, se observa un perfil de mayor actividad para las enzimas provenientes de la cepa C2, seguida por M4 y finalmente M1.

Un máximo de actividad lo alcanzan las enzimas de la cepa **C2** a 28° C, con **8.5 U/mL** a las **48 h**; su similar al mismo tiempo solo logra llegar a 1.9 U/mL. La cepa M4 a 28° C, alcanza el tope a 72 h con 2.9 U/mL, en estas mismas a 30° C, se presenta a las 96 h con 1.7 U/mL. Por último, M1 a 28° C es de 3 U/mL a las 72 h, contra 1 U/mL a las 24 h.

Las enzimas provenientes de la cepa C2 muestra una enorme diferencia entre ambas temperaturas, para llegar a su máxima actividad, pues a 28° C no solo alcanza una actividad mucho mayor, sino que la muestra en menor tiempo.

6.6.4 ACTIVIDAD EXO-CELULOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE ZANAHORIA

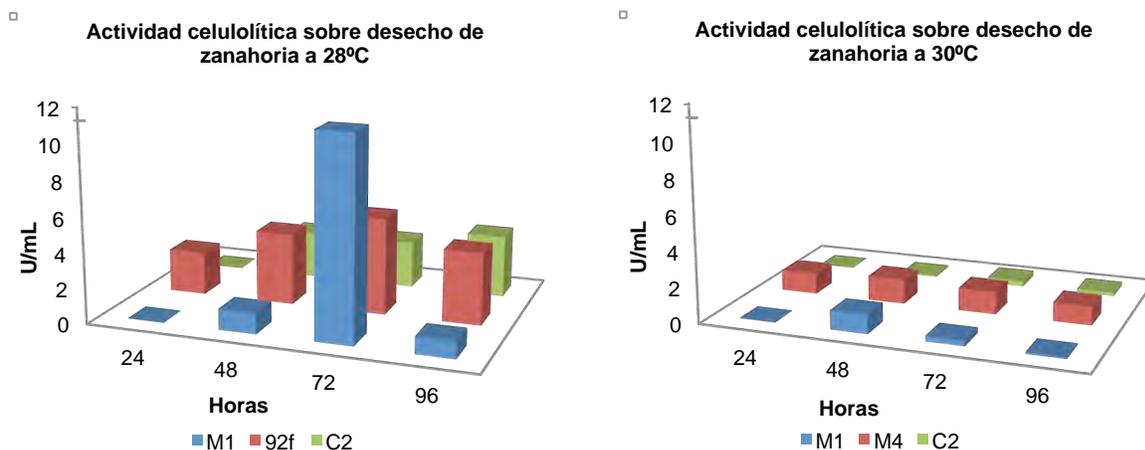


Figura 11. Cuantificación de la actividad exocelulolítica del sobrenadante obtenido de las cepas M1, M4 y C2, (28 y 30 °C) crecidas sobre cáscara de zanahoria.

El perfil de cuantificación enzimática de los sobrenadantes provenientes de cepas que se cultivaron en cáscaras de zanahoria, se muestra en la figura 11. Siguiendo el comportamiento de los ensayos anteriores, a 28 °C se obtiene mayor actividad de las enzimas provenientes de las cepas estudiadas que a 30 °C.

Las enzimas provenientes de cepa M1, son las que tienen mayor actividad cuando se crecieron a **28 °C** con **11.4 U/mL** a las **72 h**, a diferencia cuando se trató a 30 °C que fue de 1 U/mL a las 48 h. Las enzimas de M4 mostraron su mayor actividad a 28 °C con 5.5 U/mL a las 72 h, en cambio, a 30 °C fue de 1.3 U/mL a las 48 h. Finalmente, las de C2, de 28 °C fueron 3.5 U/mL a las 96 h, contra 0.3 U/mL a las 72 h.

La temperatura evaluada en este ensayo es un factor sumamente importante, pues como se puede observar las mismas cepas mostraron una actividad más elevada a 28 °C que a 30 °C.

6.7 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DEL SOBRENADANTE EN CEPAS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

En la tabla 5, se presenta un resumen de las mayores actividades enzimáticas producidas por las enzimas que se encontraban en el sobrenadante de las cepas. La diferencia de actividades en los sustratos, se puede atribuir a la composición química de cada uno. Por ejemplo, la cantidad de celulosa en la zanahoria, provocó que la cepa bacteriana crecida en este sustrato podría haberse visto obligada a liberar más enzimas (figura 12) y por ello al evaluarla en un sustrato puro (CMC), pudo actuar de mejor forma, produciendo una actividad enzimática elevada.

Las enzimas son de naturaleza química proteica, por ello al excretarlas al medio, las podemos cuantificar por medio del método de Bradford.

La figura 12, muestra la comparación de la actividad enzimática con el perfil de proteína presente en el sobrenadante de cada muestra. Se eligió solo una cepa de las tres estudiadas; ésta fue la que presentó mayor actividad en cada sustrato que el resto.

Sustrato	Actividad enzimática (U/mL)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Cepa
Pera	3.4	96	28	C2
Manzana	3.1	72	28	M4
Zanahoria	11.4	72	28	M1
Naranja	8.5	48	28	C2

Tabla 5. Resumen de la cuantificación de actividad celulolítica sobre diferentes sustratos

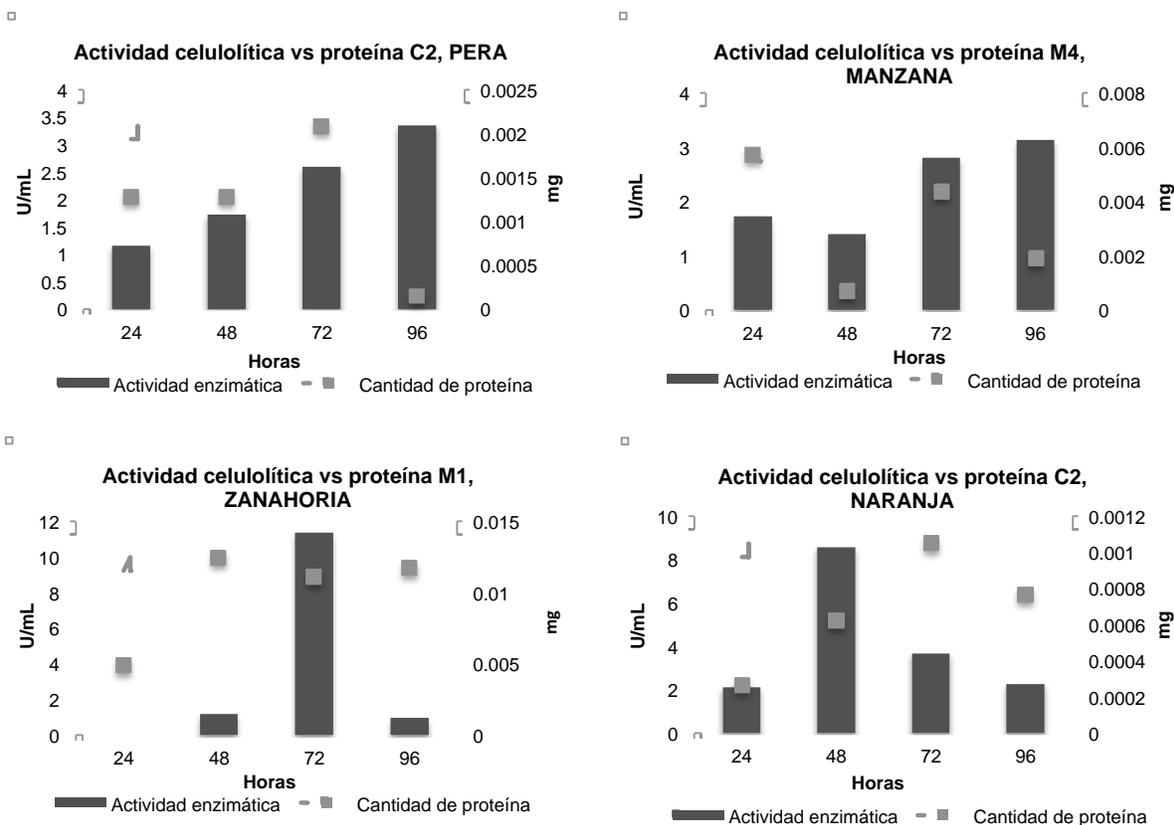


Figura 12. Comparación de la actividad celulolítica con la cantidad de proteína secretada en el sobrenadante. Cepas que presentaron la mayor actividad celulolítica.

Quando se crecieron en pera, el máximo de cantidad de proteína extracelular se alcanza a las 72 horas, con **0.0021 mg** de proteína. A las 96 horas, que es cuando se alcanza la mayor actividad celulolítica, la cantidad de proteína es de **0.00014 mg** de proteína. El perfil de proteína, aumenta durante las primeras 72 horas y a las 96 disminuye, pero en este tiempo, la actividad enzimática es mayor, aunque hay menos enzimas totales, las células presentes, actúan de manera más eficiente, lo que permite escindir de mejor forma a la celulosa.

Al poner a crecer las cepas sobre el sustrato complejo de cáscaras de manzana, la cantidad de proteína total tiene una caída a las 48 h, pero se eleva de nuevo a las 72 horas. Cuando se obtuvo la mayor actividad enzimática, la cantidad de proteína total fue de **0.0043 mg**.

Sobre el sustrato de zanahoria, fue donde la actividad enzimática sobrepasó considerablemente a las actividades del resto de los sustratos. La cantidad de proteína a las 72 horas, en donde se da el máximo de actividad, es de **0.01 mg**, presentando también la mayor cantidad de proteína secretada al medio por las cepas.

La cepa C2, por su parte cuando se creció en naranja, presenta un máximo de cantidad de proteína a las 72 horas, mientras la máxima actividad fue a las 48 horas, con 0.0006 mg. Aunque no coinciden el máximo de actividad y de proteína, a las 48 horas la actividad enzimática es mayor en comparación a las 72 horas, pues a esta última medición hay mayor cantidad de proteína, pero es menor la actividad.

6.8 EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES EXO-PECTINOLÍTICAS

6.8.1 ACTIVIDAD EXO-PECTINOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE PERA

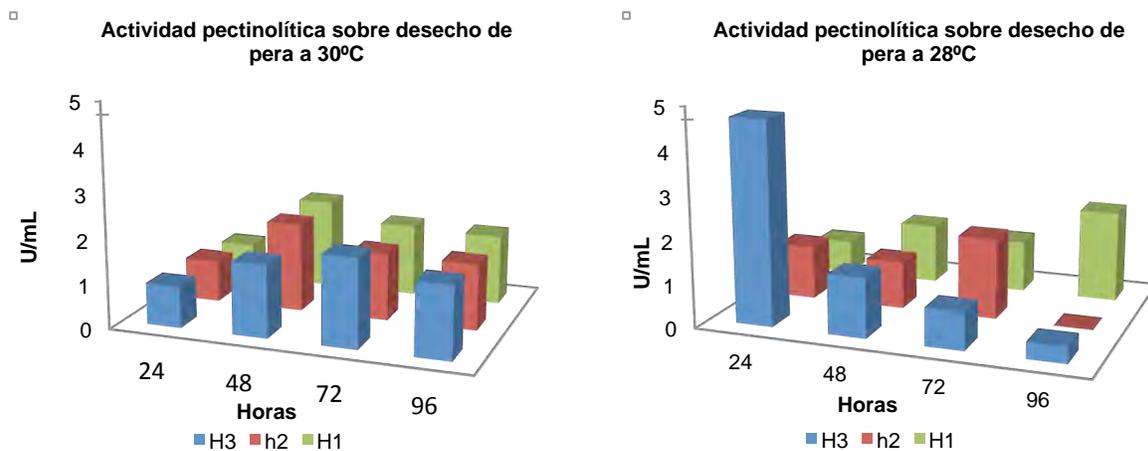


Figura 13. Cuantificación de la actividad exopectinolítica del sobrenadante obtenido de las cepas H1, H2 y H3 (28 y 30 °C), crecidas sobre cáscara de pera.

La comparación de la cuantificación de actividad exopectinolítica del sobrenadante de las cepas sobre cáscara de pera, se observa en la figura 13. El comportamiento de los sobrenadantes de las cepas ensayadas a 28 °C y 30 °C, a pesar de ser las mismas cepas, no es similar.

Un cambio en la temperatura afecta la actividad exopectinolítica, a 28 °C las enzimas presentes en los sobrenadantes de las cepas muestran mayor actividad que a 30 °C, esto se puede ver relacionado con que a esa temperatura, la producción de enzimas pectinolíticas es mejor.

Una diferencia notable se puede observar con las enzimas provenientes de la cepa **H3**, pues la mayor actividad alcanzada a **28 °C** fue de **4.7 U/mL** a las **24 h**, mientras que a 30 °C, fue de 2 U/mL a las 72 h. En cambio, la mayor actividad observada de las enzimas de la cepa H1 a 28 °C, fue de 2.1 U/mL (72 h), y a 30 °C fue de tan sólo 2 U/mL (48 h). Para H2, la actividad máxima en ambas temperaturas fue de 2 U/mL, sin embargo, a 28 °C se alcanza a las 72 h, pero a 30 °C alcanza su máximo en menor tiempo, a las 48 h. Las enzimas presentes en el sobrenadante de la cepa H3, fueron las que presentaron la mayor actividad en menor tiempo por encima de H1 y H2.

6.8.2 ACTIVIDAD EXO-PECTINOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE MANZANA

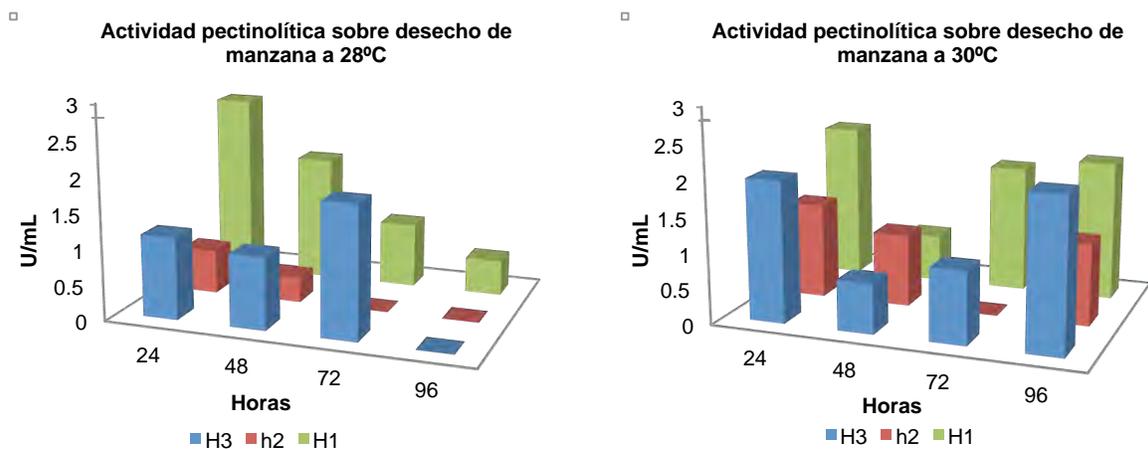


Figura 14. Cuantificación de la actividad exopectinolítica del sobrenadante obtenido de las cepas H1, H2 y H3 (28 y 30 °C), crecidas sobre cáscara de manzana.

La cuantificación enzimática de los sobrenadantes provenientes de cepas que se cultivaron en cáscaras de manzana, se muestra en la figura 14. Siguiendo el

comportamiento de los ensayos anteriores, a 28 °C se obtiene una mayor actividad de las enzimas provenientes de las cepas estudiadas, a diferencia de 30 °C.

Las enzimas provenientes de la cepa **H1**, son las que tienen mayor actividad con **2.5 U/mL** a las **24 h** cuando se crecieron a **28 °C**, a diferencia de cuando se trató a 30 °C que fue de 2 U/mL en el mismo tiempo. Las enzimas de H3 mostraron mayor actividad a 28 °C con 1.8 U/mL a las 72 h, en cambio, a 30 °C fue de 2.1 U/mL a las 96 h. Finalmente, las de H2, de 28 °C fue 0.6 U/mL a las 24 h, contra 1.3 U/mL a las 24 h a 30° C.

El tiempo fue de suma importancia en este ensayo, pues ya que a las 24 horas, fue cuando se alcanzaron las mayores actividades de las enzimas.

6.8.3 ACTIVIDAD EXO-PECTINOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE NARANJA

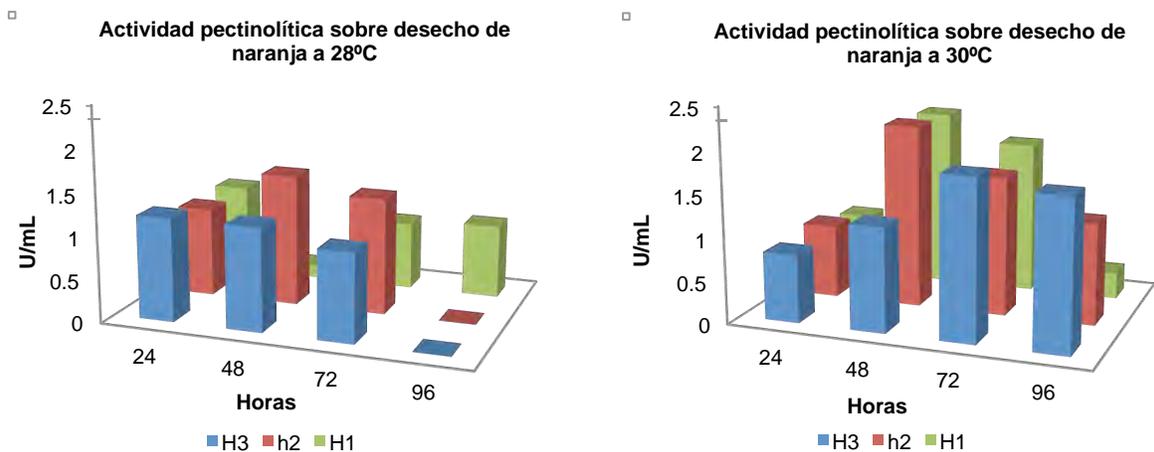


Figura 15. Cuantificación de la actividad exopectinolítica del sobrenadante obtenido de las cepas H1, H2 y H3 (28 y 30 °C), crecidas sobre cáscara de naranja.

La figura 15, muestra la comparación de la cuantificación de actividad exopectinolítica del sobrenadante de las cepas sobre cáscara de naranja. A diferencia de los ensayos anteriores, la cepas crecidas a 30 °C tuvieron actividad enzimática mayor que la presentada por las enzimas de las mismas cepas a 28 °C.

Se aprecia la diferencia en la actividad de las enzimas provenientes de la cepa **H2**, pues ya que la mayor actividad alcanzada a 28 °C fue de 1.5 U/mL a las 48 h, a diferencia de su similar que a **30 °C** fue de **2.1 U/mL** a las **48 h**. En cambio, la mayor actividad observada en las enzimas presente en H1 a 28 °C fue de 1 U/mL (24 h), y a 30 °C fue de 2 U/mL (24 h). Para H3, la actividad máxima a 28 °C, se alcanza hasta las 24 h con 1.2 U/mL, pero a 30 °C alcanza su máximo a las 72 h, con 1.8 U/mL.

6.8.4 ACTIVIDAD EXO-PECTINOLÍTICA CRECIDA EN DESECHO DE ZANAHORIA

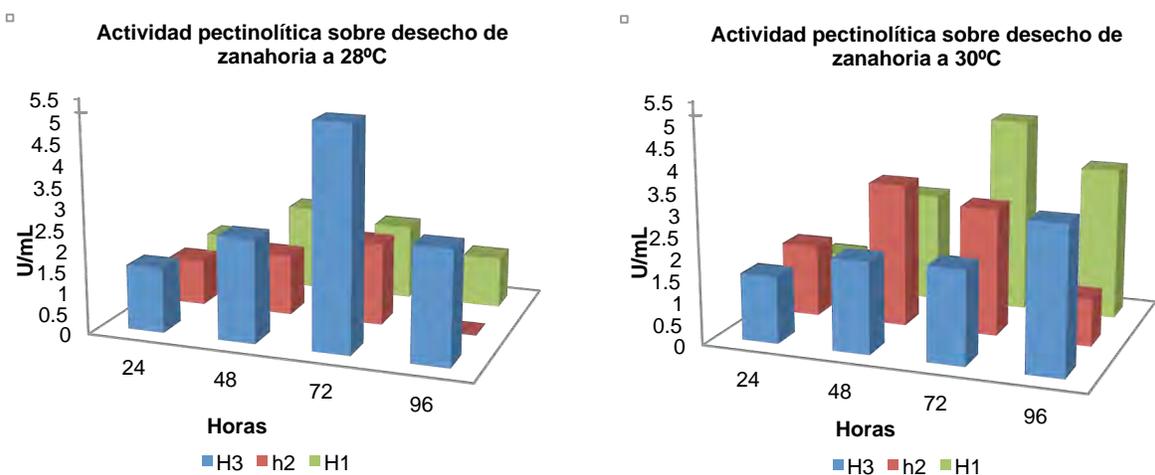


Figura 16. Cuantificación de la actividad exopectinolítica del sobrenadante obtenido de las cepas H1, H2 y H3 (28 y 30 °C), crecidas sobre cáscara de zanahoria.

El comportamiento de las enzimas del sobrenadante de las cepas crecidas sobre cáscara de zanahoria, se observa en la figura 16. El efecto de la actividad enzimática relacionada con la temperatura, es mayor cuando se trabaja a 28 °C.

Un máximo de actividad lo alcanzan las enzimas de la cepa **H3** a 28 °C con **5.2 U/mL** a las **72 h**, su similar muestra una actividad de 3.5 U/mL a las 96 h. Las de la cepa H2 a 28 °C, alcanza el tope a las 72 h con 1.9 U/mL, estas mismas a 30 °C, lo presentan a las 24 h con 1.3 U/mL. Por último, el máximo de las enzimas provenientes de H1 a 28 °C es de 2 U/mL a las 48 horas, contra 4.5 U/mL a las 72 h a 30 °C.

6.9 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DEL SOBRENADANTE EN CEPAS CON ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA

La tabla 6, presenta el resumen de actividades enzimáticas producidas por las enzimas que se encontraban en el sobrenadante de las cepas. La diferencia de actividades en los sustratos utilizados, se debe a la distinta composición química de cada uno. Por ejemplo, la zanahoria contiene mayor cantidad de pectina que el resto de los sustratos, por ello la cepa bacteriana crecida en este sustrato, liberó una mayor cantidad de enzima (figura 17), debido a esto, al evaluarla en un sustrato puro (pectina), actuó de mejor forma, mostrando una actividad enzimática elevada.

Sustrato	Actividad enzimática (U/mL)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Cepa
Pera	4.7	24	28	H3
Manzana	2.5	24	28	H1
Zanahoria	5.2	72	28	H3
Naranja	2.1	48	30	H2

Tabla 6. Resumen de la cuantificación de actividad celulolítica sobre diferentes sustratos

Como lo muestra la figura 17, en pera, el máximo de cantidad de proteína se alcanza inmediatamente a las 24 horas, con **0.001** mg de proteína, al igual que la actividad enzimática. El perfil de actividad enzimática y cantidad de proteína tienen la misma tendencia, esto es, que la cantidad de enzima que se está secretando al medio, está actuando de manera eficiente para poder degradar el sustrato.

Cuando se creció sobre el sustrato complejo de cáscaras de zanahoria, la mayor actividad enzimática se da, cuando la cantidad de proteína también es máxima, esto es a las 72 horas, con **0.018** mg.

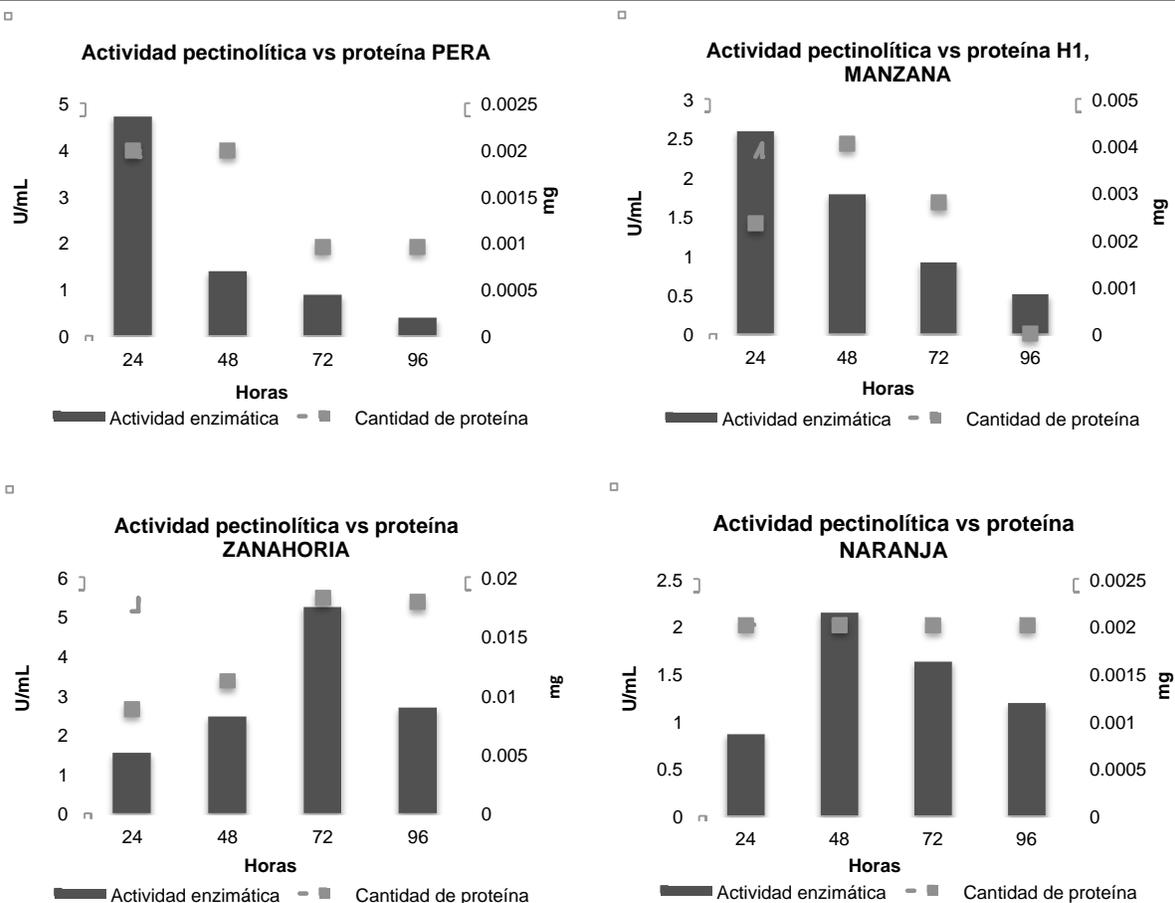


Figura 17. Comparación de la actividad pectinolítica con la cantidad de proteína secretada en el sobrenadante. Cepas que presentaron la mayor actividad celulolítica.

Las cepas crecidas sobre el sustrato de manzana, mostraron una mayor actividad enzimática que el resto de los sustratos. La cantidad de proteína a las 72 horas, en donde se da el máximo de actividad, es de **0.01 mg**, sin embargo, a las 48 horas existe mayor producción de proteína 0.048 mg. A pesar de producirse menos proteína a las 72 horas, la actividad fue más eficiente que a las 48 horas, obteniendo una mejor actividad enzimática. Finalmente, cuando se cultivó en el sustrato de cáscaras de naranja, el perfil de cantidad de enzima se presenta constante durante todo el tiempo de ensayo. Sin embargo a las 48 horas es cuando se observa mayor actividad enzimática.

Como se ve claramente, la actividad enzimática varió mucho dependiendo del sustrato en el cual las cepas fueron crecidas, esto se ve relacionado de manera muy directa con la composición química de cada sustrato.

6.10 COMPARACIÓN CON ENZIMAS COMERCIALES

Se evaluaron de la misma forma que los sobrenadantes, 2 enzimas comerciales, pectoliasa de *Aspergillus japonicus* (P3026-100MC) y celulasa de *Aspergillus niger* (C118-SKU 103K0983). Se eligieron estas dos enzimas, ya que las enzimas provenientes de hongos son las más utilizadas en la industria.

Las enzimas se evaluaron en un rango de 0.002 - 0.02 mg, para poder comparar la actividad producida por las cepas estudiadas en este trabajo, en relación a la cantidad de proteína secretada. La figura 18 nos muestra el perfil enzimático de estas dos enzimas; conforme aumenta la cantidad de proteína la actividad enzimática se incrementa.

Al comparar la actividad de las enzimas presentes en sobrenadantes de cepas crecidas en manzana, arrojó una medición de 0.0014 mg de proteína total, entre éstas se encuentran las enzimas celulasas y pectinasas, las enzimas que actuaron generaron 3.4 U/mL, superando la actividad de la enzima comercial que se encuentra pura, pues ya que para igualar esta actividad, se necesita más de 0.002 mg de enzima pura.

Al igual que el caso anterior, al comparar la actividad de las cepa M4, cuando se tiene 0.018 mg de proteína total (dentro de la cual se encuentran las enzimas celulasas), se produce 3.1 U/mL, mientras con 0.02 mg de la enzima comercial (pura) solo se produce 1.7 U/mL.

La actividad de las enzimas de la cepa M1 sobre cáscaras de zanahoria, supera en exceso a la actividad de la enzima industrial, pues con solo 0.018 mg de enzima produce 11.4 U/mL de actividad.

Las enzimas provenientes de la cepa C2 crecidas en naranja, tienen el mismo comportamiento que el resto de las cepas celulolíticas, pues supera por mucho la actividad enzimática producida por la enzima comercial.

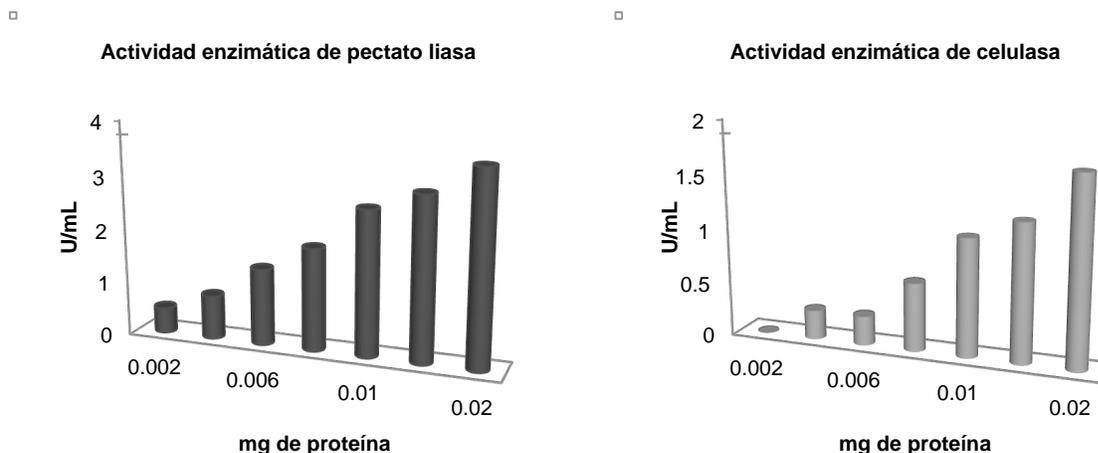


Figura 18. Medición de la actividad enzimática de enzimas comerciales en comparación con diferentes cantidades de enzimas.

Cuando se compara la actividad pectinolítica de las enzimas procedentes de las diferentes cepas, ocurre lo mismo que con la actividad celulolítica, pues ya que con menor cantidad de proteína, se alcanza una actividad enzimática que supera a la producida por la enzima proveniente del hongo *Aspergillus japonicus*.

La actividad enzimática da la relación con la liberación de azúcares reductores, esto se debe a las enzimas secretadas por las cepas bacterianas de estudio; de esta manera, al cortar las cadenas de celulosa y pectina, el sustato puede ser degradando, por esto, la actividad enzimática es una medida indirecta de la degradación de los sustratos.

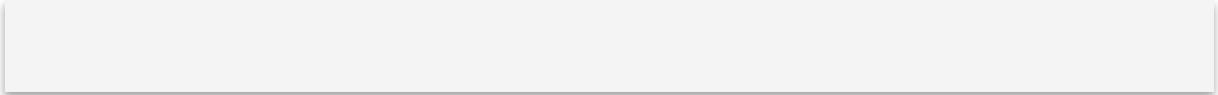
De las cepas celulolíticas estudiadas, la cepa C2 fue la más eficiente al poder degradar de mejor manera 2 sustratos, pera y naranja. En cuanto a la cepa pectinolítica H3, fue la que mejor funcionó para degradar pera, manzana y zanahoria (Tabla 7).

	Sustrato	Actividad enzimática (U/mL)	Cantidad de proteína (mg)	Cepa
Actividad celulolítica	Pera	3.4	0.0014	C2
	Manzana	3.1	0.0018	M4
	Zanahoria	11.4	0.011	M1
	Naranja	8.5	0.0006	C2
Actividad pectinolítica	Pera	4.7	0.0019	H3
	Manzana	2.5	0.0023	H3
	Zanahoria	5.2	0.018	H3
	Naranja	2.1	0.002	H2

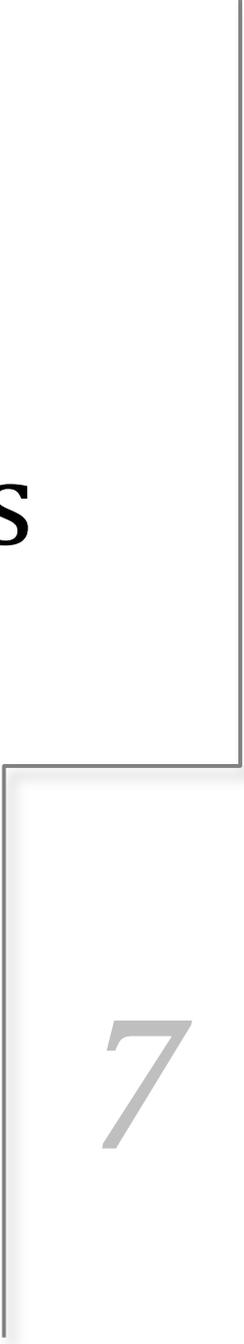
Tabla 7. Resumen de la cuantificación de actividad y producción de proteína sobre sustratos complejos

La producción de enzimas por parte de las cepas, fue más eficiente cuando se cultivaron a 28 °C, debido a que estas cepas son mesófilas y crecen mejor a esta temperatura.

Al comparar la actividad enzimática de las cepas estudiadas y enzimas comerciales, las bacterias deslizantes produjeron actividad enzimática mayor que las enzimas comerciales, por lo que se propone continuar con el estudio de aislamiento y caracterización de las enzimas de bacterias deslizantes para su posible aplicación industrial.

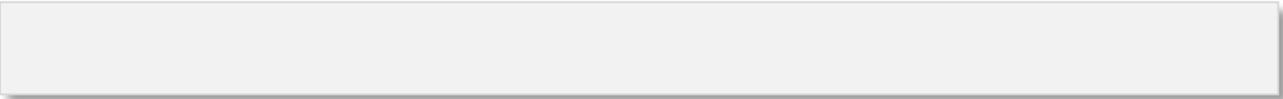


Conclusiones

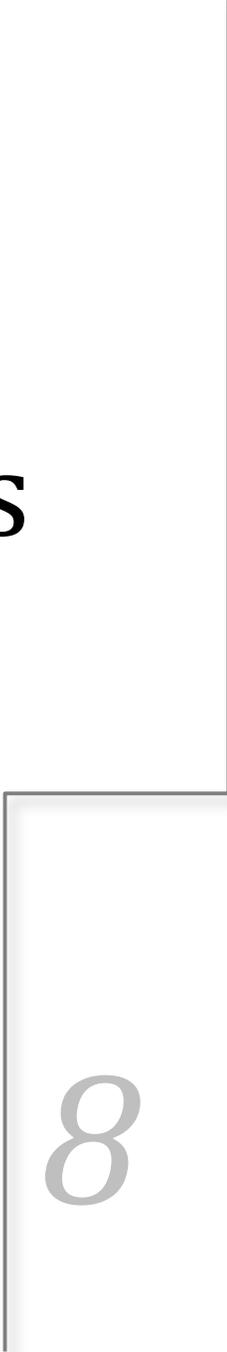


7

- ✓ Se aislaron 10 cepas de bacterias deslizantes de suelos urbanos, semiurbanos y rurales del Valle de México.
- ✓ Se evaluaron 3 cepas de bacterias deslizantes con actividad celulolítica y 3 con actividad pectinolítica.
- ✓ La cepa C2 fue la más eficiente al degradar mejor material de pera y naranja; la cepa M4 degradó mejor material de manzana, mientras la M1 efectuó mayor degradación en zanahoria. Por a su capacidad celulolítica.
- ✓ La cepa H3 funcionó mejor en la degradación de pera, manzana y zanahoria. Por su parte, la cepa H2 degradó mejor al material de naranja. Debido a su capacidad pectinolítica.
- ✓ La temperatura a la cual se observó mejor actividad pectinolítica, fue cuando las cepas se crecieron a 28° C. La actividad celulolítica fue más eficiente a 28° C.
- ✓ Las bacterias deslizantes aisladas en este trabajo mostraron una mayor actividad enzimática, que la mostrada por enzimas comerciales, tanto celulolítica como pectinolítica.



Referencias bibliográficas



8

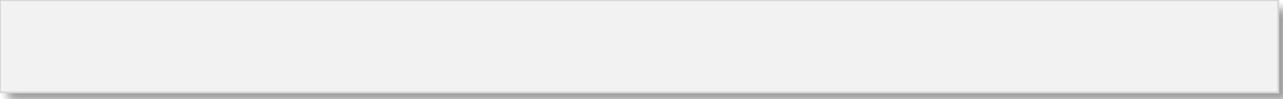
1. Alkorta I., Garbisu C., Llama M. y Serra J. **Industrial applications of pectic enzymes: a review.** *Process Biochemistry*. 33(1):21-278,1998.
2. Arotupin, D. **Evaluation of microorganisms from Cassava waste water for production of amylase and cellulase.** *Research Journal of Microbiology*. 2(5):475-480, 2007.
3. Arroyo, A. **Producción de enzimas pectinasas por actinomicetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja.** Tesis de Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú. 2002.
4. Bhat, M. **Cellulases and related enzymes in biotechnology.** *Biotechnology Advances*. 18:355-383, 2000.
5. Beck, C. y Sograard-Andersen, L. **Unicellular whispers.** *Max Planck Research*. 54-57, 2007.
6. Béguin, P. **Molecular biology of cellulose degradation.** *Annual Revision of Microbiology*. 44:219-248, 1990.
7. Bigelow, M. y Wyman, C. **Cellulase production on bagasse pretreated with hot water** Human Press Inc, 98-100. 2002.
8. Brühlmann, F., Suk, K., Zimmerman, W. And Fiechter, A. **Pectinolytic enzymes from Actinomycetes por the degumming of ramie bast fibers.** *Applied and environmental microbiology*. Pp. 2107-2112. 1994.
9. Brummell, D., 1, Cin, V., Crisosto, V., y Labavitch. J. **Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit.** *Journal of Experimental Botany*, 55 (405,): 2029–2039, 2004.
10. Carrillo, L. **Microbiología Agrícola.** Capítulo 3. 1-28, 2003.
11. Canche, G., et all. **Obtención de Celulosa a Partir de los Desechos Agrícolas del Banano.** *Inf. tecnol.* 16: 83-88, 2005.
12. Chambers, H. **Waste management: Fruits and vegetables.** *Encyclopedia of food science and technology*, 2ª ed. 2609-2613. 2000.
13. Cosgrove, D. **Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:171–201, 1997.
14. Crosgrove, D. **Enzymes and other agents that enhance cel wall extensibility.** *Annu. Rev. Plan Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 391-417, 1999.
15. Cortinas, C. **Manual de capacitación para minimizar residuos a nivel municipal, a través de reducir, reutilizar y reciclar (3r).** 2003.
16. Dawid, W. **Biology and global distribution of myxobacteria in soils.** *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 403-427, 2000.

17. De Vries, R. Y Visser, J. **Aspergillus enzymes involved indegradation of plan cell wall polysaccharides**. Microbiology and molecular biology reviews, 65:4 (497-522) 2001.
18. Delfín, I y Durán, C. **Biodegradación de residuos urbanos lignocelulósicos por pleurotus**. Rev. Int. Contam. Ambient. 19 (1) 37-45, 2003.
19. Diorio, L., forchiassin, F., Leandro, V. Y sueldo, D. **Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por Saccobolus saccoboloides**. Rew iberoam Micol 20: 11 -15. 2003.
20. Ekundayo, E. y Fagbami, A. **Suitability of waste disposal sites for refuse disposal in Benin City, Nigeria**. J. Soil Sci., 13: 21-27.
21. García A, Balbín M., Cabrera J y Castelvi A. **Actividad endopoligalacturonasa de un preparao de la levadura k *Kluyveromices marxianus* aislada de la pulpa del café**. Cultivos tropicales. 23(1):67-72, 2002.
22. Henrissat, B., Heffron, S., Yoder, M., Lietzke, S., y Journak, F. **Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily 1**. Plant Physiol. 107: 963–976, 1995.
23. Kirk, R. **composición y análisis de alimentos de pearson**. Compañía editorial continental, México, 1996.
24. Lodis, H, et all. **Biología celular y molecular**. Editorial panamericana, España. Pp 993-999, 2002.
25. Lucas, R. **Biodegradacion de celulosa y lignina**. Universidad de Jaen, España. 148p, 2001.
26. Lukasz, M. **Biomass, biogas and municipal waste as alternative energy sources for historical cities**. Environment Protection Engineering 32 (1):41-49, 2006.
27. McBride, M. **Bacterial gliding motility: Multiple Mechanisms for Cell Movement over Surfaces**. Annu. Rev. Microbiol. 55:49–75, 2001.
28. McCanna, M., Busha, M. Milionia, D., Sadoa, P., Stacey, J., Catchpole, G., Defernezb, M., Carpitac, N., Hofsted, H., Ulvskove, P., Wilsonb, R., y Robertsa, K. **Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall**. Phytochemistry 57: 811–821, 2001.
29. Miranda, M., Kam, T. y Wensheng, Q. **The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass**. International Journal of Biological Sciences. 5(5):500-516, 2009.
30. Onweremadu, E. **relative suitabilities of soil groups in relation to waste disposal**. Research Journal of Environmental Siciences. 1(5): 258-263, 2007.
31. Percival, Y:, Himmen, M y Mielenz, J. **Outlook for cellulase improvement: screening and slection strategies** Biotechnology Advances 452-481. 2006.

32. Ranveer, S., Saxena, S y Gupta, R. **Review Microbial pectinolytic enzymes: A review**. Process Biochemistry. 40: 2931–2944, 2005.
33. Reinchenbach, H. **The ecology of the myxobacteria**. Minireview, Environmental Microbiology. 1(1), 15-21. 1999.
34. Reinchenbach, H. y Dworkin, **The prokaryotes, the order myxobacteriales** Capitulo 19 y 20. Col 1. springer-Verlag. 1981.
35. Reinchenbach, H. **Myxobacteria, producers of novel bioactive substances**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 27: 149-156, 2001.
36. Rodríguez-Palenzuela, P., García, J. Y Blas C. **Fibra soluble y su implicación en nutrición animal: enzimas y probióticos**. Xiv curso de especialización avances en nutrición y alimentación animal, 1998.
37. Romão, D. **The basis of a policy for minimizing and recycling food waste**. Environmental Science & Policy, Oxford, 5(3): 247-253, 2002.
38. Root, W. **Apples and apple processing**. Processing fruits: Science and Technology. 2a. Ed. 455-461. 2005.
39. Ruijssenaar, H.J. y Harmans, S. **Plate screening methods for the detection of polysaccharase-producing microorganisms**. Appl Microbiol biotechnol 55:143-149, 2000.
40. Sathyanarayana N. Gummadi* & D. Sunil Kumar. **Microbial pectic transeliminases. Review**. Biotechnology Letters, 27: 451– 458, 2005.
41. SEMARNAT. **Manual para el manejo de basura en localidades de 100 habitantes, albergues y campamentos**. 2001.
42. Shimkets, L., Dworkin, L. y Reichenbach, H. **The Myxobacteria**. Capitulo 3.4.3. Prokaryotes. 7:31–115, 2006.
43. Soriano, M., Díaz, P. Y Pastor, J. **Pectinolytic systems of two aerobic sporogenous bacterial strains with high activity on pectin**. Current microbiology, vol 50. Pp. 114-118. 2005.
44. Spormann, A. **Gliding Motility in Bacteria: Insights from Studies of Myxococcus xanthus**. Microbiology and molecular biology reviews. 63 (3):621–641,1999.
45. Taiz, L. y Zeiger, E. Fisiología vegetal, Vol. 2. Publicaciones de la Universidad Jaumer, 3ª Ed. España, 589-592 2006.
46. Whitaker, J. **Microbial pectolytic enzymes**. Microbial Enzymes and Biotechnology, London: Elsevier, pp. 133–176, 1991.
47. **Enzymes in fruit juice production**. Background information. Version 1.0. 2000.

Referencias bibliográficas

48. **A la basura un tercio de la producción mundial de alimentos.** Mayo 2011. Disponible en www.teorema.com.mx en la sección Agro 2000.
49. Gustavsson, J., Cederber, C., Sonesson, U., Otterdijk, R. And Meybeck, A. **Global food losses and food waste.** FAO 1-23, 2011. Se encuentra disponible en la página www.fao.com



Apéndice



9

9.1 ELABORACIÓN DE CAJAS DE SÍLICA GEL

Para la elaboración de la sílica gel se preparan las soluciones según lo indica la tabla 1.

Solución A		Solución B	
HCl concentrado	61 mL	Silicato de sodio	18 mL
H ₂ O destilada	39 mL	H ₂ O destilada	82 mL

Tabla 1. Soluciones para preparar la sílica gel

Se mezclan volúmenes iguales, vertiendo lentamente la mezcla B en la mezcla A, con agitación. La mezcla se vacía en cajas Petri, una vez solidificadas se dializan en agua destilada por 3 días, cambiando el agua cada día; se monitorea el pH, cuando se llegue a pH aproximado de 5 se coloca un círculo de papel filtro Whatman 1. Por el pH ácido (debido al HCl) se agrega 1 mL de CaCO₃ al 2%, hasta obtener un pH de 7.

9.2 MEDIO MINERAL

Realizar un stock de las soluciones indicadas en la tabla 2

NH ₄ SO ₄	20 g / 100mL	*H ₃ BO ₃	2.86 g / 100mL
K ₂ HPO ₄	3.9 g / 100mL	*MnCl ₂ .4H ₂ O	0.181 g / 100mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	7.5 g / 100mL	*ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222 g / 100mL
NaCO ₃	2 g / 100mL	*NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.191 g / 100mL
EDTA	0.1 g / 100mL	*CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079 g / 100mL
Citrato de sodio	0.6 g / 100mL	*Co(NO ₃) ₂ .H ₂ O	0.0494 g / 100mL
FeSO ₄ **	0.3 g / 100mL		

Tabla 2. Soluciones stock

* Tomar 1 mL de cada una de estas soluciones y llevar a un volumen final de 100 mL, etiquetando este frasco como "micronutrientes".

** El FeSO₄ se esteriliza por medio de filtración con membrana de 0.22 μm (pues con el calor se precipita).

Esterilizarlas individualmente en autoclave a 15 lb/in² por 15 min.

En un frasco estéril, colocar las siguientes cantidades de cada stock en zona aséptica y manejarlo posteriormente de tal forma.

Stock	mL	Stock	mL
NH ₄ SO ₄	10	Citrato de sodio	1
K ₂ HPO ₄	1	FeSO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	Micronutrientes	1
NaCO ₃	1	Agua destilada	983
EDTA	1		

Tabla 3. Ejemplo para preparar 1L de medio mineral

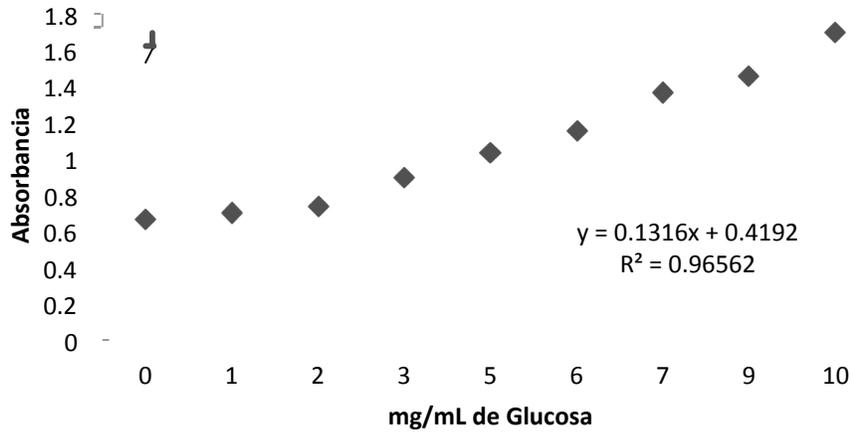
9.3 MEDIO Cy

Ingrediente	Porcentaje
Peptona de Caseína	0.3
Extracto de levadura	0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
Agar bacteriológico	1.5

Para preparar caldo Cy, solo se omite el agar bacteriológico.

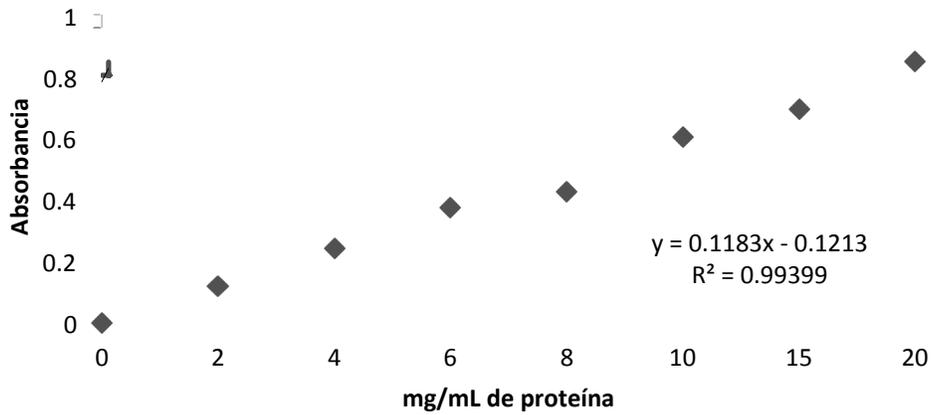
9.4 CURVA PATRÓN DE GLUCOSA

CURVA PATRÓN DE GLUCOSA



9.5 CURVA PATRÓN DE BRADFORD

CURVA PATRÓN DE PROTEÍNA



9.6 CURVA PATRÓN DE ÁCIDO GALACTURÓNICO

